

Peptidmimetika an Zellulosemembranen – SPOT-Synthese und Screening kombinatorischer Peptoid-Bibliotheken

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doct or rer um nat urali um
(Dr. rer. nat.)
im Fach Chemie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dipl.-Chem. Helge Niklas Heine
geboren am 04.08.1971 in Lübeck

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin,
Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. B. Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. U. Koert
2. Prof. Dr. J. Schneider-Mergener
3. Prof. Dr. N. Sewald

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2000

Zusammenfassung

Die SPOT-Synthese an Zellulosemembranen wurde 1992 als eine hocheffiziente Methode zur parallelen Synthese von Peptiden beschrieben. Die wichtigste Anwendung der so synthetisierten Verbindungen ist das direkte Festphasen-Screening. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, das Anwendungsgebiet der SPOT-Methode von Peptiden auf verschiedene Peptidmimetika auszudehnen und durch Screening entsprechender Bibliotheken bioaktive Substanzen zu identifizieren.

(1) Peptoid-Synthese an Zellulosemembranen

Die Ähnlichkeit von Oligo-N-alkylglycinen (Peptoiden) zu Peptiden sowie die Vereinbarkeit ihrer Synthese mit den Bedingungen der SPOT-Technik ließen sie als besonders geeignete Kandidaten für eine Erweiterung der SPOT-Synthese von Peptiden auf Peptidmimetika erscheinen. Die Peptoide wurden nach der 1992 für die Synthese am Harz beschriebenen Sub-Monomer-Methode synthetisiert, bei der die N-Alkylglycin-Monomere zweistufig durch Bromacetylierung und nachfolgende Bromsubstitution durch ein primäres Amin aufgebaut werden. Die Kernaufgabe bei der Anpassung der Synthesebedingungen an Zellulosemembranen war dabei die Entwicklung einer N/O-selektiven Bromacetylierungsmethode, da die Anwesenheit freier Membran-Hydroxyfunktionalitäten ein Reagenz erfordert, welches eine N-Acylierung in Anwesenheit von O-Nukleophilen zuläßt. Durch Untersuchung mehrerer Aktivester der Bromessigsäure konnte gezeigt werden, daß der kristalline Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester im Hinblick auf Ausbeute und N/O-Selektivität optimale Eigenschaften besitzt. Im Anschluß an die Bromacetylierungsmittel wurden 46 primäre Amine auf ihre Anwendbarkeit bei der Synthese von Modell-Tripeptoiden untersucht. Aus den Ergebnissen konnten Gesetzmäßigkeiten abgeleitet werden, die eine Abschätzung der Verwendbarkeit von Aminen für die Peptoidsynthese im Hinblick auf Flüchtigkeit, sterischen Anspruch, Nukleophilie des Stickstoffatoms sowie vorhandene funktionelle Gruppen in Seitenketten ermöglichen.

(2) Synthese und Screening von Peptoid-Bibliotheken

Unter den optimierten Synthesebedingungen wurden zwei Bibliotheken mit jeweils 8000 Tri- bzw. Hexapeptoiden synthetisiert. Die Trimeren-Bibliothek beinhaltet dabei den gesamten Sequenzraum basierend auf 20 Bausteinen, während die Verbindungen der Hexameren-Bibliothek aus einem wesentlich größeren, auf 40 Bausteinen basierenden Sequenzraum statistisch ausgewählt wurden. Um zu überprüfen, ob sich die Bibliotheken zur *de novo* Auffindung von Protein-Liganden eignen, wurden sie auf Bindung zum monoklonalen Antikörper Tab-2 untersucht. Es konnten in beiden Fällen bioaktive Oligomere identifiziert werden (Trimere: $K_D \geq 87 \mu\text{M}$, Hexamere: $K_D \geq 2.7 \mu\text{M}$), die sich vom Peptid-Epitop des Antikörpers [VVSHFND] deutlich unterscheiden.

(3) Rückgratmodifizierte Peptoide

Mit dem Ziel, Rückgratmodifikationen in Peptoide einzufügen, wurden neun Biselektrophile im Rahmen eines „chemischen Screenings“ zur Synthese eines Modell-Trimers verwendet. Vier der Bausteine waren geeignet und ermöglichten damit die Einführung von β -Peptoid-,

m- und p-Aminomethylbenzoesäure- sowie Carbamat-Einheiten in Peptide. Beim Versuch, in analoger Weise auch Harnstoffe zugänglich zu machen, wurde unter den Linker-Spaltungsbedingungen eine Cyclisierung zu Hydantoinen beobachtet. Diese interessante Reaktion wurde näher untersucht, um die SPOT-Methode auf die Synthese von Hydantoinen als heterocyclische Struktur zu erweitern.

(4) Synthese von Hydantoinen an Zellulosemembranen

Die Bildung von Hydantoinen in einer Cyclisierungsreaktion, bei der Ammoniak aus einem Amid freigesetzt wird, wurde an fester Phase noch nicht genutzt, während dieser Reaktionstyp in Lösung bereits intensiv untersucht wurde. Durch eine Optimierung der Cyclisierungsbedingungen ließ sich die zunächst unvollständige Reaktion zur Vollständigkeit bringen. Auch C-substituierte Hydantoine konnten durch Verwendung von α -Aminosäureamiden bzw. -*tert*-butylestern enantiomerenrein zugänglich gemacht werden.

Schlagworte:

Peptidmimetika, SPOT-Synthese, Kombinatorische Chemie, *N*-Alkylglycine, Peptide, Hydantoine, Bromessigsäure, *N/O*-selektive Acylierung, Festphasen-Synthese, Zellulosemembranen, Festphasen-Screening, Antikörper-Liganden *de novo*

Abstract

SPOT-synthesis on cellulose membranes was introduced as a highly efficient method for the parallel synthesis of peptides in 1992. The most important applications of libraries synthesized by SPOT-synthesis are solid phase binding assays. Within this work the extension of the SPOT-method to the synthesis of various peptidomimetics and the identification of bioactive substances by screening of corresponding libraries is described.

(1) peptoid synthesis on cellulose membranes

The similarity of oligo-*N*-alkylglycines (peptoids) and peptides as well as the compatibility of their synthesis with the conditions of the SPOT-technique made them ideally suited for the extension of the SPOT-synthesis from peptides to peptidomimetics. The peptoids were synthesized by the sub-monomer approach originally developed for the synthesis on standard resins in 1992. *N*-alkylglycine monomers are hereby synthesized in a stepwise manner by bromoacetylation and subsequent substitution of the bromine atom by a primary amine. The most critical point in the adaptation of the synthesis conditions was the development of an *N/O*-selective reagent for bromoacetylation due to the presence of free hydroxyl functionalities of the membrane support requiring a reagent suitable for *N*-acylation in the presence of *O*-nucleophiles. Several active esters of bromoacetic acid were synthesized and tested whereby crystalline 2,4-dinitrophenylbromoacetate gave the best results with respect to yield and *N/O*-selectivity. After optimization of bromoacetylation 46 primary amines were applied to the synthesis of model tripeptoids. Rules for the applicability of amines in peptoid

synthesis with respect to volatility, sterical demand, nucleophilicity of the nitrogen atom and compatibility with sidechain functional groups were derived from the results.

(2) synthesis and screening of peptoid libraries

Two libraries consisting of 8000 tri- and hexapeptoids respectively were synthesized under optimized conditions. The library of trimers displayed the entire sequence space based on 20 building blocks, whereas the sequences of the hexamers were selected statistically from the sequence space based on 40 building blocks. In order to examine the suitability of the libraries for the *de novo* identification of protein ligands they were screened for binding to the monoclonal antibody Tab-2. Bioactive peptoids could be identified in both cases (trimers: $K_D \geq 87 \mu\text{M}$, hexamers: $K_D \geq 2.7 \mu\text{M}$) both differing significantly from the peptide epitope [VVSHFND].

(3) backbone modified peptoids

In order to introduce backbone modifications into peptoids nine biselectrophiles were applied in the synthesis of model trimers in a chemical screening. Four of the building blocks were well suited allowing the incorporation of β -peptoid, m- and p-aminomethylbenzoic acid and carbamate units into peptoids. When the introduction of urea-units in a similar approach was attempted hydantoins were formed during cleavage from the solid support. This interesting reaction was examined in detail in order to extend SPOT-synthesis to the synthesis of heterocycles.

(4) synthesis of hydantoins on cellulose membranes

The formation of hydantoins from terminal amides was not yet described in a solid phase synthesis, whereas it was examined intensively in solution. By optimizing the conditions of cyclization the reaction could be driven to completion. C-substituted hydantoins were obtained as single enantiomers, when α -amino acid-amides or *-tert.* butylesters were used in the synthesis.

Keywords:

peptidomimetics, SPOT-synthesis, combinatorial chemistry, N-alkylglycines, peptoids, hydantoins, bromoacetic acid, *N/O*-selective acylation, solid phase synthesis, cellulose membranes, solid phase screening, ligands for antibodies *de novo*

für Claudia

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1	EINLEITUNG	1
1.2	ZIELSETZUNG	5
2	VON PEPTIDEN ZU PEPTIDMIMETIKA	9
2.1	PEPTID-SYNTHESE AN FESTER PHASE	9
2.2	SPOT-SYNTHESE VON PEPTIDEN	12
2.3	PEPTOID-SYNTHESE AN SYNTHES HARZEN	17
2.4	STUKTURELLE EIGENSCHAFTEN VON PEPTOIDEN	18
2.5	VORGEHENSWEISE AUF DEM WEG ZUR PEPTOID-SYNTHESE AN ZELLULOSE	20
3	PEPTOID-SYNTHESE AN ZELLULOSEMEMBRANEN	22
3.1	DERIVATISIERUNG DER ZELLULOSE FÜR DIE PEPTOID-SYNTHESE	22
3.2	GEEIGNETE LINKER-SYSTEME	29
3.2.1	Synthese ohne Linker	29
3.2.2	Sauer spaltbare Linker in der SPOT-Synthese	30
3.2.3	Photolytisch spaltbare Linker in der SPOT-Synthese	33
3.3	PEPTOID-SYNTHESE AN ZELLULOSE NACH DER SUB-MONOMER-METHODE	34
3.3.1	Aktivierung von Bromessigsäure	35
3.3.1.1	Bromacetylierung von N-Alkylglycinen unter Bedingungen der SPOT-Synthese	35
3.3.1.2	Untersuchungen zur N/O-Selektivität verschiedener Bromacetylierungsmittel	45
3.3.1.3	Ergebnisse der Bromacetylierung sekundärer Amine	50
3.3.2	Bromsubstitution durch primäre Amine	51
3.3.2.1	Lösungsmittel	51
3.3.2.2	Konzentrationen	53
3.3.3	Einführung von Diversität: Test von Aminen auf ihre Eignung in der SPOT-Synthese	54
3.3.3.1	Untersuchung der zur Synthese notwendigen Amineigenschaften	54
3.3.3.2	Seitenkettenfunktionalitäten der proteinogenen Aminosäuren	69
3.3.4	Zusammenfassung: Möglichkeiten und Grenzen der Peptoid-Synthese	70
4	IDENTIFIZIERUNG BIOAKTIVER PEPTOIDE <i>DE NOVO</i>	72
4.1	CHEMISCHE VORAUSSETZUNGEN	72
4.2	BIOCHEMISCHE VORAUSSETZUNGEN: BINDUNG EINES ANTIKÖRPERS ALS MODELLSYSTEM	74

4.3 IDENTIFIZIERUNG ANTIKÖRPER-BINDENDER TRIPEPTOIDE	75
4.4 IDENTIFIZIERUNG ANTIKÖRPER-BINDENDER HEXAPEPTOIDE	82
5 RÜCKGRATMODIFIZIERTE PEPTOIDE	93
6 SPOT-SYNTHESE VON HETEROCYCLEN: HYDANTOINE	102
6.1 HYDANTOINE – NEUE PERSPEKTIVEN IN DER SPOT-SYNTHESE	102
6.2 OPTIMIERUNG DER CYCLISERUNGSBEDINGUNGEN	105
6.3 SYNTHESE C-SUBSTITUIERTER HYDANTOINE	109
7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	112
8 ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE BEDINGUNGEN	118
9 DURCHFÜHRUNG	122
9.1 SYNTHESEN IN LÖSUNG	122
9.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften	122
9.1.2 Spezielle Synthesen	123
9.1.3 Untersuchungen zur <i>N/O</i> -Selektivität von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester in Lösung mittels ¹ H-NMR	126
9.2 SYNTHESEN AN SYNTHESCHARZEN	128
9.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift	128
9.2.2 Spezielle Synthesen	130
9.3 SYNTHESEN AN ZELLULOSEMEMBRANEN	136
9.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften	136
9.3.2 Spezielle Synthesen	144
9.4 BINDUNGSSTUDIEN	164
9.4.1 Bestimmung der Bindung von mAk Tab-2 an Tri- und Hexapeptoid-Bibliotheken	164
9.4.2 Bestimmung von Dissoziationskonstanten mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz	164
LITERATURVERZEICHNIS	167
ANHANG	179

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

β -Ala	β -Alanin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
APT	Attached Proton Test
Äq.	Äquivalent(e)
Ar	Aryl
AS	Aminosäure
ber.	berechnet
bez.	bezogen
BLU	Boehringer Light Units
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BPB	Bromphenolblau
br	breites Signal
Bu	Butyl
d	dublett
DBF	Dibenzofulven
DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
dd	doppeltes Dublett
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dnp	2,4-Dinitrophenyl
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray Ionisierung
Et	Ethyl
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium hexafluorophosphat 3-oxid *
HBS-EP	HEPES-gepufferte Kochsalzlösung unter EDTA- und Polysorbat-Zusatz
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure

HMB	Hydroxymethylbenzoesäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
IC ₅₀	Inhibitionskonstante (Konzentration, bei der 50% der maximalen Inhibierung erreicht ist)
IR	Infrarot-Spektroskopie
<i>J</i>	¹ H-NMR-Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
K _D	Dissoziationskonstante
m	Multiplett (NMR); mittleres Signal (IR)
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MBHA	Methylbenzhydrylamin
Me	Methyl
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowellenbestrahlung
Napht	Naphthyl
NMI	<i>N</i> -Methylimidazol
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie
Np	4-Nitrophenyl
NSu	<i>N</i> -Succinimidyl
pent.	Pentett
Pfp	Pentafluorphenyl
Ph	Phenyl
PL	Photolinker: 4-[4'-(1''-Aminoethyl)-2'-methoxy-5'-nitrophenoxy]-buttersäure
ppm	parts per million
PTFE	Polytetrafluorethylen
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)-phosphonium hexafluorophosphat
PyBroP	Bromo-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphat
q	Quartett
R	in Molekülstrukturen: Unbestimmter organischer Rest
RP	Reversed Phase
RT	Retentionszeit
RU	Resonanzeinheiten
s	Singulett (NMR); schmales Signal (IR)
Sar	Sarcosin
SC	Säulenchromatographie
Schmp.	Schmelzpunkt

Sdp.	Siedepunkt
sept	Septett
SG	Schutzgruppe
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TBTU	1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -benzotriazolium tetrafluoroborat 3-oxid *
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Triphenylmethyl (Trityl)
tt	dreifaches Triplett
wt	Wildtyp = Peptid, das einer Analyse zugrunde liegt. Häufig das in der Natur vorkommende Bindungsmotiv.

* Für die Reagenzien HATU und TBTU wurden in der Literatur abweichende Namen vorgeschlagen. Die hier verwendeten Namen sind Chemical Abstracts 1999 entnommen.

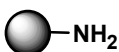
Für Aminosäuren wurde der Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Code verwendet:

1- Buchstaben- Code	3- Buchstaben- Code	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparagin- säure
E	Glu	Glutamin- säure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin

1- Buchstaben- Code	3- Buchstaben- Code	Aminosäure
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin



Zellulosemembran mit reaktiver funktioneller Gruppe (hier -OH-Gruppe)



Syntheseharz mit reaktiver funktioneller Gruppe (hier -NH₂-Gruppe)

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Ein Netzwerk ineinandergreifender biochemischer Prozesse bildet die molekulare Grundlage lebender Organismen. Eine Schlüsselrolle in der Regulation dieser Prozesse spielt die molekulare Erkennung körpereigener Moleküle durch selektive Bindungen – beispielsweise zwischen einem Rezeptor-Protein und seinem Botenstoff. Störungen im biochemischen Gleichgewicht können eine Ursache für Krankheiten sein. Die Anwendung pharmazeutischer Wirkstoffe, die körpereigenen Verbindungen ähnlich sind, ermöglicht einen gezielten Eingriff in molekulare Erkennungsprozesse zur Wiederherstellung des Gleichgewichts.

Peptide **1** stellen eine wichtige Klasse körpereigener Botenstoffe dar. Ihre unterschiedlichen Wirkungen liegen in der jeweiligen Zahl und Abfolge der 20 α -Aminosäure-Bausteine begründet, aus denen sie oligomer aufgebaut sind. In der Vielfalt ihrer Wirkungen begründet sich die lange Tradition ihrer chemischen Synthese.^[1] Vor diesem Hintergrund verwundert es nicht, daß Peptide auch als Pharmaka eingesetzt werden.^[1,2] Verglichen mit nicht-peptidischen Wirkstoffen besitzen sie jedoch einige entscheidende Nachteile: oral verabreicht werden sie 1.) oft nur in geringem Maße aufgenommen und 2.) rasch zu unwirksamen Stoffen abgebaut. Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, ist die Entwicklung peptidähnlicher Verbindungen mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften – den Peptidmimetika.

Zu den Peptidmimetika werden zahlreiche Verbindungen gezählt, die in den meisten Fällen ähnliche Seitenketten-Funktionalitäten wie Peptide enthalten, sich aber im Aufbau des Rückgrates von ihnen unterscheiden. Dabei reicht das Spektrum der möglichen Variationen von der Veränderung von Rückgrat-Atomen (z.B. Abb. 1, **A**) über die Einführung bicyclischer Dipeptid-Analoga (**B**) bis zur Anordnung der funktionellen Gruppen an einer nicht-oligomeren Kernstruktur (**C**).^[3-7]

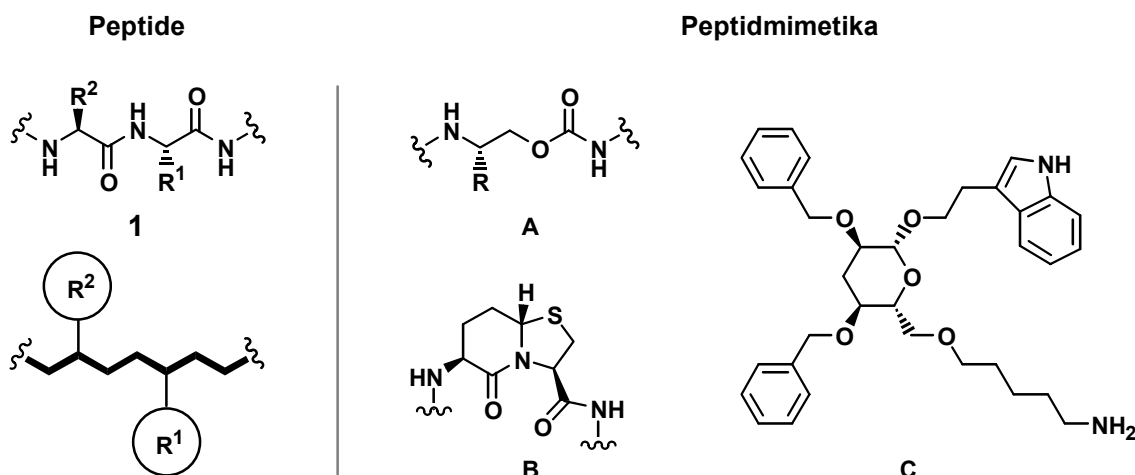
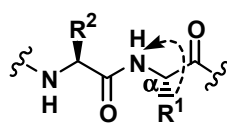
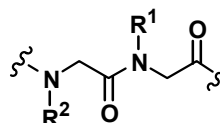


Abb. 1: Peptide: Strukturformel und schematische Darstellung von Rückgrat und Seitenketten. Peptidmimetika: Beispiele für **A**) Rückgrat-Mimetika^[8], **B**) Dipeptid-Analoga^[9] und **C**) Gerüst-Mimetika^[10].

Zu den am besten untersuchten Rückgrat-Mimetika gehören die Oligo-*N*-alkylglycine **2** (Peptoide). Sie unterscheiden sich von Peptiden **1** lediglich im Anknüpfungspunkt der Seitenkette, die formal vom α -Kohlenstoffatom an das Stickstoffatom des Rückgrates verschoben ist. Seitdem im Jahr 1992 zwei allgemeine Methoden zu ihrer Synthese beschrieben wurden^[11,12], konnten zahlreiche Peptoide mit biologischer Aktivität identifiziert werden. Dabei wurden Enzyminhibition^[11,13], antibiotische Wirkung^[14,15], peptidhormonelle Aktivität^[16,17] sowie Bindung an Rezeptoren^[18-20] und lösliche Proteine^[21,22] beschrieben. In Untersuchungen *in vitro*^[16,23] und *in vivo*^[24] konnte ferner gezeigt werden, daß Peptoide die gewünschte Stabilität gegenüber dem Abbau durch Proteasen besitzen – eine wichtige Voraussetzung für pharmazeutische Anwendungen.



Peptide 1



Peptide 2

Zur Synthese der Peptoide, wie auch anderer Oligomere, lassen sich hervorragend die für Peptide entwickelten Synthesemethoden anwenden. Sie basieren auf der im Jahr 1963 durch R.B. Merrifield eingeführten Synthese an fester Phase.^[1,25-27] Dabei wird die Oligomerenkette kovalent an ein festes Trägermaterial gebunden, so daß die Reaktionsprodukte durch Filtration isoliert werden können. Darüberhinaus können Reagenzien im Überschuß eingesetzt werden, um die Reaktionen zur Vollständigkeit zu bringen. Die Vereinfachung der Reaktionsdurchführung, verglichen mit der klassischen Synthese in homogener Lösung, ermöglicht deren Automatisierung. Am Ende der Synthese steht im allgemeinen eine Untersuchung der biologischen Wirksamkeit. Dazu kann das Produkt entweder durch selektive Spaltung eines speziellen Linkermoleküls vom festen Trägermaterial freigesetzt und in Lösung untersucht werden (homogenes Screening), oder direkt an der festen Phase auf Aktivität getestet werden (Festphasen-Screening).^[28]

Zur praktischen Umsetzung der Festphasensynthese stehen vielfältige Verfahren zur Verfügung.^[29-36] Man unterscheidet die parallele Synthese definierter Verbindungen und die Synthese von Substanzgemischen. Zwar ist die Zahl der erreichbaren Verbindungen bei der Anwendung von Mischtechniken („*Split-Synthesis*“) wesentlich größer als bei der Parallelsynthese, die Identifizierung der aktiven Substanzen ist jedoch mit hohem Aufwand verbunden.^[32] Im Gegensatz dazu ist die Identität der Verbindungen bei der parallelen Synthese festgelegt, für die sich die folgenden Methoden durchgesetzt haben (Abb. 2):^[33]

- a) Zur Synthese in Reaktoren sind Kügelchen auf Polystyrol-Basis (Syntheseharze) am weitesten verbreitet. Die besondere Konstruktion der Reaktoren ermöglicht dabei das Abfiltrieren der Reagenzien und Waschlösungen. Zwischen 40 und 100 Reaktoren können unter Verwendung von Syntheseautomaten^[34], die in den unterschiedlichsten Ausführungen erhältlich sind, parallel angesteuert werden.

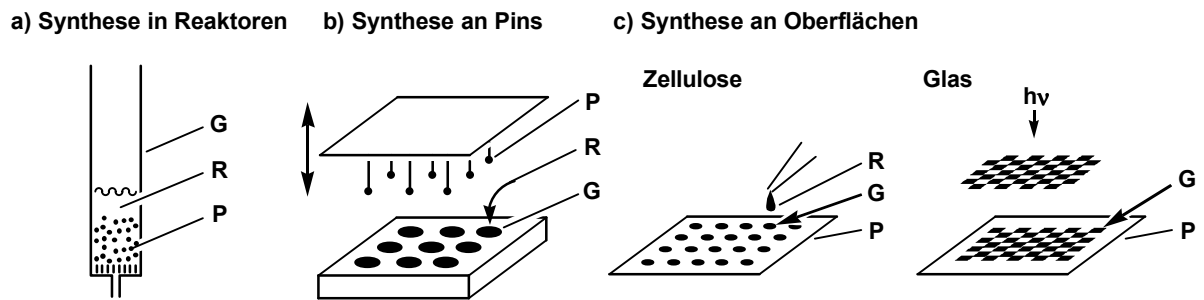


Abb. 2: Methoden zur parallelen Synthese an fester Phase (P: Feste Phase; R: Reagenzien; G: Reaktionsgefäß).

- b) Bei der Synthese an Pins sind die Substanzen an den Enden von 96 Stäbchen (Pins) gebunden, die im Format einer Mikrotiterplatte fixiert sind. Zur Synthese werden sie in die Vertiefungen der mit Reagenzien gefüllten Platte gesenkt.^[37]
- c) Die Synthese an planaren Oberflächen kann mit zwei unterschiedlichen Methoden erfolgen^[38]:
- Die parallele Synthese an Zellulosemembranen wird als SPOT-Synthese bezeichnet.^[39] Durch Pipettieren einzelner Reagenzientropfen werden kleine Bereiche der Membran benetzt (SPOTs). Das von der Membran kreisförmig aufgenommene Lösungsmittel definiert die Größe des „Reaktionsgefäßes“.
 - Zur Synthese an Glasoberflächen macht man sich photolithographische Verfahren zu Nutze, um lichtempfindliche Schutzgruppen selektiv zu spalten. Dadurch wird ermöglicht, daß Reagenzien, die auf die gesamte Oberfläche einwirken, nur an den belichteten Stellen reagieren können. Um Reaktionen an zuvor unbelichteten Bereichen durchzuführen, muß die Belichtungsmaske verändert werden.^[40]



Abb. 3: Roboter zur automatischen Pipettierung von Reagenzien auf eine Zellulosemembran (SPOT-Synthese). Links befinden sich die Reagenzienvorräte, rechts ist eine 19 x 28 cm große Membran mit 8000 (blau eingefärbten) SPOTs fixiert.

Mit steigender Zahl synthetisierbarer Verbindungen (Harz < Pins < Zellulose < Glas) verringert sich die synthetisierte Substanzmenge, was wiederum die Detektion in Bindungsstudien und chemischer Analytik erschwert. Unter diesem Aspekt verbindet die 1992 von R. Frank eingeführte SPOT-Synthese^[39] die parallele Synthese von bis zu 8000 Verbindungen^[41,42] mit der Möglichkeit, die Substanzen ohne besonderen technischen Aufwand mit herkömmlichen Laborgeräten biochemisch und chemisch zu analysieren. Die Synthese kann unter Verwendung eines Pipettierroboters zur ortsgenauen Reagenzienverteilung durchgeführt werden (Abb. 3).

Aufgrund der guten Benetzbarkeit der Zellulosemembran mit wäßrigen Lösungen lassen sich Peptid-Bibliotheken direkt mit Proteinen inkubieren, um deren Bindung an die immobilisierten Substanzen zu untersuchen. Am Beispiel einer vergleichsweise kleinen Bibliothek aus 140 Peptiden kann dieser Vorzug der SPOT-Synthese verdeutlicht werden (Abb. 4). Nachdem das Heptapeptid VVSHFND (jeder Buchstabe steht für eine Aminosäure im 1-Buchstaben-Code) als Bindungsmotiv für den monoklonalen Antikörper Tab-2 identifiziert wurde, galt es in diesem Experiment, die Bindung genauer zu charakterisieren. Dazu wurden alle Peptide synthetisiert, die sich in *einer* Aminosäure von der Ausgangssequenz („Wildtyp“) unterscheiden. Nach der Synthese wurde die Membran mit dem Antikörper inkubiert und Bindung als dunkle Färbung visualisiert. An Zeilen, die viele bindende SPOTs aufweisen, erkennt man Positionen des Ausgangs-peptids, die verschiedene Aminosäuren tragen können, ohne daß die Bindung zum Antikörper verloren geht (in Abb. 4 die oberen beiden Zeilen, die eine Austauschbarkeit der *N*-terminalen Valin-Bausteine signalisieren). Im Gegensatz dazu zeigen Zeilen, die nur wenige bindende SPOTs aufweisen, nicht oder nur eingeschränkt substituierbare *Schlüssel*positionen an (im gezeigten Beispiel die fünf *C*-terminalen Positionen SHFND). Synthese und Screening der gezeigten Peptid-Bibliothek erforderte dabei den vergleichsweise geringen Zeitaufwand von ca. zwei Tagen.

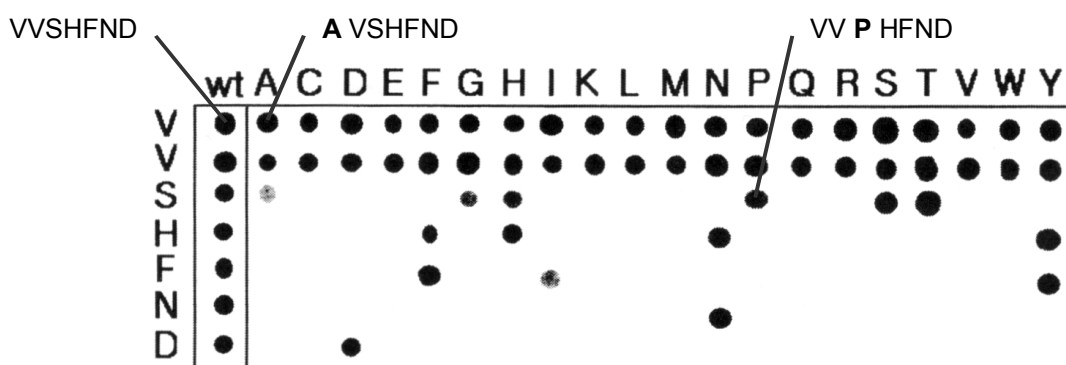


Abb. 4: Substitutionsanalyse des Hepta-Peptids VVSHFND: 140 (7 x 20) Hepta-Peptide zzgl. 7 Kopien des Wildtyps (wt) wurden an einer Zellulosemembran (6 x 13 cm) synthetisiert und mit dem Antikörper mAk Tab-2 inkubiert. Dunkel gefärbt sind diejenigen SPOTs erkennbar, an denen Peptide durch den Antikörper gebunden wurden. Sie unterscheiden sich in genau einer Aminosäure (hervorgehoben in den exemplarisch angegebenen Sequenzen).^[41]

Das Potential der SPOT-Synthese liegt in der schnellen, parallelen Synthese einer großen Zahl von Substanzen in Verbindung mit der Anwendbarkeit der Bibliotheken in direkten und wenig aufwendigen Bindungsstudien. Durch die Kombination von Synthese und Screening an einem Träger läßt sich die Isolierung und Charakterisierung einzelner Substanzen auf aktive Verbindungen beschränken.^[43] Durch die frei wählbare Größe und Anordnung der SPOTs auf der Membran lassen sich die Bibliotheken zudem an die Anforderungen von Synthese und Screening anpassen. Mit der Methode konnten bindende Peptide in einer großen Vielzahl von Experimenten gefunden werden.^[41,44-47] Dennoch wurde die SPOT-Methode an Zellulose bislang noch nicht auf die Synthese von nicht-peptidischen Verbindungen angewendet.

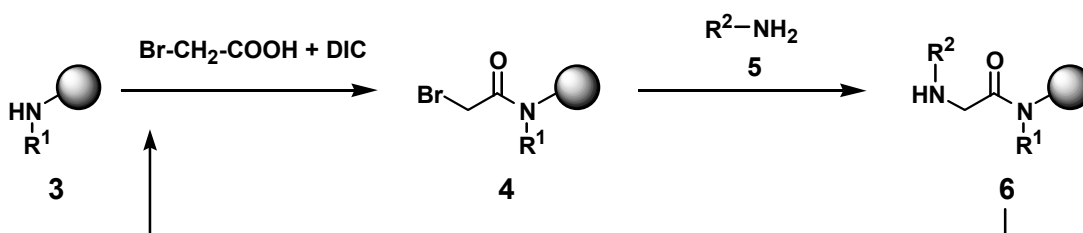
1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Methoden des SPOT-Verfahrens auf Synthese und Screening von Peptidmimetika zu erweitern. Das Potential der Methode – hochparallele Synthese in Verbindung mit guten Eigenschaften in Protein-Bindungs-Studien – sollte damit neuen, nicht-peptidischen Stoffklassen zugänglich gemacht werden.

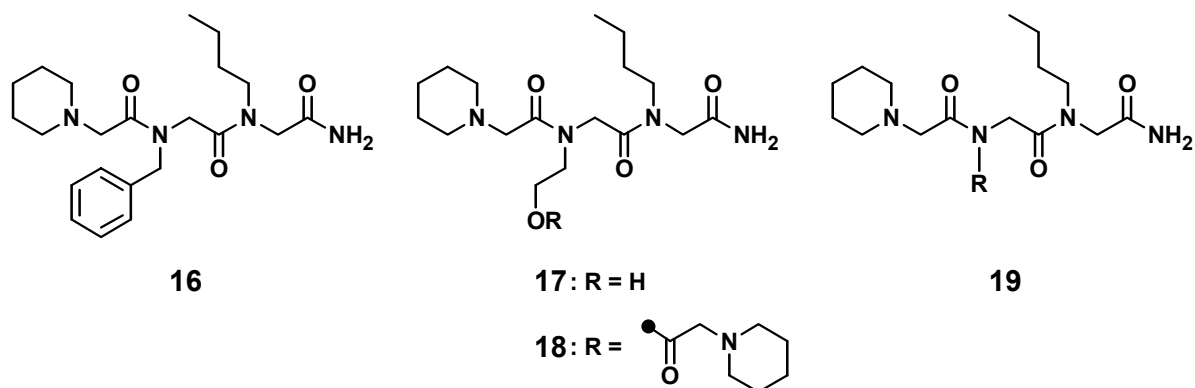
(1) Peptoid-Synthese an Zellulosemembranen

Zunächst sollten Peptidmimetika untersucht werden, die bereits zuvor an fester Phase synthetisiert wurden und die in kombinatorisch-chemischen Projekten zu bioaktiven Verbindungen geführt haben. Dabei mußte berücksichtigt werden, daß nicht alle Synthesebedingungen, die bei Festphasensynthesen möglich sind, auf die Bedingungen der SPOT-Synthese übertragbar sind. Die Reaktionen erfolgen hierbei in einem offenen System, so daß Reagenzien zusammen mit dem Lösungsmittel verdampfen können und zudem der umgebenden Atmosphäre (Feuchtigkeit und Sauerstoff) ausgesetzt sind. Die Reaktionen an Zellulose müssen darüberhinaus mit freien Hydroxygruppen vereinbar sein, die in großer Zahl an der Membran vorhanden sind.

Besonders geeignet für diesen Ansatz war die Synthese von Oligo-*N*-alkylglycinen **2** (Peptoiden). Dabei sollte die 1992 von R.N. Zuckermann *et al.* beschriebene Sub-Monomer-Methode angewendet werden, bei der die *N*-Alkylglycine **6** in einem zweistufigen Prozeß durch Bromacetylierung eines festphasengebundenen Amins **3** zum Bromacetamid **4** und anschließende Bromsubstitution mit einem primären Amin **5** aufgebaut werden (Schema 1).^[12]



Schema 1: Sub-Monomer-Synthese von Peptoiden nach R.N. Zuckermann *et al.*^[12]



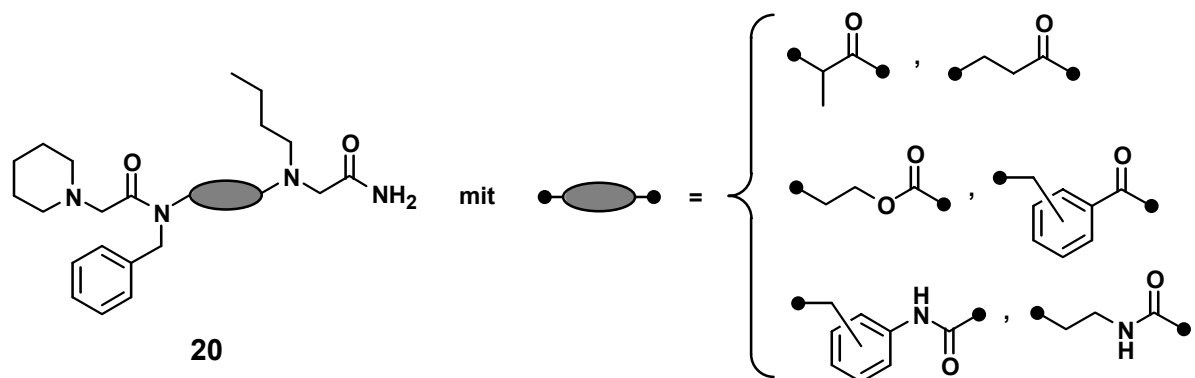
Die Synthese von Peptoid-Bibliotheken sollte schließlich durch die ausführliche Untersuchung der Anwendbarkeit primärer Amine (R-NH₂) in der SPOT-Synthese von Modelltripeptoiden **19** vorbereitet werden.

(2) Identifizierung bioaktiver Peptide *de novo*

Nach der Evaluierung der SPOT-Synthesebedingungen galt es, Peptoid-Bibliotheken zu synthetisieren und auf Protein-Bindung zu untersuchen. Als Modellsystem sollte der auf Peptidebene gut untersuchte monoklonale Antikörper Tab-2 angewendet werden.^[41,42,49,50] Eine Tri- und eine Hexapeptoid-Bibliothek mit jeweils 8000 Verbindungen sollten synthetisiert werden, um bindende Peptide *de novo* zu finden. Aktive Substanzen sollten am Syntheseharz resynthetisiert und die Affinitäten zum Antikörper mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz quantitativ bestimmt werden.

(3) Rückgratmodifizierte Peptide

Das Sub-Monomer-Synthesekonzept sollte erweitert werden, indem Bromessigsäure in Modelltrimeren **20** durch eine Reihe von Biselektrophilen im Sinne eines „chemischen Screenings“ ersetzt wird. Auf diese Weise sollte versucht werden, andere pseudo-biopolymere Strukturelemente^[51] wie *N*-Alkylalanine, *N*-Alkyl- β -alanine, Carbamate, Benzoesäuren und Harnstoffe in das Peptoidkonzept einzufügen.



(4) Synthese von Heterocyclen an Zellulosemembranen

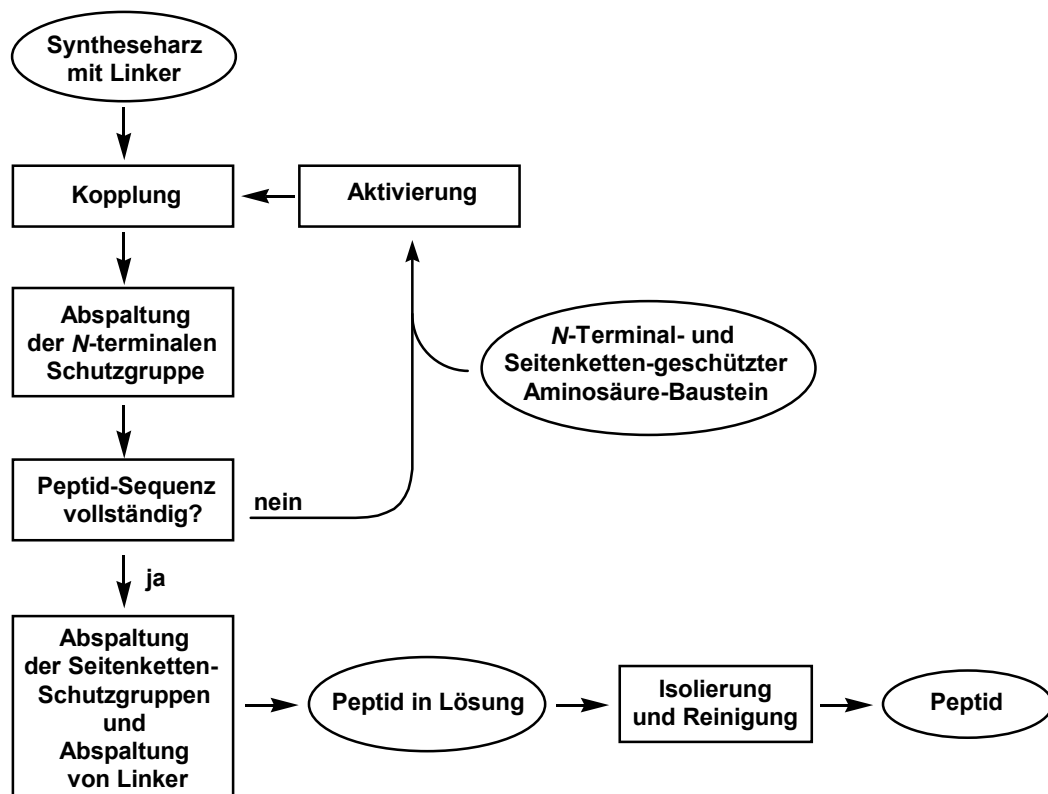
Im Verlauf der Arbeit sollten Wege gefunden werden, heterocyclische Strukturen, die im Hinblick auf pharmakologische Anwendungen von besonderem Interesse sind^[52], mittels SPOT-Synthese aufzubauen. Dabei wäre es günstig, die Synthese in das Sub-Monomer-Synthesekonzept einzufügen.

2 Von Peptiden zu Peptidmimetika

Der Weg zur SPOT-Synthese von Peptiden

2.1 Peptid-Synthese an fester Phase

Die Synthese an fester Phase wurde 1963 von R.B. Merrifield in die Peptidchemie eingeführt.^[25] Die Peptide werden beim Festphasen-Verfahren gewöhnlich vom C- zum N-Terminus schrittweise aufgebaut (Schema 3). Ein Synthesecyclus beginnt mit der Aktivierung eines N-terminal geschützten Aminosäure-Bausteins. Funktionelle Gruppen in den Seitenketten müssen mit orthogonalen Schutzgruppen versehen sein, die bis zum Ende der Synthese stabil sind. Die aktivierte Aminosäure wird mit dem N-Terminus des festphasengebundenen Peptids zur Reaktion gebracht. Als feste Phasen werden gekörnte unlösliche Syntheseharze auf Polystyrol-Basis verwendet, an die die wachsende Peptidkette über ein Linkermolekül kovalent gebunden ist. Nach erfolgreicher Kopplung wird überschüssiges Reagenz durch Waschen entfernt und die N-terminale Schutzgruppe abgespalten, so daß ein neuer Kopplungszyclus beginnen kann. Ist der letzte Baustein eingeführt, werden die Schutzgruppen von den Seitenketten entfernt und das Peptid meistens gleichzeitig durch Spaltung des Linkers vom Harz abgelöst. Aus der Abspaltlösung wird das Peptid isoliert und gereinigt.



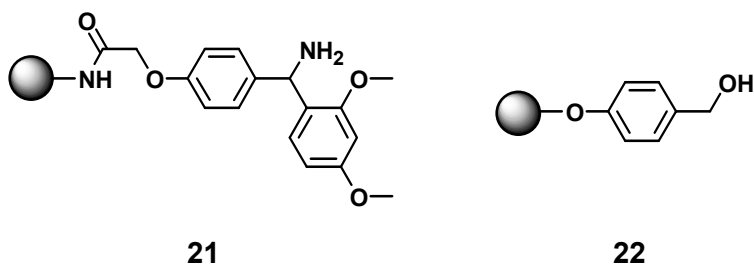
Schema 3: Syntheschema zur Peptid-Synthese an fester Phase.

Verglichen mit der Peptid-Synthese in homogener Lösung sind mit dem Festphasenverfahren deutlich längere Oligomere in kürzerer Zeit synthetisierbar. Die sonst nach jedem Syntheseschritt erforderliche – meist chromatographische – Aufreinigung wird bei der Festphasensynthese durch einfaches Waschen der Harzkügelchen ersetzt. Die Zeit für einen Kopplungszyklus wird so erheblich verkürzt. Zwar können Nebenprodukte, wie sie etwa durch unvollständige Reaktionen entstehen, nicht abgetrennt werden, dieser Nachteil kann jedoch durch die Anwendung hoher Reagenzienüberschüsse sowie Mehrfachkopplungen minimiert werden. Reaktionen lassen sich auf diese Weise zur Vollständigkeit bringen. Die so für jeden Reaktionsschritt erreichbaren hohen Ausbeuten sind eine notwendige Voraussetzung zur Synthese längerer Oligomere, da anderenfalls keine zufriedenstellenden Produktausbeuten erwartet werden können (Tab. 1).

Tab. 1: Abhängigkeit der Gesamtausbeute aufeinanderfolgender Reaktionen von der Ausbeute der Einzelreaktionen.

Ausbeute pro Kopplungsschritt [%]	Anzahl der Kopplungsschritte	Gesamtausbeute [%]
90	1	90
90	10	35
90	15	21
99	1	99
99	10	90
99	15	86

Seit der Einführung der 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc-Gruppe)^[53] hat die Fmoc/*t*Bu-Schutzgruppenstrategie in der Peptid-Synthese eine sehr große Bedeutung erlangt^[1,26] (Abb. 5). Die basenlabile Fmoc-Gruppe schützt dabei den *N*-Terminus und wird am Ende jedes Cyclus mit einem sekundären Amin (z.B. Piperidin) abgespalten. Funktionelle Gruppen in den Seitenketten werden mit säurelabilen Schutzgruppen wie z.B. der *tert*-Butyloxycarbonyl- (Boc-), der *tert*-Butyl- oder der Trityl-Gruppe (Trt-) geschützt. Als säurelabile Linker werden neben anderen der Rink-Linker **21** zur Erzeugung von C-terminalen Amidinen sowie der Wang-Linker **22** für freie Carbonsäuren häufig verwendet.^[26]



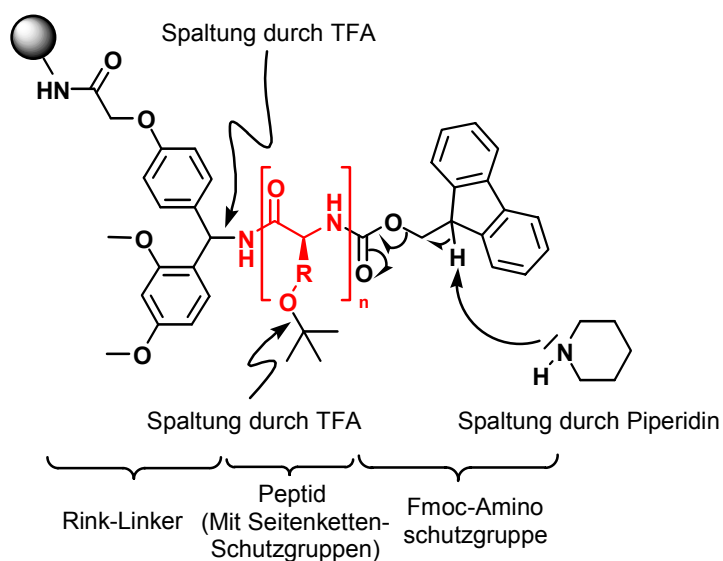
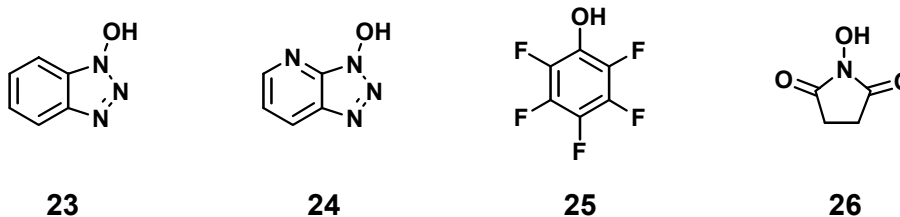


Abb. 5: Schutzgruppenstrategie für die Synthese von Peptid-Amiden nach der Fmoc/*t*Bu-Schutzgruppenstrategie [R = Seitenkette einer Aminosäure mit Hydroxy- oder Carboxy-Funktionalität (z.B.: R = CH₂ für Ser); das Peptid ist farbig hervorgehoben].

Die Aminosäurebausteine können auf verschiedene Arten aktiviert werden, um den festphasengebundenen *N*-Terminus zu acylieren.^[54] Dabei muß die Aktivierung eine schnelle Amidbildung ohne Nebenreaktionen gewährleisten. Zusätzlich muß die α -chirale Aminosäure vor Racemisierung geschützt werden, die besonders im aktivierten Zustand und unter Einwirkung von Basen auftreten kann. Geeignet aktivierte Derivate der Aminosäuren sind die sogenannten Aktivester. Sie basieren auf Hydroxyverbindungen, die gute Abgangsgruppen darstellen, wie beispielsweise das 1-Hydroxybenzotriazol **23**, 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol **24**, Pentafluorphenol **25** oder *N*-Hydroxysuccinimid **26**.



In der Peptid-Synthese hat sich die Aktivierung unter Zuhilfenahme von Reagenzien bewährt, die die entsprechenden Aktivester *in situ* generieren (Abb. 6, oben).^[54] In einem zweistufigen Prozeß reagiert zunächst das von einer in stöchiometrischen Mengen zugesetzten Hilfsbase [z.B. Diisopropylethylamin (DIEA)] deprotonierte Aminosäurecarboxylat **27** mit dem elektrophilen Zentrum des Aktivierungsreagenzes. Im Anschluß wird der Aktivester **28** durch einen nukleophilen Angriff der freigesetzten *N*-Hydroxyverbindung an der Carbonylgruppe der Aminosäure unter Freisetzung einer stabilen Abgangsgruppe [Tetramethylharnstoff (**29**) bei TBTU / HATU oder Tris(*N,N*-tetramethylen)phosphorsäuretriamid bei PyBOP] gebildet (Abb. 6, unten).

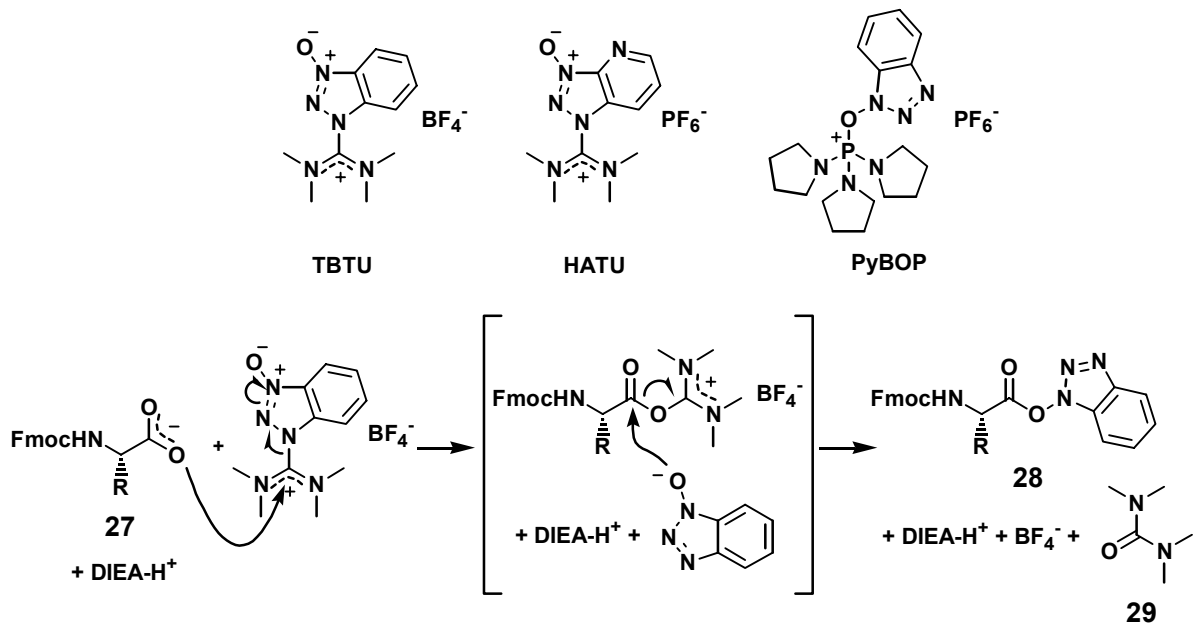


Abb. 6: Oben: Auswahl von Kopplungsreagenzien in der Peptid-Synthese. Unten: Mechanismus der *in situ*-Aktivierung am Beispiel der Aktivierung einer Fmoc-Aminosäure mit TBTU.

2.2 SPOT-Synthese von Peptiden

Die Peptid-Synthese an Zellulose wurde 1988 praktisch gleichzeitig von R. Frank *et al.*^[55] und J. Eichler *et al.*^[56] beschrieben. In der Gruppe von R. Frank wurde die Methode 1992 dahingehend erweitert, daß auf einer Membran nebeneinander lokal begrenzte, runde Reaktionsbereiche, sogenannte SPOTs, erzeugt wurden, indem kleine Mengen der Reagenzienlösungen tropfenweise aufgetragen wurden (Abb. 7).^[39,44] Auf diese Weise ist die parallele Synthese verschiedener Substanzen an einer zusammenhängenden Membran möglich.^[57-60] Die Größe der SPOTs und damit die mögliche Anzahl parallel synthetisierbarer Verbindungen ist vom pipettierten Volumen, der Benetzbarkeit der Membran, sowie von Flüchtigkeit und Viskosität des Lösungsmittels abhängig.

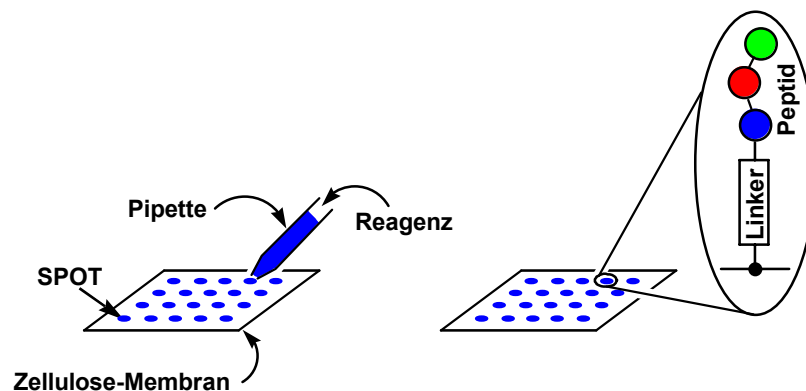


Abb. 7: Schematische Darstellung der SPOT-Synthese.

Zellulose besitzt als lineares Polysaccharid freie Hydroxyfunktionen, die zur kovalenten Immobilisierung der zu synthetisierten Verbindungen genutzt werden (vergl. M. Lebl in Lit.^[61]). Sie können beispielsweise mit einer Aminosäure wie Fmoc- β -Alanin verestert werden (Abb. 8).^[39,62] Am *N*-Terminus läßt sich nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe ein Peptid synthetisieren. Dazu haben sich die kommerziell erhältlichen Fmoc-Aminosäure-pentafluorphenylester in einem schwerflüchtigen Lösungsmittel wie *N*-Methylpyrrolidon (NMP) bewährt.^[42,58] Sie reagieren schnell zu den gewünschten Amiden, ohne Ester mit den freien Hydroxyfunktionen der Zellulose zu bilden, insbesondere wenn sie, wie bei der SPOT-Synthese üblich, in Abwesenheit von Basen eingesetzt werden. Diese Chemo-selektivität (*N/O*-Selektivität) ist eine wichtige Voraussetzung für eine Oligomeren-Synthese an Zelluloseträgern.

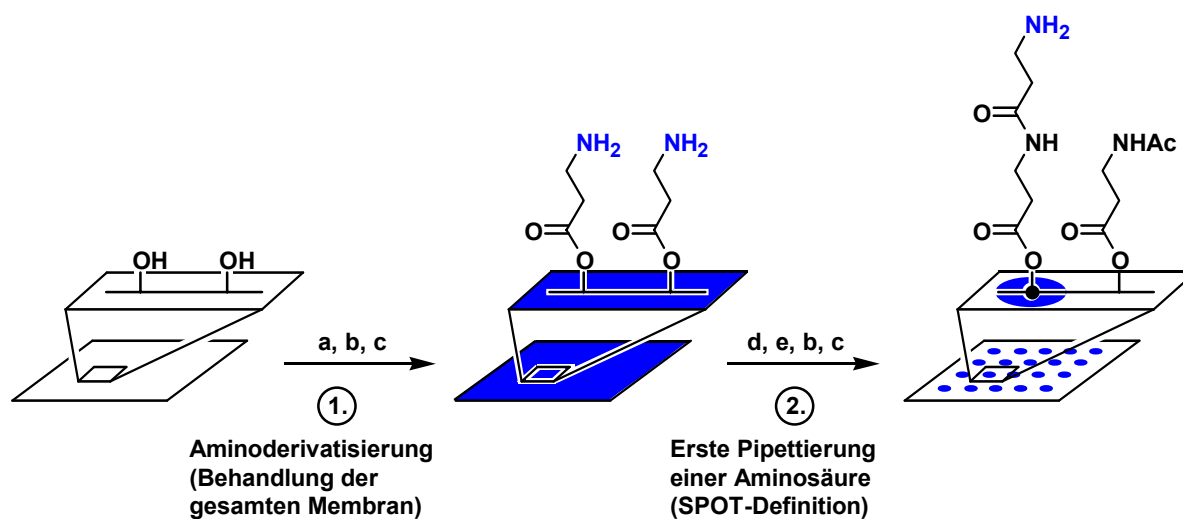


Abb. 8: Derivatisierung von Zellulose für die SPOT-Synthese von Peptiden (1) und Definition der SPOTs durch die erste Pipettierung einer Aminosäure (2). Durch Acetylierung (e) werden freie Aminogruppen zwischen den SPOTs blockiert und können nicht mehr durch Bromphenolblau (BPB) angefärbt werden. **a)** Fmoc- β Ala-OH / DIC / NMI, 12 h; **b)** 20% Piperidin / DMF; **c)** BPB / MeOH; **d)** Fmoc- β -Ala-OPfp (SPOT-weise); **e)** Ac₂O / DIEA / DMF.

Die Peptid-Synthese erfolgt an Zellulose analog zur Synthese an Harzen (vergl. Abschnitt 2.1). Die beiden Synthesestrategien sind in Tab. 2 gegenübergestellt. Hauptunterschied besteht in einer anderen Linkerstrategie, da zellulosegebundene Peptide oft an der Membran immobilisiert bleiben. Ein willkommener Nebeneffekt der miniaturisierten Synthese ist der geringe Reagenzienbedarf pro SPOT und damit pro Peptid, was die Kosten der Methode begrenzt. Das Pipettieren der Reagenzien kann dabei mit einem Pipettierroboter automatisch erfolgen (Abb. 3, Seite 3). Mit der dadurch erreichbaren Präzision lassen sich bis zu 8.000 SPOTs auf einer Membran der Größe 19 x 28 cm parallel synthetisieren.^[58]

Ein großes Potential der SPOT-Synthese liegt in der Möglichkeit, Substanzen hochparallel zu synthetisieren und anschließend direkt auf Bindung zu testen. Dabei bleiben die Substanzen membrangebunden, so daß die Identität von aktiven Verbindungen sofort anhand der Position auf der Membran abgelesen werden kann (örtliche Adressierung).

Tab. 2: Vergleich gängiger Synthesebedingungen für die Peptid-Synthese an Syntheseharzen und der SPOT-Synthese an Zellulose.

	Peptid-Synthese an	
	Syntheseharzen	Zellulose (SPOT-Synthese)
Feste Phase	Polystyrol- oder Polystyrol-Polyethylenglycol-Harz	Zellulosemembran
Linker	Rink-, Wang- oder HMB-Linker (zahlreiche weitere Möglichkeiten ^[63])	β -Alanin (Esterbindung zum Träger), Rink- oder Photo-Linker sowie HMB- ^[48] und <i>Safety-Catch</i> -Linker ^[64,65]
Schutzgruppenstrategie	Fmoc / <i>t</i> Bu oder Boc / Bzl	Fmoc / <i>t</i> Bu
Aminosäure-Aktivierung	Aktivierung <i>in situ</i> (z.B. TBTU, PyBOP)	Aminosäurepentafluorphenylester oder basenfreie Aktivierung <i>in situ</i> (z.B. DIC/HOBt)
Automatisierung	Vollautomatisch	Halbautomatisch (manuelle Wasch-Schritte)
Abspaltung vom Träger	Meistens zusammen mit den Seitenketten-Schutzgruppen	Nach der Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen (Wahrung der Ortsadressierung)
Maßstab	< mg bis mehrere g / Peptid	25 - 100 μ g / SPOT
Reagenzienbedarf	100 mg bis mehrere g / Peptid	mg / SPOT

Bei Verwendung eines geeigneten Linkers läßt sich die kovalente Bindung zum Träger lösen, ohne die räumliche Zuordnung zu verlieren: Die Anwendung der abspaltenden Reagenzien in der Gasphase (z.B. Ammoniak bei Ester-Linkern^[59,66]) führt zu Produkten, die nach der Abspaltung noch adhäsiv am Träger gebunden bleiben. Solche SPOTs können ausgestanzt und die anhaftende Substanz mit einem Lösungsmittel abgelöst werden. Diese Vorgehensweise ist vor allem für Bindungsstudien in homogener Lösung oder für analytische Untersuchungen (z.B. HPLC/MS) interessant.

Mit den Mitteln der SPOT-Synthese und anschließendem Screening konnten zahlreiche bioaktive Peptide unter Anwendung verschiedener Bindungsexperimente^[67] identifiziert werden – im allgemeinen vor dem Hintergrund der Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen (Tab. 3)^[47]:

1. Als sehr erfolgreich erwies sich die Identifizierung und Charakterisierung des bindenden Bereiches (Epitops) eines Proteins **A** mit bekannter Aminosäuresequenz durch Analyse der Bindung des Partners **B** an zellulosegebundene Teilsequenzen von **A** (Abb. 9). Ein dazu häufig angewendetes Vorgehen ist die Lokalisation des bindenden Bereiches mittels Analyse kurzer Peptide (6-15 Aminosäuren), deren Sequenzen die Primärsequenz des zu untersuchenden Proteins durch überlappende Sequenzen überspannen (Epitop-Kartierung mittels überlappender Peptide).^[68] Aus der Analyse der bindenden Peptide erhält man einen oder mehrere Bereiche, die das kontinuierliche bzw. diskontinuierliche Epitop anzeigen. Insbesondere letzterer Bindungstyp ist auf der Basis herkömmlicher Methoden (z.B. ELISA) nur schwer nachzuweisen, da die

Tab. 3: Methoden zur Identifizierung bioaktiver Substanzen durch Bindungsstudien mit Peptiden, die mittels SPOT-Synthese hergestellt wurden (F = Heterogene (Festphasen-) Bindungsstudie; H = Bindungsstudie in homogener Phase).

Nr.	Methode	Typ	Analysierte Wechselwirkungen/Effekte
1	Identifizierung von Protein/Protein-Wechselwirkungen	F	<u>Kontinuierliche Epitope:</u> Antikörper-Antigen Wechselwirkung ^[39,42,69-71] Substrat-Spezifität von Chaperones ^[72,73] Bindungs-Spezifität von Protein-Domänen ^[74,75] <u>Diskontinuierliche Epitope:</u> Antikörper-Antigen Wechselwirkung ^[71,76-78] Cytokin-Rezeptor Wechselwirkung ^[79-81] <u>Sonstiges</u> ^[82,83] ; <u>Übersichten</u> ^[41,45,46]
2	Wissensbasiertes Liganden-Design: Protein-mimetische Peptide	F	Affinitätserhöhung durch Kombination getrennter Bereiche eines diskontinuierlichen Epitops ^[77,78]
3	Transformation von Peptiden	F	L- in D-Peptid ^[84,85] L-Peptid in unverwandtes L-Peptid ^[86,87]
4	Identifizierung von Enzym-Aktivitäten	F	Kinase-Aktivität ^[88-90] Protease-Aktivität ^[91-93]
5	<i>De novo</i> -Identifizierung bindender Peptide	F	Protein-Bindung ^[50,90,94] (Übersichten ^[42,44,45,95]) Metall-Bindung ^[42,96] (Übersicht ^[41]) DNA- Bindung ^[97]
6	Bindungsstudien mit intakten Zellen	H	T-Zell-Epitope ^[98-100] Inhibierung des HIV-Eintritts ^[101] Antibiotische Wirkung von Peptiden ^[102]

Bindungsaffinitäten der Teil-Epitope vergleichsweise gering sind. Erst die Eigenschaft zellulosegebundener Peptide, auch sehr schwache Bindungen (bis in den mM Bereich^[59]) zu signalisieren, macht diese Daten zugänglich.^[45] An die Identifizierung schließt sich meistens die Analyse der Schlüsselaminosäuren im Rahmen einer Substitutionsanalyse an (ein Beispiel ist in Abb. 4, Seite 4 gezeigt).

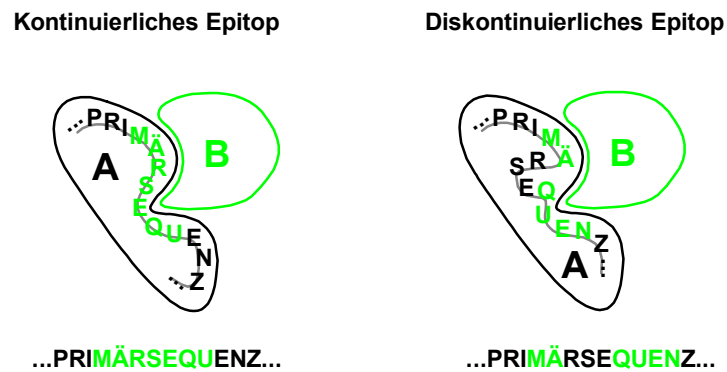


Abb. 9: Veranschaulichung kontinuierlicher und diskontinuierlicher Protein-Protein Kontakte bei der Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen **A** und **B**.

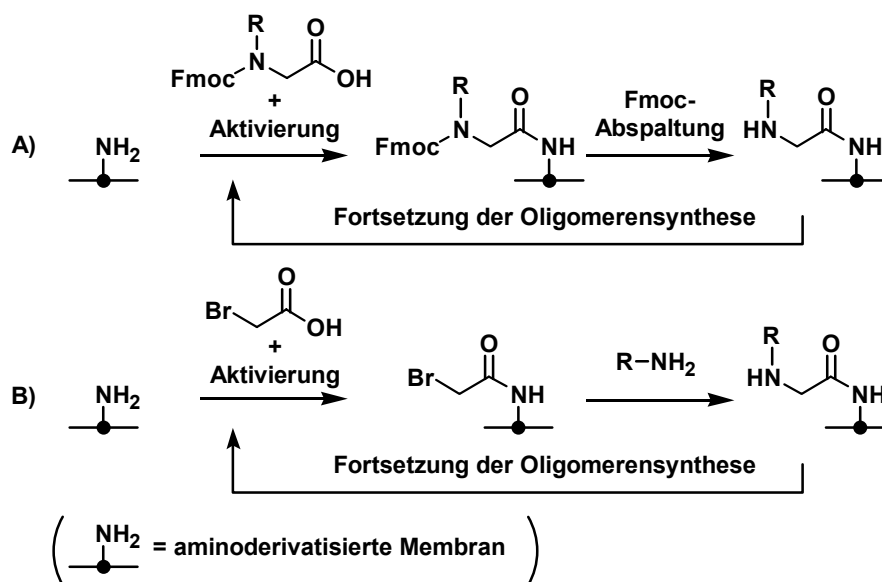
2. Zur Affinitätserhöhung bekannter Peptide lassen sich mit Hilfe der SPOT-Synthese in wissensbasierten Ansätzen proteinmimetische Peptide identifizieren, beispielsweise indem zwei Peptide eines diskontinuierlichen Epitops mit einer Linkereinheit verbunden werden.
3. Ebenfalls zur Optimierung von bindenden Peptiden eignet sich die schrittweise Transformation eines L-Peptids in ein D-Peptid unter Erhalt der Aktivität, die insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von pharmakologisch interessanten, proteasestabilen Peptid-Wirkstoffen von Interesse ist.
4. Auch Enzymaktivitäten, wie die Substratspezifität von Proteasen und Kinasen, konnten mit Peptiden aus der SPOT-Synthese gezeigt werden.
5. Die Anwendung kombinatorischer Bibliotheken ermöglichte die Identifizierung von bindenden Peptiden, ohne Vorinformationen in die Untersuchung einzubringen, was besonders im Hinblick auf die Identifizierung neuer Leitstrukturen von Interesse ist. Auf diese Weise konnten bindende Peptide für Proteine, Metalle und DNA gefunden werden.
6. Schließlich konnte das Potential der hochparallelen Synthese auch für die Bereitstellung von freien Peptiden genutzt werden, die in Bindungsstudien in homogener Phase eingesetzt wurden. Auf diese Weise konnten Wechselwirkungen an intakten Zellen des Immunsystems untersucht sowie antibiotische Peptide identifiziert werden.

2.3 Peptoid-Synthese an Synthescharzen

Ziel dieser Arbeit war es, die Methoden der SPOT-Synthese auf Synthese und Screening von Peptidmimetika anzuwenden um neue Stoffklassen dem umfangreichen Potential der Methode zugänglich zu machen. Besonders geeignet für diesen Ansatz erschienen Oligo-*N*-alkylglycine (Peptoide **2**), die 1992 von R.J. Simon *et al.* als neue, in modularer Weise zugängliche, Peptidmimetika beschrieben wurden^[11]. Ihre Festphasensynthese ist nach zwei verschiedenen Methoden möglich (Schema 4):

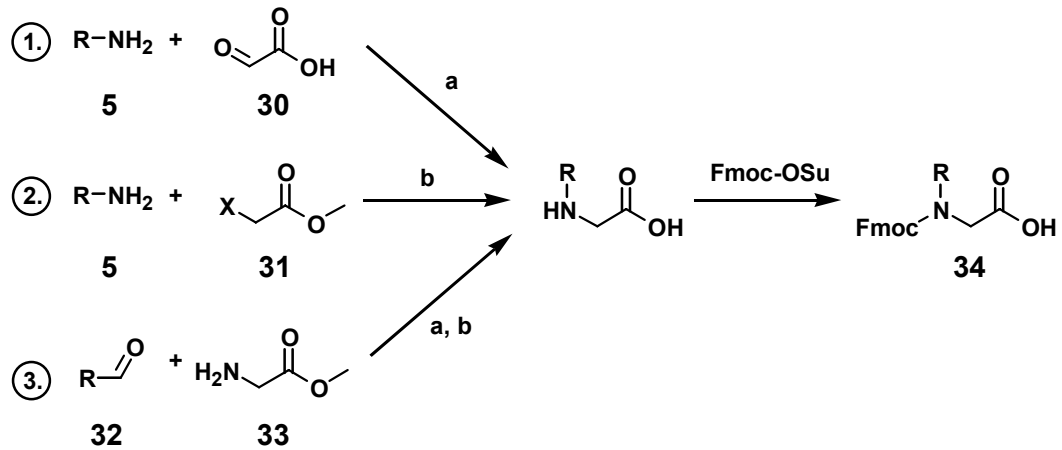
A) Die *Monomer-Methode* ist der Peptid-Synthese^[26] nach der Fmoc/*t*Bu-Strategie analog.^[11,103]

B) Bei der *Sub-Monomer-Methode* wird jeder Baustein in einer Sequenz aus Bromacetylierung und nukleophiler Substitution des Halogens durch ein primäres Amin eingeführt.^[12,104]



Schema 4: Synthese von Peptoiden an fester Phase **A**) nach der Monomer-Methode oder **B**) nach der Sub-Monomer-Methode.

Die Synthesebedingungen der Monomer-Methode sind denen der Peptidchemie sehr ähnlich, wenngleich die Kopplung des Monomers mit der sekundären Aminofunktion einer *N*-terminalen *N*-Alkylglycin-Einheit drastischere Bedingungen erfordert^[105] (Mehrfachkopplungen mit PyBOP^[11] oder die Verwendung des reaktiveren PyBroP^[11,16,17,103,106]). Die benötigten Fmoc-*N*-alkylglycin-Bausteine **34** sind aus primären Aminen **23** (1.) durch reduktive Aminierung von Glyoxalsäure **30** oder (2.) nukleophile Substitution an Halogenessigsäureester **31** sowie (3.) aus Aldehyden **32** durch reduktive Aminierung von Glycinestern **33** zugänglich^[11,16,103,107] (Schema 5).



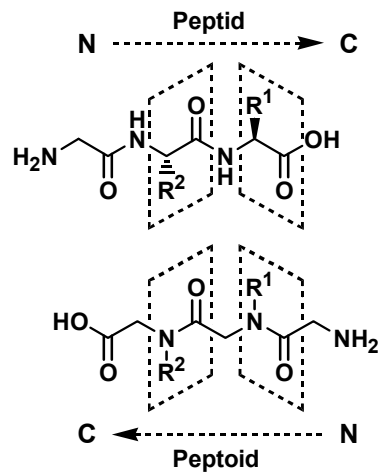
Schema 5: Synthese von Peptoid-Monomerbausteinen. **a)** H_2/Pd in H_2O , $pH = 6$ oder $NaBH_3CN$; **b)** $NaOH$ in H_2O/CH_3CN (R = organischer Rest mit geeignet geschützten funktionellen Gruppen. $X = Br, Cl$).

Mit der Sub-Monomer-Methode stellten R.N. Zuckermann *et al.* 1992 einen alternativen Zugang zu Peptoiden vor.^[12,104] Hierbei tritt an die Stelle der Monomerkopplung eine zweistufige Synthesesequenz aus Bromacetylierung und nukleophiler Substitution des Halogens mit einem primären Amin (Vergl. **B** in Schema 4). Da eine sehr große Zahl primärer Amine kommerziell erhältlich ist (> 13.000 , davon > 1.000 unter $10 DM/g$ ^[108]), lassen sich Peptoide auf diese Weise ohne vorangehende Synthese der Bausteine gewinnen. Das Arbeiten mit großen Überschüssen ermöglicht zudem den Einsatz von weniger reaktiven Aminen (wie z.B. Anilinen). Durch die Immobilisierung der Bromacetamide ist die in homogener Lösung häufig auftretende Mehrfachalkylierung der Amine weitgehend unterdrückt.

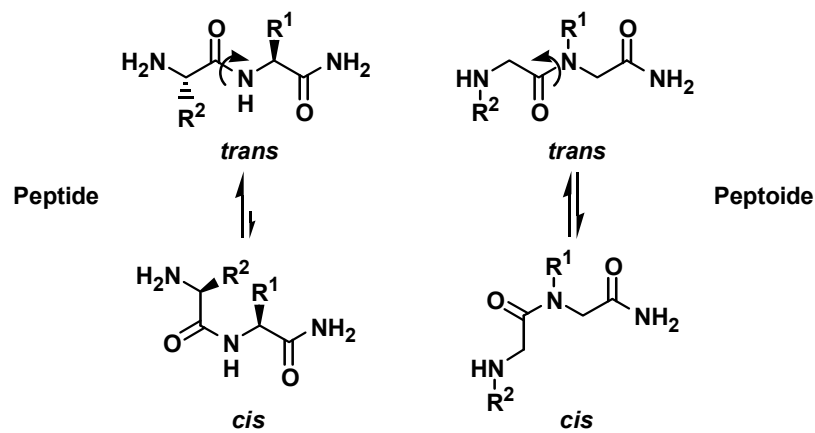
Die Methoden der Peptoidchemie eignen sich nicht nur zur Synthese reiner Oligo-*N*-alkylglycine, sondern auch zur Darstellung von Hybrid-Verbindungen aus Peptiden und Peptoiden (sogenannten Peptomeren).^[17,106,109,110] Als peptidmimetischer Ansatz in der SPOT-Synthese sind Peptoide daher von besonderem Interesse.

2.4 Strukturelle Eigenschaften von Peptoiden

Peptoide sind Isomere der Peptide und gehen formal aus ihnen durch eine Verlagerung der Seitenkette vom α -C-Atom an den Amid-Stickstoff unter Aufgabe der Chiralität hervor. Neben der strukturellen Ähnlichkeit weisen sie aber auch einige Unterschiede zu Peptiden auf (vergl. Tab. 4). Möchte man beispielsweise die relative Anordnung der Seitenketten zu den Carbonylfunktionen erhalten, so entspricht einem vorgegebenen Peptid die Retro-Sequenz des Peptoids^[11]:



Darüberhinaus resultieren aus der Dialkylierung der Amidbindung Unterschiede zu Peptiden: Zum einen stehen Peptoiden keine Amid-Protonen im Rückgrat mehr zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung, was die Bildung einiger aus der Peptidchemie bekannter, charakteristischer Strukturelemente wie z.B. β -Schleifenstrukturen verhindert. Zum anderen besitzen die beiden Amidbindungskonformere bei Peptoiden im Gegensatz zu den überwiegend *s-trans* konfigurierten Peptiden vergleichbare Energien ($\Delta G^\circ < 8.4 \text{ kJ/mol}$ für Prolin^[111]), so daß eine größere Flexibilität möglich ist (Schema 6; die Isomere, die durch die gehinderte Rotation um die Amid *C-N*-Bindung entstehen, werden im folgenden als einfache *cis/trans*-Isomere bezeichnet).



Schema 6: Amidbindungskonformere bei Peptiden und Peptoiden.

Erwartungsgemäß verhalten sich *N*-Alkylglycine aufgrund der fehlenden Amidprotonen in Oligomeren prolinähnlich.^[112,113] Bei Peptoiden mit chiralen Seitenketten konnten bereits ab einer Oligomerenlänge von fünf Bausteinen α -helikale Strukturen NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.^[114] Gestützt wurden die Ergebnisse durch Untersuchungen zum Circular dichroismus^[115] sowie durch Berechnungen^[116]. Erschwert durch das Auftreten von *cis/trans*-Amid-Isomeren wurden die Strukturen von Peptoiden in mehreren Untersuchungen auf der Basis von NMR-Spektroskopie^[115] und Berechnungen analysiert^[11,108,117,118] und mit Peptiden verglichen. Dabei wurde deutlich, daß Peptoide sowohl peptidähnliche als auch peptoidspezifische Sekundärstrukturen ausbilden können.

Auf den strukturellen Eigenschaften basiert ein entscheidender biochemischer Unterschied: die Stabilität der Peptoide gegenüber Proteasen.^[11,16,23] Daraus resultiert eine im Vergleich zu Peptiden deutlich höhere *in vivo* Stabilität, wie am Beispiel eines Tripeptoids in Ratten nach Injektion gezeigt werden konnte.^[24]

In Tab. 4 sind Eigenschaften von Peptiden und Peptoiden zusammengefaßt:

Tab. 4: Vergleichende Gegenüberstellung einiger Eigenschaften von Peptiden und Peptoiden.

Peptide	Peptoide
Chirales Oligomeren-Rückgrat (außer Gly)	Achirales Oligomeren-Rückgrat
Möglichkeit zur Bildung inter- und intramolekularer Wasserstoffbrücken mit Amid-Protonen	Keine Möglichkeit zur Bildung von Rückgrat-Wasserstoffbrückenbindungen
<i>Trans</i> -Amidgeometrie (außer Pro)	<i>Cis</i> - und <i>trans</i> -Amid-Isomere im Gleichgewicht ^[119]
Tendenz zur Sekundärstrukturbildung	Sekundärstrukturen an Beispielen nachgewiesen
Leicht spaltbar durch Proteasen (geringe metabolische Stabilität)	Proteasestabil (<i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>)

2.5 Vorgehensweise auf dem Weg zur Peptoid-Synthese an Zellulose

Verglichen mit der Synthese an Harzen müssen bei der SPOT-Synthese an Zellulose spezielle Umstände berücksichtigt werden:

1. Die Reaktionszeit ist durch die Verdampfung des Lösungsmittels begrenzt.
2. Die Reaktionen erfolgen in einem offenen System, d.h. Luftfeuchtigkeit und Sauerstoff können auf die Reagenzien einwirken.
3. Die Reaktionstemperatur entspricht stets der Umgebungstemperatur.
4. Freie Hydroxy-Gruppen der Zellulosemembran können die Reaktionen negativ beeinflussen.

Mögliche Schwierigkeiten, die auf den speziellen Bedingungen der SPOT-Synthese basieren, sollten mit geeigneten Maßnahmen umgangen werden.

Im Vergleich der Monomer- mit der Sub-Monomer-Methode zum Aufbau von Peptoiden erschien die Sub-Monomer-Methode für die SPOT-Synthese geeigneter zu sein:

1. Die Acylierungsbedingungen, wie sie für die Monomer-Methode zur Kopplung an den *N*-terminalen *N*-Alkylglycin-Baustein benötigt werden, können zu einer unerwünschten Esterbildung mit der Zellulose führen. Im Falle der Sub-Monomer-Methode tritt Bromacetylierung an die Stelle der

aktivierten Aminosäure. Es bestand die Aussicht, aufgrund ihres geringeren sterischen Anspruchs und der höheren Acidität der freien Säure ein ausreichend *N/O*-selektives Aktivderivat der Bromessigsäure finden zu können.

2. Basierend auf der Vielzahl kommerziell erhältlicher Amine werden Peptoid-Bibliotheken zugänglich, die aus Verbindungen bestehen, die nur eine geringe Ähnlichkeit aufweisen. Diese hohe Diversität kann dabei ohne eine zeit-aufwändige Synthese von Bausteinen erreicht werden.

Die Unterschiede zur Peptid-Synthese machten eine detaillierte Untersuchung der einzelnen Schritte auf dem Weg zur SPOT-Synthese von Peptoiden erforderlich:

1. Prüfung der standardmäßig verwendeten Zelluloseträger auf ihre Eignung in der Peptoid-Synthese.
2. Etablierung geeigneter Linker-Strategien.
3. Optimierung der Aktivierung von Bromessigsäure im Hinblick auf die Bedingungen der SPOT-Synthese (*N/O*-Selektivität).
4. Auswahl und Test von primären Aminen, die zu möglichst diversen Oligomeren-Bibliotheken führen.
5. Untersuchungen zur Synthetisierbarkeit umfangreicher Peptoid-Bibliotheken.

Die einzelnen Punkte werden im folgenden dargelegt.

3 Peptoid-Synthese an Zellulosemembranen

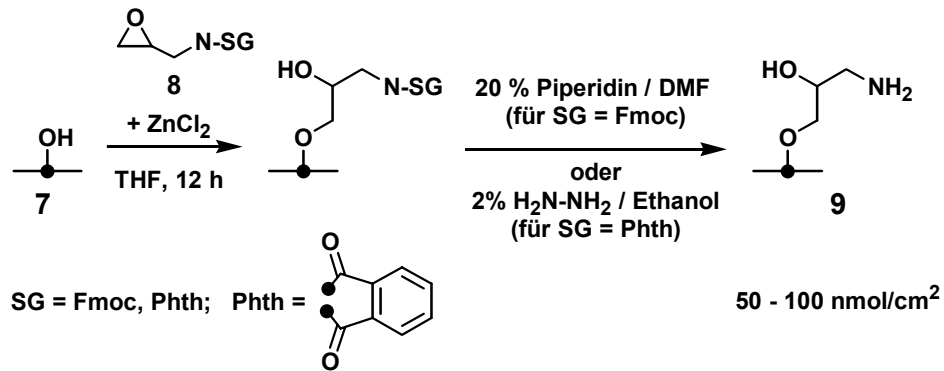
3.1 Derivatisierung der Zellulose für die Peptoid-Synthese

Zellulosemembranen sind stabil gegenüber den meisten Lösungsmitteln (z.B. DMF, DMSO, NMP, MeOH, H₂O, CH₂Cl₂, Et₂O), auch wenn diese bei erhöhter Temperatur angewendet werden (z.B. 80°C oder Mikrowellen-Bestrahlung). Gegenüber basischen Bedingungen ist Zellulose ebenfalls weitgehend stabil: eine mehrstündige Behandlung mit methanolischer Natriummethylat-Lösung oder mit erwärmten konzentrierten Aminen ist problemlos möglich. Lediglich Hydrazin-Lösungen vermögen sie langsam zu zersetzen. Behandlung mit Säuren zersetzt Zellulose in Abhängigkeit von Konzentration, Wassergehalt, Temperatur und Zeit. Die Membranstruktur bleibt jedoch bei Bedingungen der Seitenkettenschutzgruppen-Abspaltung in der Peptid-Synthese (z.B. 90% Trifluoressigsäure) ausreichend stabil, wenn auf mechanische Belastungen wie Schütteln des Reaktionsgefäßes und zu lange Reaktionszeiten (> 2 Stunden) verzichtet wird.^[59]

Um Zellulose in eine für die SPOT-Synthese geeignete Form zu bringen, müssen einige der Hydroxyfunktionen in reaktivere Gruppen überführt werden. Die dazu am häufigsten verwendete Methode ist die Veresterung mit einer Aminosäure zur Einführung von Aminogruppen.^[39,62,120] Esterbindungen mit Zellulose sind gegenüber den Bedingungen der Peptidsynthese nach der Fmoc/*t*Bu-Strategie, insbesondere der Fmoc-Schutzgruppen-abbau mit Piperidin, stabil. Ammoniak vermag sie jedoch, vermutlich aufgrund seines geringen sterischen Anspruchs, zu spalten, was man sich in der Abspaltung zellulosegebundener Peptide mit gasförmigem Ammoniak zu Nutze macht.^[59,66] Beim Aufbau von Peptoiden nach der Sub-Monomer-Methode kommen primäre Amine in hoher Konzentration (1-2 M) zum Einsatz.^[104] Zusätzlich führt die Verdampfung des Lösungsmittels bei unflüchtigen Aminen dazu, daß die lokalen Aminkonzentrationen nach dem Pipettieren noch weiter ansteigen. Gerade einfache primäre Amine bringen daher, verglichen mit der Peptid-Synthese, eine zusätzliche Aminolyse-Gefahr für die Esterbindung zur Zellulosemembran mit sich. Um mögliche Aminolysen und damit eine vorzeitige Abspaltung von der Membran auszuschließen, sollte für die Peptoid-Synthese eine esterfrei derivatisierte Zellulosemembran verwendet werden.

Eine geeignete Derivatisierungsmethode stellt die Zinkchlorid-katalysierte Alkylierung von Zellulose (**7**) mit Epoxiden **8** dar, bei der der Anker über eine Etherbindung an die Membran gebunden ist (Schema 7).^[48]

Mit dieser Methode erreicht man Derivatisierungsgrade zwischen 50 und 100 nmol/cm². Das ist zwar für Festphasen-Bindungsstudien ausreichend, für Bindungsstudien in Lösung oder für analytische Zwecke wäre jedoch eine Derivatisierung im Bereich von 0.50-1.0 µmol/cm² (≅ 0.053-0.11 mmol/g) günstiger. (Zum Vergleich: Typische Syntheseharze weisen Derivatisierungsgrade von 0.20-1.00 mmol/g auf.) Die in Schema 7 beschriebene Methode sollte im Hinblick auf die angestrebte Beladung optimiert und ggf. abgewandelt werden.

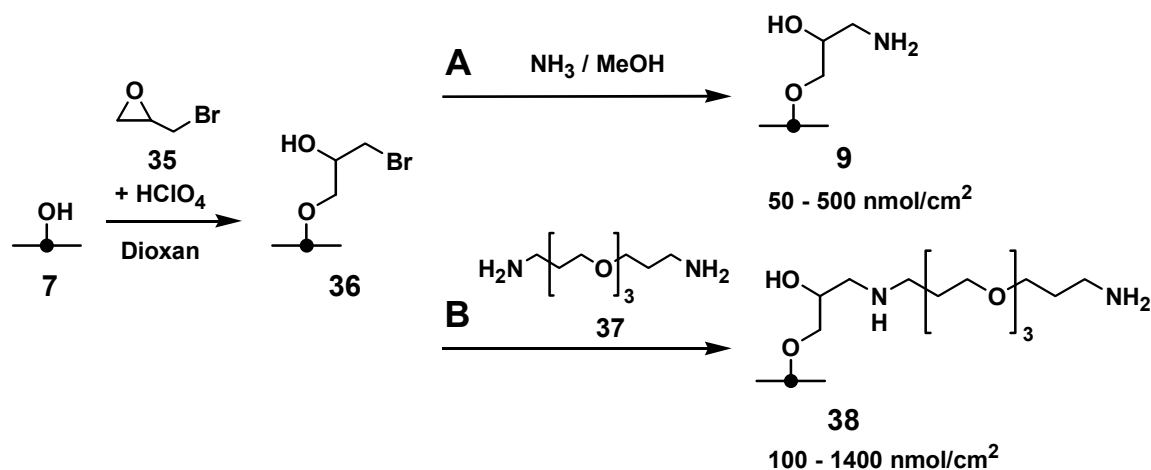


Schema 7: Esterfreie Aminoderivatisierung von Zellulose nach R. Volkmer-Engert *et al.*^[48]

Zellulose weist eine primäre und zwei sekundäre Hydroxyfunktionen pro Monomereinheit auf. Das Membrangewicht einer typischen Membran (Whatman 50) beträgt 95 g/m² was einer Funktionalitätendichte von 177 μmol/cm² (Gesamt-OH-Funktionalitätendichte) bzw. 59 μmol/cm² (nur reaktive primäre Hydroxyfunktionen) entspricht. Die angestrebten Beladungsdichten erreicht man daher bei Annahme einer gleichmäßigen Verteilung durch Derivatisierung jeder fünfzigsten bis hundertsten Monomereinheit, was einen ausreichenden Abstand zwischen den einzelnen Zielmolekülen gewährleisten sollte.

Ein Ansatzpunkt für die Optimierung der Methode lag in der Verbesserung der Alkylierungsbedingungen. Durch die Behandlung der Membran in Instrumentenschalen läßt sich Wasser nur schlecht ausschließen, so daß die katalytische Wirksamkeit der beschriebenen Lewis-Säure (ZnCl₂) herabgesetzt und schließlich unterbunden wird. Daher sollte versucht werden, einen wasserunempfindlichen Katalysator zur Aktivierung des Epoxids einzusetzen. Perchlorsäure als eine starke Brönsted-Säure mit einem wenig nukleophilen Gegenion erschien geeignet zu sein.

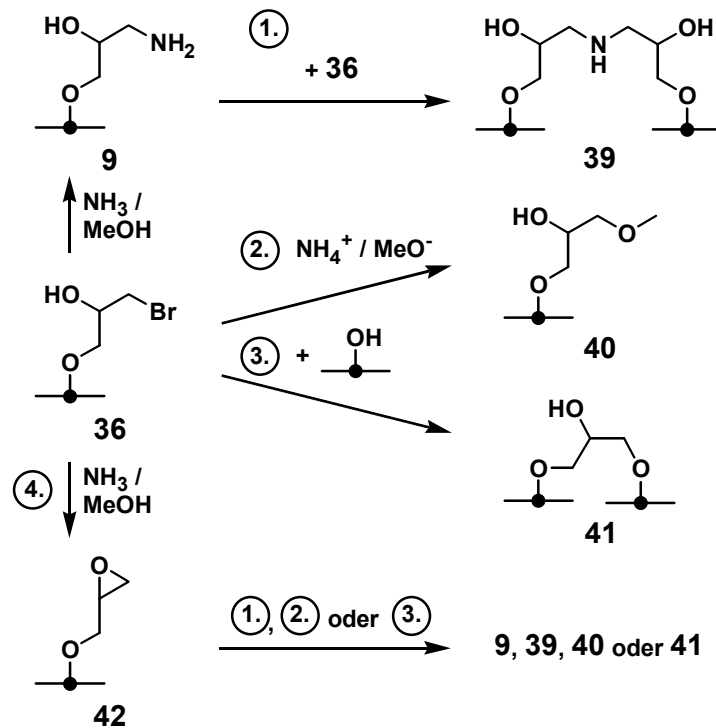
Ferner erwies sich die Behandlung der Zellulosemembranen mit Hydrazin-Lösungen, wie sie zur Abspaltung der Phthaloyl-Schutzgruppe benötigt werden, als nachteilig, da längere Behandlungen die Membran angreifen. Das alternativ verwendete Fmoc-geschützte Epoxid **8** (SG = Fmoc) ist nicht kommerziell erhältlich und muß in zwei Stufen aus Allylamin gewonnen werden. Für eine einfache und schnelle Membrangenerierung erschien daher das kommerziell erhältliche Epibromhydrin (**35**) geeigneter zu sein. Zudem sollte es in Dioxan statt in THF eingesetzt werden, um die Verflüchtigung des Lösungsmittels während der Reaktion zu verringern. Die durch Alkylierung von Zellulose (**7**) gewonnene Brompropyl-derivatisierte Membran **36** wurde anschließend mit einer gesättigten Lösung von Ammoniak in Methanol (ca. 4 M) zur Membran **9** umgesetzt (Derivatisierung **A** in Schema 8).



Schema 8: Neue Methoden zur Synthese esterfrei aminoderivatisierter Zellulosemembranen.

Zur Bestimmung des Derivatisierungsgrades wurden freie primäre Aminofunktionen mit dem Pentafluorphenylester von Fmoc-geschütztem β -Alanin (Fmoc- β Ala-OPfp; 0.6 M in DMF, 30 min) zum Amid umgesetzt. Eine Quantifizierung erfolgte durch Messung der UV-Absorption des Adduktes aus Dibenzofulven und Piperidin nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe gemäß J. Eichler *et al.*^[121] ($\epsilon_{301} = 8100$). Die von Pentafluorphenylestern unter basenfreien Bedingungen bekannte selektive Acylierung primärer Aminogruppen neben freien Hydroxyfunktionen und sekundären Aminogruppen^[122,123] ermöglicht dabei die präzise Messung. Es zeigte sich in mehreren Experimenten, daß mit den neuen Derivatisierungsbedingungen Beladungen zwischen 50 und 500 nmol/cm² erreicht werden können. Um festzustellen, ob die Alkylierung oder die Substitution des Halogens die erreichbare Derivatisierung begrenzen, wurden die Massenänderungen einer Membran im Verlauf der Modifikation verfolgt. Der für diese Membran aus den gravimetrischen Daten berechnete Derivatisierungsgrad übertraf mit 1.39 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ den chemisch zugänglichen Wert (0.12 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) etwa um das 12-fache. Folgende Nebenreaktionen würden diese Beobachtung erklären (vergl. Schema 9):

1. Das zunächst gebildete primäre Amin **9** ist deutlich nukleophiler als Ammoniak und reagiert mit einer benachbarten Brompropylfunktionalität **36** zum quervernetzten Amin **39**. Dieses läßt sich als sekundäres Amin nicht mehr mit dem zur Quantifizierung verwendeten Fmoc-Aminosäurepentafluorphenylester nachweisen, wie Vergleichsexperimente zeigten.^[122,123]
2. Methanol tritt als Nukleophil auf und reagiert zum Methylether **40**.
3. Dem Halogen benachbarte Hydroxygruppen der Zellulose reagieren basenkatalysiert zu einem quervernetzten Produkt **41**.
4. Das Halogenid **36** cyclisiert als β -Halogenalkohol unter Basenkatalyse zum Epoxid **42**, das seinerseits zu den möglichen Produkten (**9**, **39**, **40**, **41**) weiter reagieren kann.



Schema 9: Mögliche Nebenreaktionen bei der Substitution des Zellulose-Brompropylethers **36** mit ges. Ammoniak in Methanol.

Eine Quervernetzung durch Reaktion primärer Amine [Reaktion (1)] wurden für die wahrscheinlichste Nebenreaktion gehalten. Auf der Basis dieser Überlegungen sollte ein nukleophileres Reagenz als Ammoniak zur Generierung der Aminogruppen eingesetzt werden. Es bot sich die Verwendung eines Alkyldiamins an. Aus einer Vielzahl kommerziell erhältlicher Reagenzien erschien das 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**) besonders geeignet (Derivatisierung **B** in Schema 8). Wie fast alle Diamine und im Gegensatz zu Ammoniak, der nur in Methanol oder Wasser in hoher Konzentration gelöst werden kann, läßt es sich auch in aprotischen Lösungsmitteln anwenden, so daß möglicherweise konkurrierende Reaktionen von *O*-Nucleophilen [Reaktion (2)] vermieden werden können. Durch die Oligoetherkette von **37** sind die zu synthetisierenden Zielmoleküle von der Membran **38** verglichen mit **9** durch 14 zusätzliche Atome getrennt. Dieser Abstand sollte sich positiv auf die Produktqualität und möglicherweise auch auf die Zugänglichkeit der Verbindungen in Festphasen-Bindungsstudien auswirken, da die immobilisierten Moleküle in großem Abstand von der Membran „quasi homogen“ solvatisiert werden können.

Prinzipiell nachteilig könnte sich die zusätzliche (membrannah) sekundäre Aminogruppe auswirken. Acylierungen mit der ersten Fmoc-Aminosäure bei der SPOT-Definition sollten jedoch selektiv an der primären Aminogruppe stattfinden, sofern Pentafluorphenylester eingesetzt werden. Bei der im Anschluß durchgeführten Acetylierung mit Essigsäureanhydrid werden alle verbliebenen freien (primären und sekundären) Aminofunktionen blockiert.

Um geeignete Bedingungen für die Membrangenerierung zu finden, wurden die Reaktionsbedingungen systematisch untersucht.

A) Optimierung der Alkylierungsbedingungen.

Zur Bestimmung des Einflusses der Epoxidkonzentration und der Reaktionszeit auf den Derivatisierungsgrad wurden die Alkylierungsbedingungen variiert. Man alkylierte dazu Zellulosemembranen mit Lösungen von Epibromhydrin in Dioxan bei verschiedenen Konzentrationen (1.2 M und 6.0 M). Eine Quantifizierung der Reaktion konnte erst nach Generierung von Aminogruppen durchgeführt werden, die durch Reaktion mit dem Diamin **37** erzeugt wurden (2.3 M in DMF, 17 h, 25°C, Abb. 10).

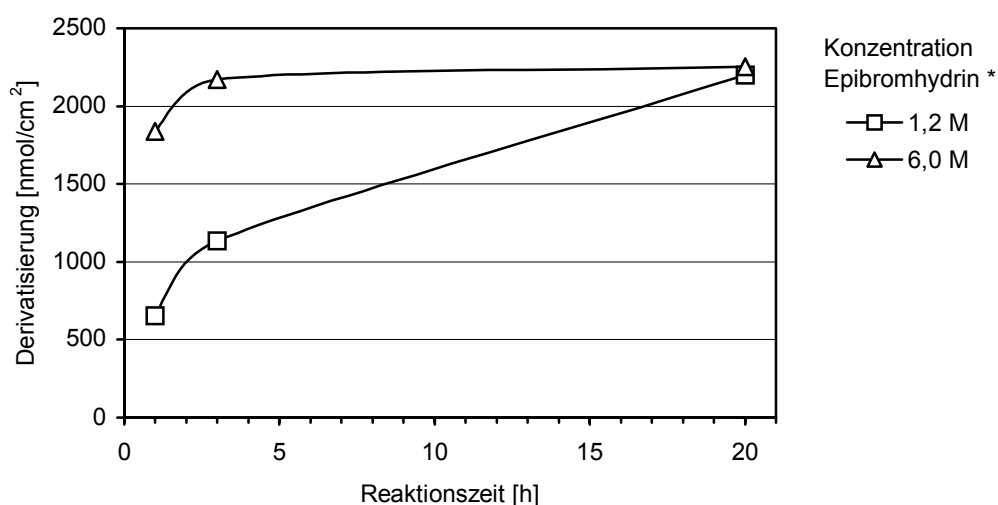


Abb. 10: Einfluß der Epoxidkonzentration und der Reaktionszeit auf den Derivatisierungsgrad bei der Generierung von aminofunktionalisierten Membranen **38**. *) Zur Katalyse wurden 8 Mol% Perchlorsäure zugesetzt.

Aus den gemessenen Werten läßt sich zunächst ersehen, daß sich mit dem Diamin **37** deutlich höhere Derivatisierungsgrade als bei der Verwendung von Ammoniak in Methanol erzielen ließen (Steigerung der maximal erreichbaren Derivatisierung auf das etwa Vierfache von 500 auf 2200 nmol/cm²). Dabei wurden die angestrebten Werte von 500-1000 nmol/cm² bereits mit einer 10%igen Epibromhydrin-Lösung (1.2 M) bei kurzer Reaktionszeit (1-3 Stunden) erreicht.

B) Optimierung der Substitutionsbedingungen.

An die Untersuchung der Alkylierungsbedingungen schloß sich eine Optimierung der Brom-Substitutionsbedingungen an. Dazu wurde bei Membranen, die unter optimierten Bedingungen mit Epibromhydrin umgesetzt wurden (1.2 M in Dioxan, 3 h), die Aminkonzentration sowie die Reaktionszeit variiert (Abb. 11).

Aus den gemessenen Werten wird deutlich, daß der Derivatisierungsgrad über einen weiten Reaktionszeitraum hinweg stetig ansteigt. Die Substitutionsreaktion findet bei 25°C offenbar

langsam statt und konnte auch bei Anwendung von hochkonzentrierten Lösungen (2.30 M $\hat{=}$ 50 %) nicht in praktikabler Zeit zur Vollständigkeit gebracht werden.

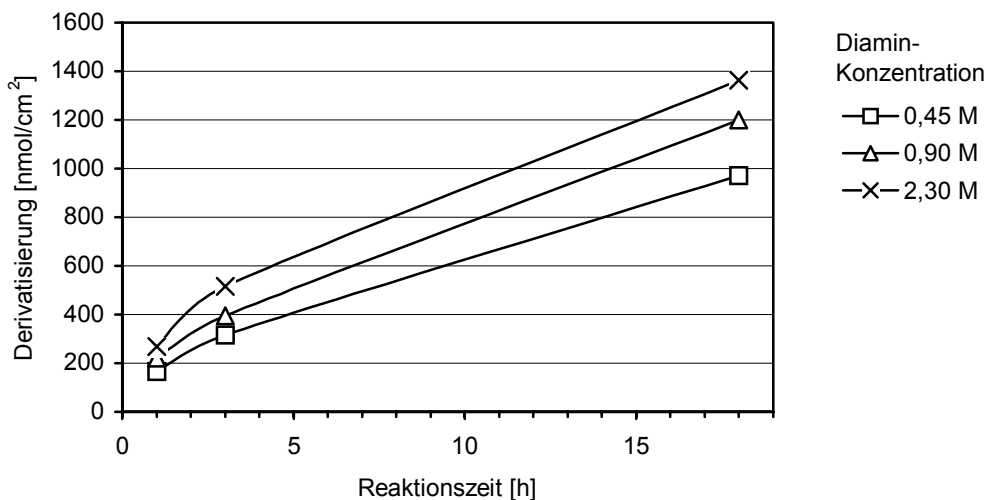


Abb. 11: Einfluß der Diaminkonzentration und der Reaktionszeit auf den Derivatisierungsgrad bei der Synthese von aminofunktionalisierten Membranen **38** (25°C).

Daher wurde das Diamin in einer weiteren Versuchsreihe bei erhöhten Temperaturen angewendet (Tab. 5).

Tab. 5: Einfluß der Reaktionszeit auf den Derivatisierungsgrad bei der Generierung von aminofunktionalisierten Membranen **38** bei erhöhter Temperatur. Das zur Bromsubstitution eingesetzte Diamin wurde bei verschiedenen Temperaturen eingesetzt (0.90 M in DMF).

Reaktionszeit	Erwärmung	Derivatisierung [nmol/cm ²]
60 min	80°C	219
180 min	80°C	249
300 min	80°C	242
2 min	Mikrowellenbestrahlung (810 W)	254
4 min	Mikrowellenbestrahlung (810 W)	281
44 h	25°C	1074

Die Meßreihen machen deutlich, daß der jeweils erste Meßwert kaum weiter gesteigert werden kann (60 min, 80°C bzw. 2 min, Mikrowellenbestrahlung), wengleich ein weit höherer Derivatisierungsgrad durch die (langsame) Reaktion bei 25°C nach 44 h erreicht wird. Die Reaktion konnte also schnell zur Vollständigkeit gebracht werden, die temperatur-

bedingt erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit bewirkte jedoch möglicherweise eine Quervernetzung durch Beteiligung beider Aminogruppen an der Reaktion, so daß Teile der Funktionalitäten blockiert wurden. Um der möglichen Quervernetzung zu begegnen und so größere Derivatisierungsgrade in kurzer Zeit zu erreichen, wurden höhere Aminkonzentrationen angewendet (Abb. 12).

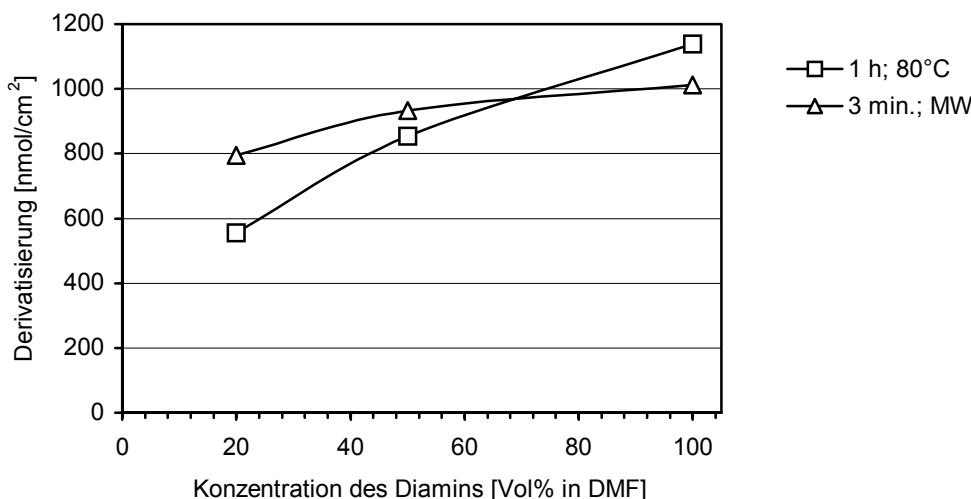


Abb. 12: Einfluß der Diaminkonzentration auf den Derivatisierungsgrad bei der Generierung von aminofunktionalisierten Membranen **38** bei erhöhter Temperatur. Das Diamin 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**) wurde in DMF oder pur eingesetzt (80°C für 1 h oder 810 W Mikrowellenbestrahlung (MW) für 3 min).

Tatsächlich ließ sich auf diese Weise der Derivatisierungsgrad steigern. Bei 80°C läßt sich die Derivatisierung durch Verfünffachung der Diaminkonzentration annähernd verdoppeln. Eine weniger ausgeprägte Steigerung der Werte wurde bei einer Erwärmung mit Mikrowellen erreicht. Das Vergleichsexperiment bei 25°C mit einer unter identischen Alkylierungsbedingungen vorbereiteten Membran zeigte allerdings auch hier, daß noch weitaus höhere Derivatisierungen möglich sind [2.3 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ bei Verwendung einer 2.30 M Diaminlösung ($\approx 50\%$ in DMF), 44 h].

Durch Optimierung der Alkylierungsbedingungen und eine Anwendung des Diamins 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**) bei erhöhter Temperatur ließ sich das Ziel einer Aminoderivatisierung von Zellulose mit Derivatisierungsgraden von 0.50 bis 1.00 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ erreichen. Es zeigte sich, daß auch noch wesentlich höhere Werte erreichbar sind, wenn das Diamin deutlich länger, dafür bei 25°C angewendet wird. Im Hinblick auf eine Vermeidung von Abbruchsequenzen durch zu geringe Reagenzienüberschüsse war dies jedoch nicht erwünscht. Die für hohe Derivatisierungen ($> 2.0 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) notwendigen langen Reaktionszeiten behindern zudem den zeitlich praktikablen Derivatisierungsprozeß.

Da – abgesehen vom Zeitgewinn – die Anwendung von Mikrowellenenergie keinen entscheidenden Vorteil gegenüber der Erwärmung auf einer Heizmatte bewirken konnte, letztere aber insbesondere im Falle von großen Membranen (19 x 28 cm) gleichmäßiger erfolgen kann, wurde im folgenden zur Membrangenerierung das Diamin 4,7,10-Trioxa-

1,13-tridecandiamin (**37**) unverdünnt bei 80°C angewendet.

Auf der Basis der Ergebnisse dieser Versuchsreihe wurde davon ausgegangen, daß auf Membranen, die mit Epibromhydrin alkyliert wurden, auch nach der Aminbehandlung noch Reste substituierbarer Funktionalitäten vorhanden sein können. Um diese abzusättigen, erfolgt nach der Reaktion mit dem Diamin eine zweistündige Behandlung mit Natriummethoxid in Methanol.

Zusammenfassend ergab die Optimierung folgende Reaktionsbedingungen:

1. Alkylierung der Zellulose mit einer Lösung von Epibromhydrin in Dioxan (1.2 M; 3 h) unter Perchlorsäure-Katalyse (8 Mol%). (vergl. Abb. 10)
2. Substitution des Halogens mit purem 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**) bei 80°C (1 h). (vergl. Abb. 12)
3. Blockieren von restlichen reaktiven Gruppen mit Natriummethoxid (5 M in MeOH, 2 h).

Die erreichten Derivatisierungsgrade lagen mit dieser Methode im Bereich von 600-1400 nmol/cm².

Um für bestimmte Anwendungen auch niedrigere Derivatisierungen erhalten zu können, kann das Protokoll auf der Basis der Versuchsreihe folgendermaßen abgewandelt werden:

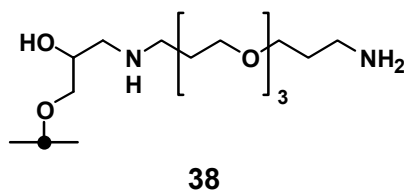
1. Verkürzung der Alkylierungszeit auf 1 Stunde.
2. Anwendung einer Lösung des Diamins **37** in DMF (0.9 M) bei 25°C.

Mit dieser Methode lagen die erreichten Derivatisierungsgrade im Bereich von 100-400 nmol/cm².

An dieser Stelle sei erwähnt, daß zwar die Derivatisierungsgrade *verschiedener* Membranen in den angegebenen Bereichen durchaus erheblich voneinander abweichen können. Mehrfachbestimmungen der Derivatisierung innerhalb *einer* Membran ergaben jedoch stets eine sehr geringe Streuung der Werte (< 10%), was eine homogene Membranderivatisierung widerspiegelt.

3.2 Geeignete Linker-Systeme

Nachdem mit der esterfrei aminoderivatisierten Membran **38** ein für die Peptoid-Synthese geeigneter Träger vorlag, galt es, geeignete Linker zu wählen.



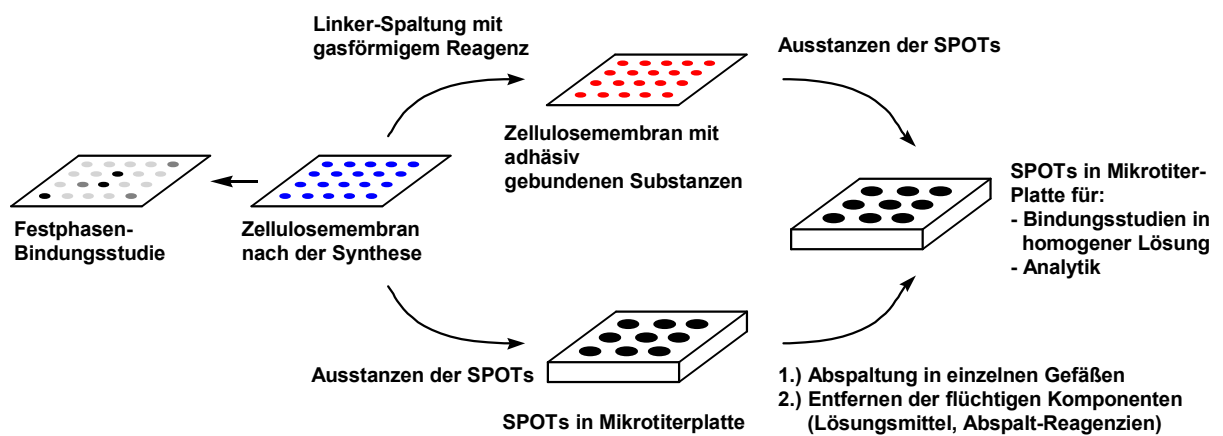
3.2.1 Synthese ohne Linker

Die wichtigsten Anwendungen von Substanzen, die an Zellulose synthetisiert wurden, sind

heterogene Bindungsstudien, bei denen im allgemeinen die Bindung von Proteinen untersucht wird (vergl. Tab. 3, Seite 15). In diesem Fall ist eine Abspaltung von der Membran und damit die Verwendung eines Linkers nicht notwendig. Die Membran **38** kann direkt mit der ersten Aminosäure zur Definition der SPOTs umgesetzt werden, so daß die Substanzen nur mittels Amid- und Etherbindungen an die Zellulose gebunden sind, was eine zerstörungsfreie Abspaltung verhindert (zur Veranschaulichung der SPOT-Definition vergl. Abb. 8-(2), Seite 13).

3.2.2 Sauer spaltbare Linker in der SPOT-Synthese

Sowohl für Bindungsstudien in homogener Lösung als auch für analytische Zwecke (Qualitätskontrolle und Optimierung der Synthesebedingungen) muß ein geeigneter Linker gewählt werden, welcher die Abspaltung der Produkte zuläßt. Für Substanz-Bibliotheken aus der SPOT-Synthese sind dabei Bedingungen zu wählen, die eine Vermischung der Substanzen verhindern, indem sie deren räumliche Trennung aufrechterhalten (Schema 10). In der Peptid-Synthese erfüllt beispielsweise eine einfache Esterbindung zur Membran diese Aufgabe. Nach erfolgter Synthese und Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen wird die trockene Membran gasförmigem Ammoniak ausgesetzt, welcher die Ester zu Amiden aminolysiert. Die Substanzen bleiben adhäsiv auf der Membran gebunden und können nach Ausstanzen der SPOTs beispielsweise in Mikrotiterplatten überführt und dort mit einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. einem wäßrigen Puffer) abgelöst werden.



Schema 10: Verschiedene Möglichkeiten zur räumlich getrennten Behandlung von Syntheseprodukten der SPOT-Synthese.

Für die Peptoid-Synthese sind Linker auf Ester-Basis ungeeignet, da im Verlauf der Synthese Amine in hohen Konzentrationen angewendet werden, die Ester vorzeitig spalten können (vergl. Abschnitt 3.1). Aus diesem Grund konnte nicht auf die für Zellulose beschriebenen Linkersysteme zurückgegriffen werden.^[44,48,59] Es mußte ein geeigneter Linker neu in die SPOT-Synthese eingeführt werden.

Vor dem Hintergrund der Synthese von Peptoiden und der Anwendbarkeit an Zellulosemembranen erschienen vor allem säure- oder photolytisch spaltbare Linker geeignet. Die

Erhaltung der örtlichen Adressierung kann dabei durch verschiedene Maßnahmen gewährleistet werden (vergl. Schema 10):

1. Zur säurekatalysierten Abspaltung muß die Membran entweder Säuredämpfen (z.B. TFA-Dampf) ausgesetzt werden oder die SPOTs müssen vor der Abspaltung in getrennte Gefäße (z.B. in eine Mikrotiterplatte) überführt werden. In beiden Fällen bleiben allerdings Verunreinigungen zurück, wenn Schutzgruppen angewendet werden, die unflüchtige Spaltungsprodukte ergeben (z.B. Trityl).
2. Die Spaltung eines lichtempfindlichen Linkers kann mit einer trockenen Membran lösungsmittelfrei erfolgen, so daß die Substanzen adhäsiv gebunden bleiben. In diesem Fall können alle Schutzgruppen vor der Linkerabspaltung entfernt werden.

Die säurespaltbaren Linker **43** - **46** sind zur Immobilisierung von Carbonsäureamiden in der Festphasensynthese am Harz weit verbreitet (Abb. 13). Sie sind mit TFA spaltbar, wobei die benötigte Konzentration von der jeweiligen Struktur des Linkers abhängt.

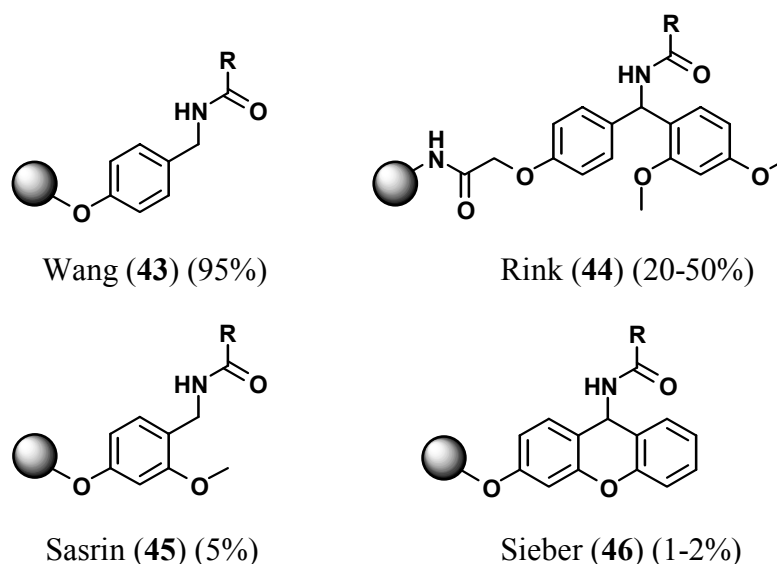
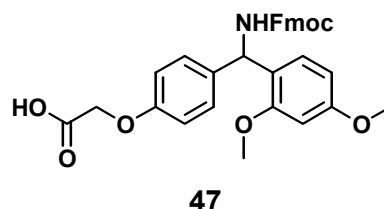


Abb. 13: Säurespaltbare Linker zur Immobilisierung von Carbonsäureamiden ($R\text{-CONH}_2$) an Harzen. In Klammern: TFA-Volumenanteile in CH_2Cl_2 , die zur Spaltung benötigt werden.

Der in der Peptid- und Peptoid-Synthese weitverbreitete Rink-Linker **44** erschien unter bestimmten Voraussetzungen auch für die SPOT-Synthese geeignet zu sein. Das Haupt-Anwendungsgebiet sollte aufgrund der schnellen und vollständigen Abspaltung in der Substanz-Analytik liegen. Zur Synthese umfangreicher Substanz-Bibliotheken ist der Rink-Linker nur geeignet, wenn auf Seitenkettenschutzgruppen, die unflüchtige Spaltungs-Fragmente bewirken (z.B. Trityl, 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl), vollständig verzichtet werden kann.^[124]



Eine Reihe von Aktivierungsbedingungen wurden getestet, um den Linker in Form seines Fmoc-geschützten Derivats **47** möglichst effizient an die aminoderivatisierte Membran zu koppeln. Der Derivatisierungsgrad wurde über die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe spektroskopisch bestimmt (Abb. 14). Interessanterweise zeigt der Vergleich der Kopplungsausbeuten, daß die *in situ* Aktivierung zum Pentafluorphenylester mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) die höchsten Derivatisierungsgrade liefert (Eintrag 4). Möglicherweise führt eine basenvermittelte Hydrolyse im Anschluß an die Aktivierung im Falle des Esters des 1-Hydroxybenzotriazols (HOBt), für den aus der Peptidchemie eine hohe Kopplungseffizienz bekannt ist, zu den beobachteten geringen Werten (Einträge 1 und 2). Diese Annahme würde die Verschlechterung der Kopplungseffizienz bei Basenüberschuß (Eintrag 1) erklären. Auch das *in situ* erzeugte Anhydrid lieferte unbefriedigende Ausbeuten, wahrscheinlich ebenfalls aufgrund von Hydrolyse (Eintrag 3).

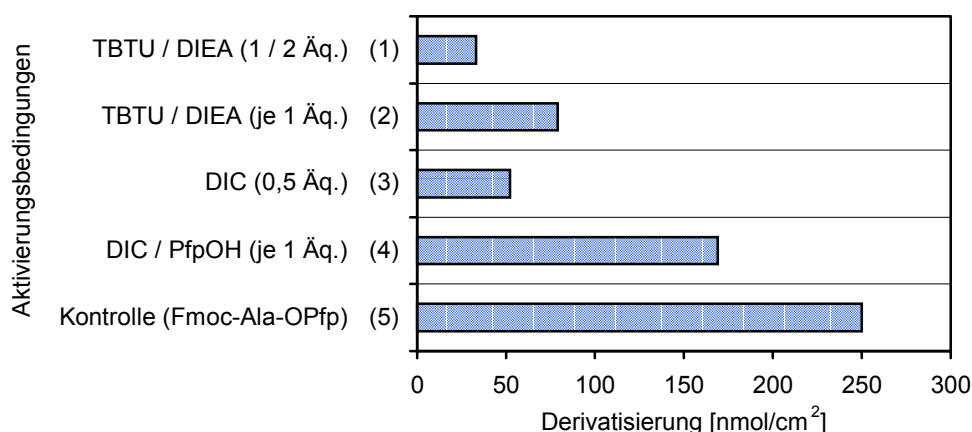


Abb. 14: Untersuchung der Kopplungseffizienz bei Anwendung verschiedener Aktivierungsbedingungen zur Immobilisierung des Rink-Linkers an aminoderivatisierter Zellulose **38**. Lösungen des Fmoc-geschützten Rink-Linkers **47** (0.5 M in NMP) wurden mit den angegebenen Aktivierungsmitteln versetzt, 30 min voraktiviert und mit **38** zur Reaktion gebracht (2 µl; 3 x 15 min).

Der Rink-Linker erwies sich in zahlreichen Experimenten als sehr zuverlässig und ermöglichte eine nebenproduktfreie und vollständige Abspaltung. In dieser Arbeit wurde die die Abspaltung auf zwei Wegen durchgeführt:

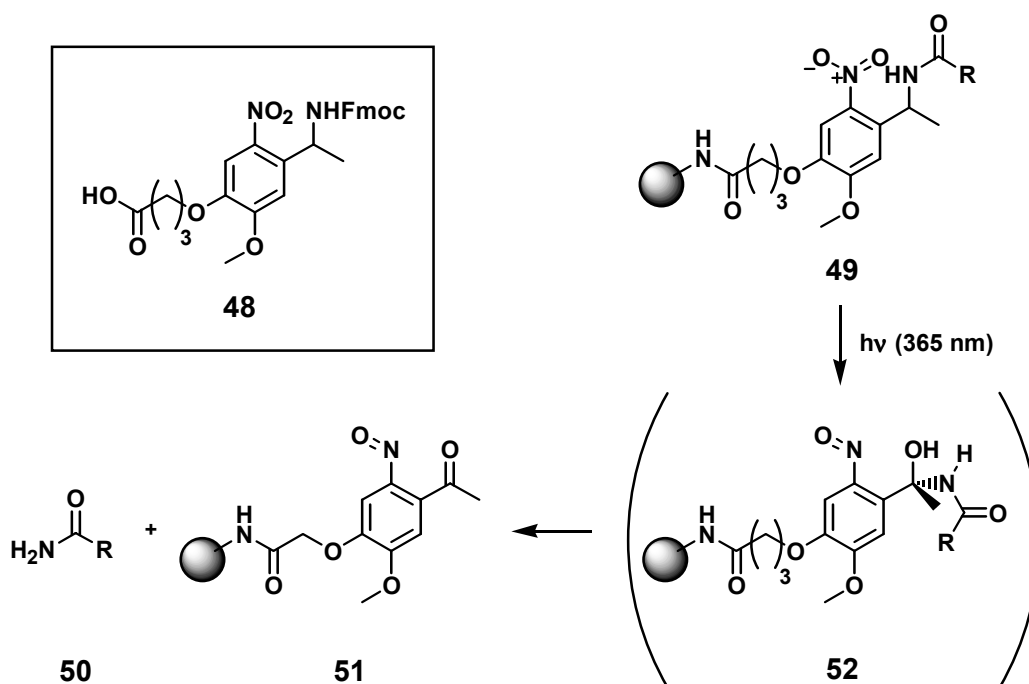
1. Ein SPOT wurde ausgestanzt und in einem Gefäß [z.B. Eppendorf-Reaktionsgefäß (2.0 ml) oder Mikrotiterplatte] mit TFA versetzt (95% in H₂O, 70µl, 15 min). Das Lösungsmittel wurde im Anschluß in einer Vakuumzentrifuge bei 40°C entfernt. Das Syntheseprodukt konnte nun abgelöst und analysiert werden (z.B. in H₂O/CH₃CN-Gemischen).

2. Zur Abspaltung mit gasförmigen Reagenzien wurde die Membran für 30 Minuten in einen Exsiccator über TFA gebracht.^[125] Nach Entfernung der TFA-Dämpfe konnten die SPOTs ausgestanzt und die Substanzen einzeln abgelöst werden.^[124,126]

In zahlreichen Experimenten erwies sich der Rink-Linkers sowohl für die Qualitätskontrolle von Substanz-Bibliotheken als auch bei der Syntheseevaluierung und -optimierung als hervorragend geeignet.

3.2.3 Photolytisch spaltbare Linker in der SPOT-Synthese

Um die Abspaltung säurelabiler Schutzgruppen von der Linkerspaltung zu trennen, darf letzterer erst unter orthogonalen Bedingungen abgespalten werden. Im Bereich der kombinatorischen Synthesen am Harz haben sich für Anforderungen dieser Art photolytisch spaltbare Linkersysteme vom Typ der *ortho*-Nitrobenzylalkohole und -amine bewährt. Mit der Fmoc-geschützten Aminosäure **48** (im folgenden als Photolinker (PL) bezeichnet) steht ein Linker kommerziell zur Verfügung, der bei Bestrahlung mit langwelligem ultraviolettem Licht (365 nm) eine schnelle Spaltung ermöglicht (Schema 11).^[127,128] Nach photolytischer Anregung eines PL-gebundenen Amids **49** oxidiert die Nitrogruppe in einer Radikalreaktions-Kaskade dabei die benachbarte Benzyl-Position durch Übertragung eines Sauerstoffatoms. Das gebildete *N*-Acylhemiaminal **52** reagiert zum Nitrosoaromaten **51** unter Freisetzung des Amids **50**.^[129]



Schema 11: Fmoc-Photolinker **48** und Spaltungsmechanismus.

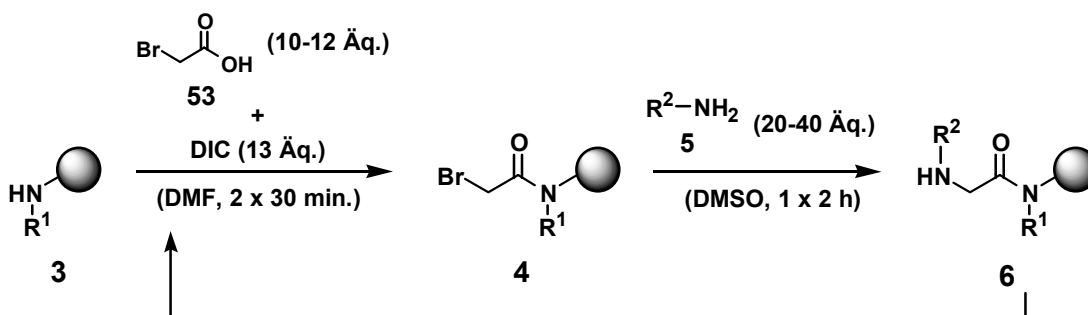
In einer vergleichenden Untersuchung mehrerer Aktivierungsmethoden konnte gezeigt werden, daß der Photolinker-Baustein **48** bei einer Aktivierung mit HATU die besten Kopplungsausbeuten zeigt.^[123] In Versuchen zur lösungsmittelfreien (trockenen) Spaltung

des Linkers unter Wahrung der Ortsadressierung der Substanzen zeigte sich die hervorragende Eignung des Linkers für die SPOT-Synthese. Bei Bestrahlung der gesamten Membran auf einen UV-Leuchttisch bei einer Lichtenergie von 7 mW/cm^2 ist die Abspaltung nach 90-100 Minuten abgeschlossen.^[110,123] Bei Derivatisierungsgraden über 150 nmol/cm^2 bleibt die Abspaltung leider auch bei längeren Belichtungen unvollständig, was auf die starke UV-Absorption des Nitrosoaromaten **51** und die daraus resultierende Abschirmung von in der Membran verborgener Substanz zurückzuführen ist. Um diesem Problem zu begegnen, wurde eine Test-Verbindung vergleichend unter Verwendung einer wesentlich stärkeren UV-Lichtquelle ($340 \text{ mW/cm}^2 \hat{=} \text{ca. } 50\text{-fache Energiedichte}$) abgespalten. Dabei wurde die maximale Abspaltungsausbeute deutlich schneller erreicht (nach 2-10 Minuten) – die theoretisch mögliche Ausbeute konnte jedoch insbesondere bei hohem Derivatisierungsgrad auch hier nicht erreicht werden. Eine Erhöhung der Lichtintensität bewirkt demnach im wesentlichen eine Steigerung der Spaltungsgeschwindigkeit und nur in deutlich geringerem Ausmaß der Spaltungsausbeute. In dieser Arbeit wurde der Photolinker unter Verwendung des UV-Leuchttisches abgespalten.

3.3 Peptoid-Synthese an Zellulose nach der Sub-Monomer-Methode

Die Peptoid-Synthese nach der Sub-Monomer-Methode wurde für Syntheseharze optimiert^[12,104]:

1. Bromacetylierung des *N*-Terminus der wachsenden Oligo-*N*-alkylglycin-Kette **3** mit *in situ* aktivierter Bromessigsäure [10-12 Äq. Bromessigsäure (**53**) ($\hat{=} \text{ca. } 0.6 \text{ M}$ Lösung), 13 Äq. DIC in DMF, 2 x 30 min, 25°C].
2. Nukleophile Substitution des Halogens im Bromacetamid **4** mit einem primären Amin **5** in hohem Überschuß (20-40 Äq. in DMSO (ca. 1-2 M), 1 x 2 h, 25°C) führt zum *N*-Alkylglycin Baustein **6**.



Die Verwendung von Chloressigsäure führte bei anschließender Reaktion mit einfachen Alkylaminen ebenfalls zu guten Ergebnissen, während Aniline nur einen unvollständigen Halogenaustausch bewirken. Iodessigsäure lieferte vergleichbare Ergebnisse wie Bromessigsäure.^[12] Interessanterweise behindert die Zugabe des für die Kopplung von Aminosäuren äußerst günstigen 1-Hydroxybenzotriazols die Bromacetylierung erheblich.^[12] Der hohe Aminüberschuß in den Substitutionsreaktionen wurde als notwendig beschrieben. Dabei sollte das Amin in wenigstens molarer Konzentration eingesetzt werden.^[104]

Für die Synthese müssen einige Seitenkettenfunktionalitäten mit geeigneten Schutzgruppen versehen werden. Für aliphatische Alkohole wurde beispielsweise die Triisopropylsilyl-Gruppe vorgeschlagen.^[18] Derart geschützte Bausteine lassen sich in einer Stufe aus kommerziell erhältlichen Aminoalkoholen gewinnen. Amino-, Carboxyl- und Thiol-funktionalitäten in der Seitenkette werden zweckmäßigerweise analog zur Peptid-Synthese mit der Boc-, *tert*-Butyl- bzw. Tritylgruppe geschützt. Auch für die Guanidin-Gruppe bietet sich die Verwendung von Boc-Gruppen an. T. Uno *et al.* beschrieben jedoch Schwierigkeiten bei der Synthese des dem Arginin analogen Sub-Monomer-Bausteins, so daß sie die Synthese eines 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl geschützten Bausteins vorschlugen.^[130] Ohne Schutzgruppe wurden Indol-, Imidazol- und Phenol-Strukturelemente eingesetzt.^[12]

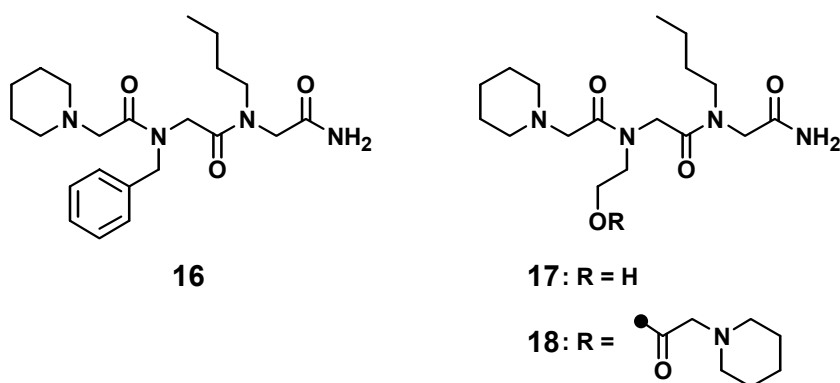
3.3.1 Aktivierung von Bromessigsäure

3.3.1.1 Bromacetylierung von N-Alkyglycinen unter Bedingungen der SPOT-Synthese

A) Überlegungen zu geeigneten Modellverbindungen

Bei der Auswahl von Modell-Verbindungen zur Untersuchung der Peptoid-Synthese an Zellulose wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt:

1. Die Modellverbindungen sollten einfach aufgebaut sein. Erwartete Probleme bei der Synthese sollten vermieden werden.
2. Die verwendeten Amine sollten sich für die SPOT-Synthese eignen, d.h. in hoher Konzentration in NMP oder DMSO löslich sowie nicht zu flüchtig sein, um eine ausreichende Reaktionszeit zu gewährleisten.
3. Die Verbindungen sollten sich gut und schnell analysieren lassen.
4. Die Verbindungen sollten in einer kurzen Synthese zugänglich sein.



Nach diesen Kriterien wurden die Tripeptide **16** und **17** als Modellverbindungen ausgewählt. Sie erfüllen die obengenannten Bedingungen in folgender Weise:

- zu 1. Der weitgehende Verzicht auf reaktive funktionelle Gruppen in den Seitenketten, sowie die Verwendung von α -unverzweigten Aminbausteinen ließen eine unproblematische Synthese erwarten. Die Verwendung von Piperidin als

letztem Baustein bewirkt ein „*Endcapping*“, das das Risiko von Nebenreaktionen nach der Synthese bzw. bei der Abspaltung verringert. Zusätzlich erhöht die tertiäre Aminofunktion die Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln, was die Analyse erleichtert. Die Hydroxyfunktion in **17** wurde als Sonde vorgesehen, um die Produktausbeuten mit dem potentiell gebildeten seitenkettenacylierten Produkt **18** vergleichen zu können und so ein Maß für die *N/O*-Selektivität des Acylierungsreagenzes zu bekommen.

- zu 2. Die zugrunde liegenden Amine (*n*-Butylamin, Benzylamin, Ethanolamin und Piperidin) besitzen ausreichend hohe Siedepunkte (77°C, 184°C, 170°C, 105°C) und sind in jedem Verhältnis mit NMP und DMSO mischbar.
- zu 3. Die Analyse sollte im wesentlichen mittels HPLC und daran gekoppelter ESI-Massenspektrometrie (HPLC-MS) erfolgen, um eine schnelle und äußerst aussagekräftige Analyse der Produkte durchführen zu können. Die Trimere **16** und **17** besitzen eine mittlere Polarität, was bereits im Rahmen eines Routinechromatogramms eine hohe Trennschärfe an einem C18-Umkehrphasen-Trennmedium gewährleistet. Die Molekülmassen der Verbindungen (**16**: $M = 402.5 \text{ g/mol}$; **17**: $M = 356.5 \text{ g/mol}$) liegen in einem mit dem verwendeten Massenspektrometer problemlos detektierbaren Bereich (Nachweisgrenze $m/z < 50$).
- zu 4. Aufgrund ihrer kurzen Synthese (sechs Syntheseschritte) und der geringeren Zahl potentiell unvollständiger Reaktionsschritte wurden hier Trimere ausgewählt, wengleich G.M. Figliozzi *et al.* für den Test von Aminen auf ihre Eignung in der Peptoidsynthese Pentamere vorschlugen.^[104]

B) Synthese der Modellverbindung 16 am Harz

Zu Beginn wurde das Tripeptoid **16** nach R.N. Zuckermann *et al.*^[12] am Syntheseharz hergestellt (56% Ausbeute nach Reinigung mittels präparativer HPLC), um die Synthese an Zellulose verfolgen und quantifizieren zu können. Aus genau eingewogenen Proben wurde eine Eichkurve erstellt, anhand der sich aus der Peakfläche des Signals von **16** im UV-Detektor des HPLC-Systems die injizierte Menge bestimmen läßt (Abb. 15). Die Eichkurve ließ sich gut durch eine quadratische Funktion annähern (durchgehende Linie). Im häufig verwendeten Bereich $\leq 25 \text{ nmol/Injektion}$ wird die Ausbeutebestimmung durch den annähernd linearen Zusammenhang zwischen Injektionsmenge und Peakfläche erleichtert (unterbrochene Linie; $5.99 \cdot 10^5 \text{ Flächeneinheiten/nmol injizierte Substanz}$).

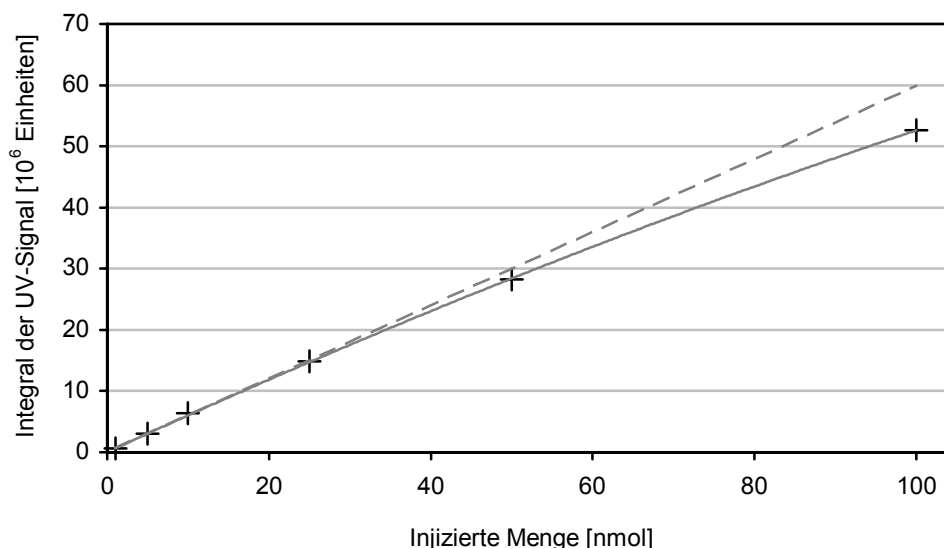


Abb. 15: Auftragung der Peakfläche des UV-Signals von **16** in einer Serie von HPLC-Läufen in Abhängigkeit von der injizierten Menge. Die Ausgleichskurven wurden quadratisch (durchgehende Linie) sowie für Injektionsmengen ≤ 25 nmol linear (unterbrochene Linie) angenähert (Meßwerte für HP-1100 HPLC an Finnigan LCQ, Software Ver. 1.1).

C) Synthese geeigneter Bromacetylierungsmittel

Die Bedingungen der Peptoid-Synthese am Harz sollten nun auf die SPOT-Synthese übertragen werden. Im Unterschied zur Harz-Synthese, bei der eine *in situ* Aktivierung von Bromessigsäure in Anwesenheit der festphasengebundenen Substanz möglich ist, ist hier eine Bereitstellung der Carbonsäure in voraktivierter Form notwendig. Bei Vorversuchen wurde deutlich, daß sich die am Harz übliche Methode der Säureaktivierung nur mit Einschränkungen für die SPOT-Synthese eignet: Wie bei jeder Carbonsäure bildet sich nach Zugabe eines Äquivalents DIC zu einer 0.6 M Lösung von Bromessigsäure in NMP nach etwa 10 Minuten ein kristalliner Niederschlag von Diisopropylharnstoff. Dieser behindert zwar die manuelle SPOT-Synthese nur wenig, bei der automatischen Pipettierung ist allerdings sicher mit Problemen zu rechnen (Verschluß der Pipettierneedle).

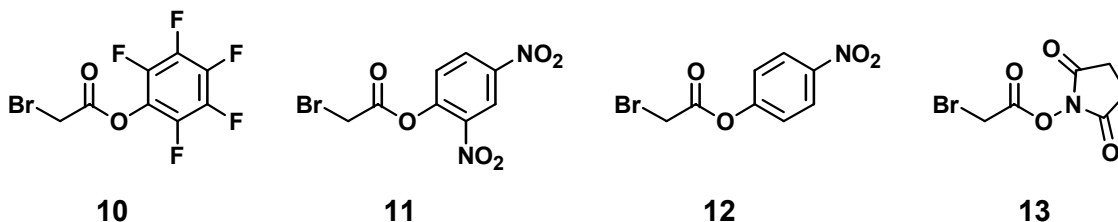
Es mußte daher eine alternative Aktivierung für Bromessigsäure gefunden werden. Dabei sollte berücksichtigt werden, daß eine schützende Derivatisierung aller freien Hydroxyfunktionen des Zellulosesträgers (*Capping*) nicht möglich ist, ohne günstige Membraneigenschaften wie z.B. Benetzbarkeit oder Flexibilität zu verändern. Es galt daher ein gegenüber Aminen ausreichend reaktives Reagenz zu finden, das nicht mit freien Membran-Hydroxyfunktionen reagiert, d.h. ausreichend *N/O*-selektiv ist. So ließe sich nicht nur die Bildung störender Nebensequenzen vermeiden, es könnte auch auf den Schutz von Hydroxyfunktionen in den Peptoid-Seitenketten verzichtet werden.

Die Carbonsäure-Aktivierung mit Carbodiimiden führt in Abwesenheit von Nucleophilen schnell zu Bildung des entsprechenden Anhydrids.^[1] Eine höhere *N/O*-Selektivität sollten die weniger reaktiven Aktivester besitzen. Dabei ist die Reaktivität der verschiedenen Aktivester in weiten Grenzen durch die Wahl der zugrunde liegenden Hydroxy-Verbindung

(Alkohol/Phenol) bestimmbar. Der Pentafluorphenylester der Essigsäure wurde beispielsweise von L. Kisfaludy *et al.* als Acetylierungsmittel mit hoher *N/O*-Selektivität selbst bei einer Verwendung des Aktivesters in dreifachem Überschuß beschrieben.^[131] Erst die Zugabe einer tertiären Base ermöglicht die *O*-Acylierung.

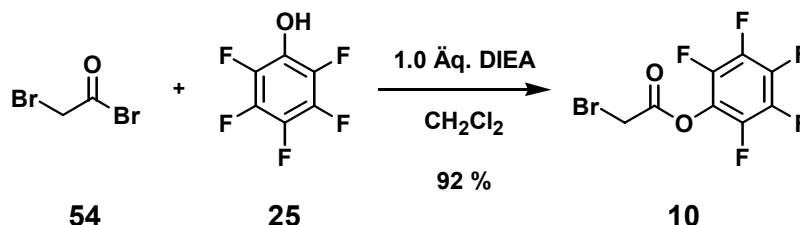
Aktivester können isoliert eingesetzt oder *in situ* (z.B. mit TBTU, HATU) erzeugt werden. In dieser Arbeit sollten eine Reihe von Aktivestern synthetisiert, isoliert und anschließend getestet werden.

Die folgenden Derivate wurden dazu ausgewählt:



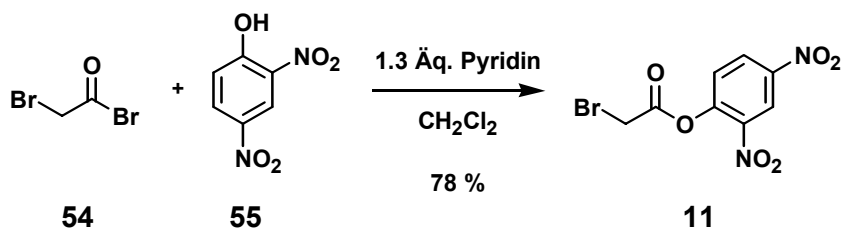
Synthese von Bromessigsäurepentafluorphenylester (10):

Mit Pentafluorphenol (**25**) ließ sich Bromessigsäure ausgehend vom Säurebromid **54** zum flüssigen Bromessigsäurepentafluorphenylester (**10**) umsetzen. Der Ester wurde in 92% Ausbeute analysenrein erhalten [NMR (¹H, ¹³C, ¹⁹F); IR; Elementaranalyse]. Anhand von ¹⁹F-NMR konnte ein Restgehalt von Pentafluorphenol von < 3 Mol% bestimmt werden. Der Pentafluorphenylester **10** wurde bislang nicht in isolierter Form beschrieben, allerdings wurde bereits von einer *in situ* Aktivierung der Bromessigsäure mit DCC unter Zusatz von Pentafluorphenol berichtet.^[132]



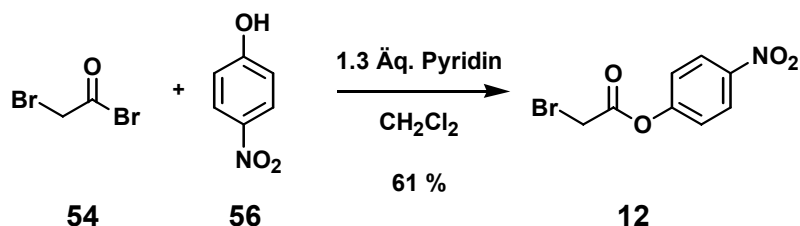
Synthese von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (11):

2,4-Dinitrophenol (**55**) ließ sich in 78% Ausbeute zum gut kristallisierenden Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) bromoacetylieren. Die schwächere Base Pyridin führte dabei verglichen mit dem zur Synthese von **10** verwendeten DIEA zu höheren Ausbeuten. Die erhaltene Substanz wurde vollständig charakterisiert [Schmp.; NMR (¹H, ¹³C); IR; Elementaranalyse]. In der Literatur wurde zwar von einer Verwendung von **11** berichtet, Angaben zu Synthese und Analyse der Verbindung wurden dort jedoch nicht gemacht.^[133]



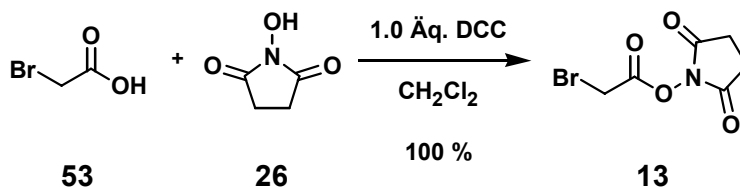
Synthese von Bromessigsäure-4-nitrophenylester (12):

Der Bromessigsäure-4-nitrophenylester (**12**) wurde analog zum 2,4-Dinitrophenylester **11** durch Bromacetylierung von 4-Nitrophenol (**56**) in 61% Ausbeute als kristalline Substanz erhalten. Die analytischen Daten (Schmp.; ^1H - und ^{13}C -NMR) stimmten mit der Literatur überein.^[134]



Synthese von Bromessigsäure-N-succinimidylester (13):

Die Synthese des Esters **13** erfolgte aus Bromessigsäure (**53**) und *N*-Hydroxysuccinimid (**26**) mit Dicyclohexylcarbodiimid in quantitativer Ausbeute nach Lit.^[135,136]



D) SPOT-Synthese der Modellverbindung 16

Im Unterschied zur Synthese am Harz kann die Reaktionszeit bei der SPOT-Synthese nicht frei gewählt werden. Sie wird durch die Physikochemie der Oberfläche sowie die Verdampfung des Lösungsmittels und der Reagenzien bestimmt. Unter der Annahme, daß die Reaktion mit dem Verdampfen der Lösungsmittel zum Stillstand kommt, beträgt die Reaktionszeit bei Lösungen in DMSO oder NMP typischerweise 10-15 Minuten pro Kopplung. Eine längere Reaktionszeit kann durch Mehrfachkopplungen erreicht werden. In Anlehnung an die Bedingungen der SPOT-Synthese von Peptiden sollten die Acylierungen als Doppelkopplungen erfolgen (2 x 15 min; Lösungsmittel: NMP). Im Halogen-Substitutionsschritt sollte eine Dreifachkopplung durchgeführt werden.

Die SPOT-Synthese des Tripeptoids **16** an Rink-Linker-derivatisierter Zellulose lieferte unter initialer Verwendung einer 1 M Lösung von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) in NMP das gewünschte Produkt in überraschend hoher Reinheit (95% nach HPLC) und Ausbeute (73%; Abb. 16). Die Halogensubstitutionen wurden zunächst durch Inkubation der gesamten Membran mit Amin-Lösungen (*n*-Butylamin, Benzylamin, Piperidin; 5 M in NMP) erreicht.

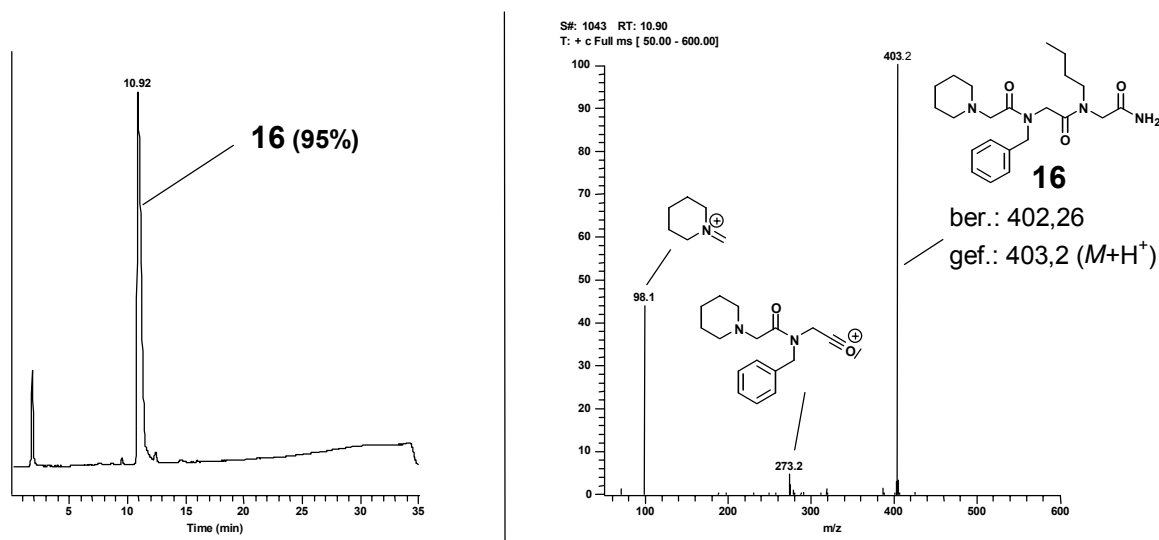
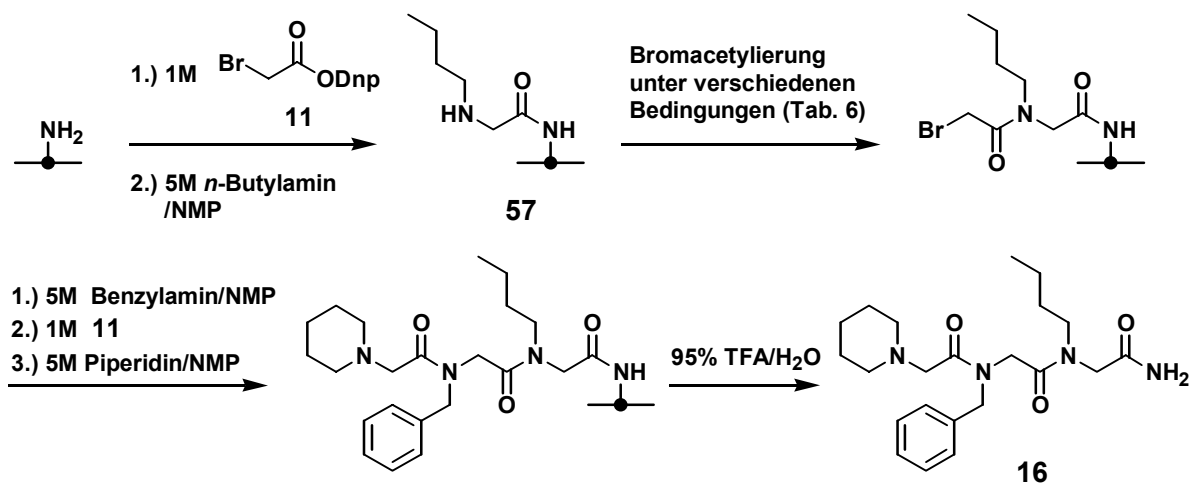


Abb. 16: HPLC-UV-Spur (220 nm, links) und ESI-Massenspektrum (rechts) des Rohproduktes einer Synthese von **16** an Zellulose. Es wurden 10% der Substanz, die von einem SPOT (0.23 cm²) abgespalten wurde, zur HPLC injiziert (ca. 30 nmol).

Die zuvor synthetisierten Bromacetylierungsmittel wurden nun vergleichend zur Synthese des Tripeptoids **16** eingesetzt. Dabei wurden die Acylierungsmittel beim Aufbau des zentralen Bausteins variiert, während bei den anderen Acylierungen der bereits erfolgreich eingesetzte 2,4-Dinitrophenylester **11** verwendet wurde, um hier Nebenprodukte zu vermeiden. In einer parallelen Synthese (10 SPOTs) wurde das *N*-Butylglycin **57** zunächst an Rink-Linker-derivatisierter Zellulose synthetisiert. In der anschließenden Bromacetylierung wurden die Acylierungsmittel variiert und jeweils mit und ohne Zusatz von 2,6-Dimethylpyridin als Hilfsbase eingesetzt. Zur Bromsubstitution wurde anstelle der Reagenzienpipettierung die gesamte Membran mit den entsprechenden Amin-Lösungen inkubiert (5 M in NMP, 30 min). Die SPOTs wurden ausgestanzt und einzeln mit Trifluoressigsäure behandelt (95% in H₂O, 20 min). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden die Produkte mittels HPLC-MS untersucht (Tab. 6).

Der Vergleich zeigt, daß sowohl die höchsten Reinheiten, als auch die höchsten Ausbeuten bei der Verwendung von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) erhalten wurden (Einträge 1 und 6). Bei den übrigen Aktivierungen wurde eine geringere Produktqualität erreicht, wobei die Reinheiten, die mit dem *in situ* erzeugten Anhydrid sowie dem Pentafluorphenylester **10** erreicht wurden, nur geringfügig hinter denen des 2,4-Dinitrophenylesters zurücktreten (Einträge 2, 3, 7 und 8). Für die unerwartet niedrigen Ausbeuten des reaktiven Bromessigsäureanhydrids verglichen mit dem Aktivester **11** werden

Nebenreaktionen wie Hydrolyse oder Reaktionen mit der Zellulosemembran als besondere Bedingungen der SPOT-Synthese verantwortlich gemacht.



Tab. 6: Synthese von **16** unter Anwendung verschiedener Bromacetylierungsbedingungen. Bei der Bromacetylierung des Monomers **57** wurden die tabellierte Bedingungen angewendet, alle übrigen Acylierungen wurden mit **11** durchgeführt (jeweils 1 M in NMP).

		2,6-Dimethylpyridin [M in NMP]	Reinheit ¹⁾ [%]	Ausbeute ²⁾ [%]
1 ^{3,4)}	-ODnp (11)	-	95	73
2	-OH / DIC ⁵⁾	-	88	67
3	-OPfp (10)	-	87	65
4	-ONSu (13)	-	36	13
5	-ONp (12)	-	14	4
6 ³⁾	-ODnp (11)	1	94	75
7	-OH / DIC ⁵⁾	2	80	65
8	-OPfp (10)	1	84	65
9	-ONSu (13)	1	55	19
10	-ONp (12)	1	13	3

¹⁾ Nach HPLC, 220 nm; ²⁾ Basierend auf einem Vergleich der erhaltenen Menge **16** (bestimmt durch quantitative Auswertung der UV-Absorption) mit dem Derivatisierungsgrad; ³⁾ Mittelwert aus zwei Synthesen; ⁴⁾ HPLC-MS dazu; Abb. 16; ⁵⁾ 2 M Br-CH₂COOH, 1 M DIC.

Interessante Resultate brachte die Auswertung der Reaktionsprodukte bei der Acylierung mit Bromessigsäure-4-nitrophenylester (**12**) (Einträge 5 und 10, sowie Abb. 17): Neben der nur in geringem Maße beobachteten gewünschten Acylierungsreaktion (Pfad A) wurden zwei Produkte mit $M = 277$ g/mol (46% bzw. 50%; ohne bzw. mit Basenzusatz) und $M = 255$ g/mol (40% bzw. 37%; ohne bzw. mit Basenzusatz) beobachtet. Die Massen können dem Diamid **60** sowie dem Dipeptoid **61** zugeordnet werden. Deren Bildung lässt sich durch die geringere Reaktivität von **12** verglichen mit den anderen verwendeten Acylierungsmitteln erklären. Anstelle der *N*-Acylierung tritt hier offenbar *N*-Alkylierung ein

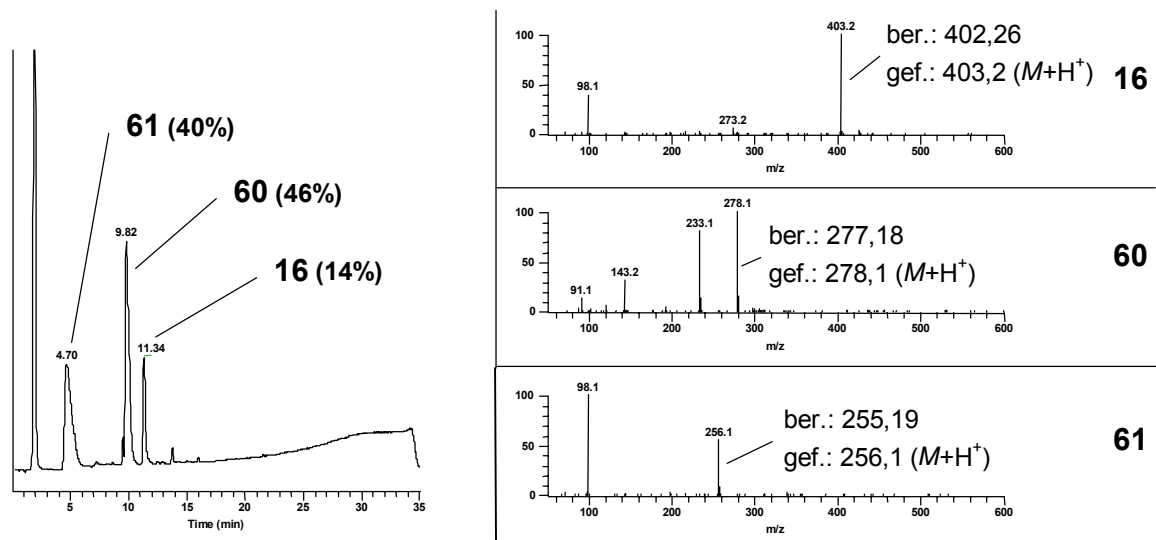
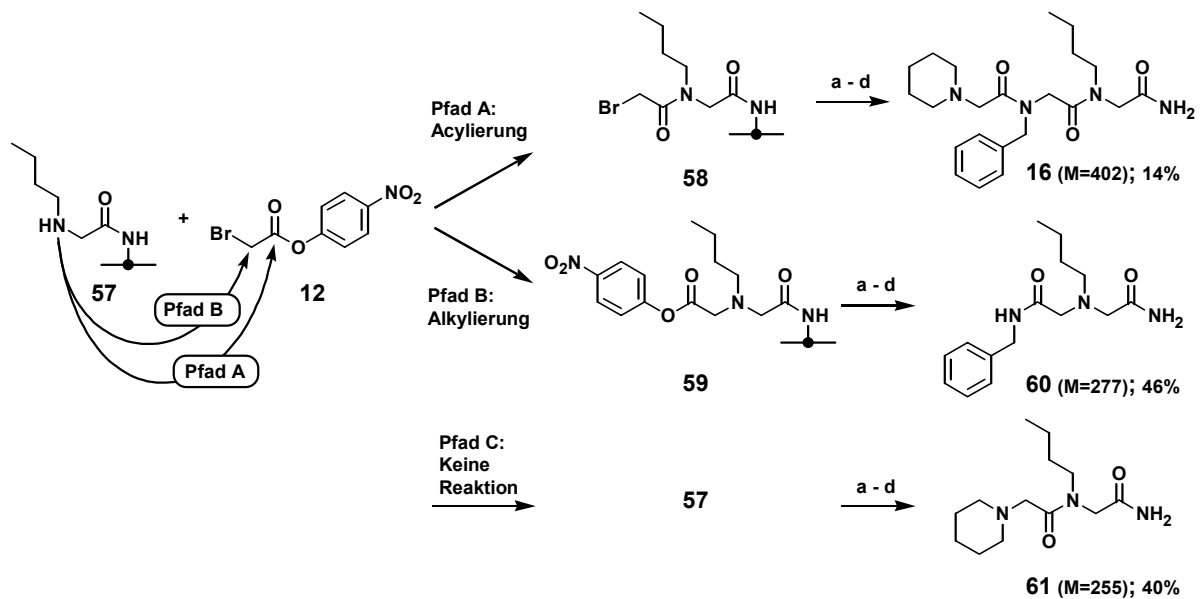


Abb. 17: Oben: Nebenreaktionen und -produkte beim Versuch der Bromacetylierung des membran-gebundenen Monomers **57** mit Bromessigsäure-4-nitrophenylester (**12**). **a**) Benzylamin (5 M in NMP, 30 min), **b**) Br-CH₂-COODnp (1 M in NMP, 2 x 15 min), **c**) Piperidin (5 M in NMP, 30 min), **d**) TFA (95% in H₂O, 20 min). Unten: HPLC-UV-Spur (220 nm, links) und ESI-Massenspektren (rechts) der Reaktionsprodukte. Es wurden 20% der Substanz, die von einem SPOT (0.23 cm²) abgespalten wurde, analysiert (ca. 60 nmol).

(Pfad B). Der intermediär gebildete membrangebundene Aktivester **59** reagiert mit Benzylamin zum Diamid **60**, welches aus der anschließenden Acylierung unverändert hervorgeht. Dieser Reaktionsweg wird durch die Beobachtung gestützt, daß sich die Membran bei der Inkubation mit Benzylamin durch das aus **59** freigesetzte, gelbe 4-Nitrophenol eingefärbte, während benachbarte SPOTs, die zuvor mit Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) behandelt wurden, farblos blieben, da hier kein entsprechender Reaktionsweg beschriftet wurde. Das dritte Reaktionsprodukt **61** entsteht, wenn das membrangebundene Monomer **57** überhaupt nicht mit **12** reagiert (Pfad 3). In diesem Fall wird in den anschließenden Reaktionen das Dipeptoid **61** aufgebaut.

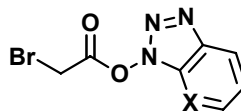
Diese umgekehrte Reaktivität des Bromessigsäure-4-nitrophenylesters (**12**) wurde nicht bei Reaktionen mit primären Aminen beschrieben.^[134,137] Allerdings beobachteten R.D. Elliott *et al.* bei der Verwendung von **12** einen Selektivitätsverlust beim Übergang von der Bromacetylierung eines primären Amins (5'-Amino-5'-deoxythymidin) zum *N*-Methyl-analogen sekundären Amin (5'-Deoxy-5'-methylaminothymidin), was sich mit den hier gemachten Beobachtungen deckt.^[138]

Bromessigsäure-*N*-succinimidylester (**13**) ist in seiner Reaktivität zwischen dem 4-Nitrophenylester und den aktiveren Estern **10** und **11** einzuordnen (Einträge 4 und 9). Wie beim 4-Nitrophenylester reichte die Aktivierung nicht aus, um eine vollständige Acylierung zu bewirken. Neben dem Dimer **61** (52% bzw. 26% mit bzw. ohne Base) wurden hier allerdings nur geringe Mengen *N*-Alkylierungs-Produkt **60** beobachtet (5% mit und ohne Base).

Die Verwendung der Base 2,6-Dimethylpyridin bewirkt lediglich im Fall der unvollständigen Acylierung mit dem *N*-Succinimidylester **13** eine leichte Verbesserung des Ergebnisses, in den übrigen Fällen hat sie keinen vorteiligen Effekt.

E) Versuch der Synthese zusätzlicher Aktivderivate der Bromessigsäure

Inspiziert durch die positiven Ergebnisse mit Aktivestern der Bromessigsäure sollten in die folgenden Untersuchungen zusätzlich die Aktivester **14** und **15** einbezogen werden:



14: X = CH

15: X = N

Die Ester des 1-Hydroxybenzotriazols (HOBt, **23**) und 7-Aza-1-hydroxybenzotriazols (HOAt, **24**) finden in der Peptidchemie eine breite Anwendung.^[1] Ihre Ester mit Bromessigsäure wurden bislang nicht in isolierter Form beschrieben. Zudem berichteten R.N. Zuckermann *et al.* einen nachteiligen Effekt bei der Verwendung von HOBt als Additiv in der Sub-Monomer Peptoid-Synthese.^[12] Auch bei einer Carbodiimid-vermittelten Bromacetylierung eines Anilins wurde unter HOBt-Zusatz das Auftreten unerwünschter Nebenprodukte beschrieben^[139], daher waren Schwierigkeiten bei der Synthese oder eine

unzureichende Reaktivität der Aktivspezies zu erwarten. Um das Potential der beiden Aktivester abzuschätzen, sollte zunächst versucht werden, das Test-Tripeptoid **16**, wie in Abschnitt 3.3.1.1 beschrieben, mit den *in situ*-generierten Aktivestern zu synthetisieren:

HOBt (23): Analog der in der Literatur beschriebenen Probleme lieferten die Umsetzungen jeweils äquimolarer Mengen von Bromessigsäure und (1) HOBt/DIC sowie (2) TBTU/DIEA in NMP das Tripeptoid **16** nur in geringen Produktausbeuten (3% bzw. 6% Reinheit). Das Hauptprodukt der Reaktion war in beiden Fällen das Dimer **61**, was auf eine unvollständige Acylierung schließen ließ. Da für Ester des HOBt eine höhere Reaktivität verglichen mit den Phenylestern **10** und **11** und damit eine vollständige Umsetzung erwartet wurde, wurde das Vorliegen von Nebenprodukten vermutet, die jedoch nicht identifiziert wurden.

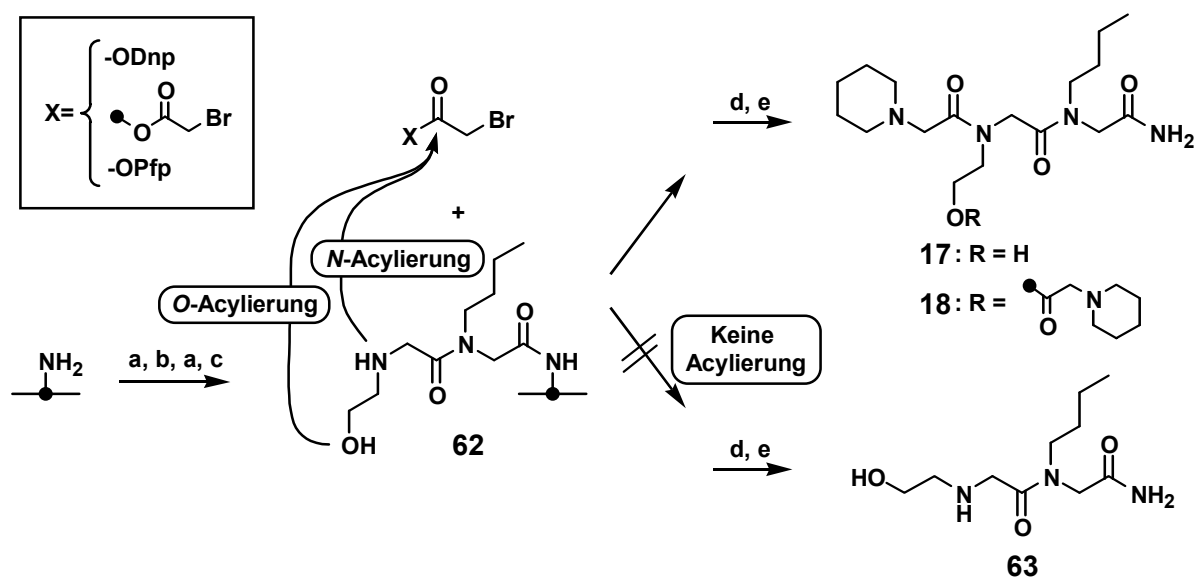
HOAt (24): Wie schon im Falle des HOBt-Esters **14** sollte die Reaktivität des Aza-analogen Aktivesters **15**, für den in Analogie zur Peptidchemie eine höherer Reaktivität erwartet wurde^[140], zunächst mittels *in situ* Aktivierung von Bromessigsäure in der Synthese der Modellverbindung **16** untersucht werden. Die Verwendung von jeweils äquimolaren Mischungen aus Bromessigsäure und (1) HOAt/DIC sowie (2) HATU/DIEA führte zur Synthese von **16** in Ausbeuten von 65% bzw. 42%. Nebenprodukt war in beiden Fällen das Dipeptoid **61**, was auch hier auf eine unvollständige Reaktion hindeutete. Wie erwartet wurden bessere Ergebnisse mit dem 7-Aza-Analogen des HOBt erreicht, die Ergebnisse blieben allerdings deutlich hinter den der bereits erfolgreich eingesetzten Ester **10** und **11** zurück. Es wurden daher auch hier keine weiteren Versuche unternommen.

Zusammen mit den in der Literatur beschriebenen Problemen bei Bromacetylierungen unter Zusatz von HOBt^[12,139] bzw. HOAt zeigten die hier durchgeführten Untersuchungen, daß die herausragende Rolle der beiden Verbindungen in der Peptidchemie nicht auf die Peptoidchemie übertragen werden kann. Zu bedenken ist, daß Bromessigsäure, wie die höhere Acidität verglichen mit α -Aminosäuren zeigt, eine elektronenärmere Carboxylfunktion besitzt und somit eine reaktivere Carbonsäure darstellt. Sie muß folglich weniger stark aktiviert werden, um vergleichbare Reaktivitäten zu erreichen. Ihre Ester mit HOBt und HOAt sind daher möglicherweise zu reaktiv und reagieren vorzeitig in Nebenreaktionen wie der Acylierung des aus DIC gebildeten Harnstoffs, der DIEA-vermittelten Hydrolyse oder durch Alkylierung von HOBt/HOAt zu unreaktiven Spezies ab.

3.3.1.2 Untersuchungen zur N/O-Selektivität verschiedener Bromacetylierungsmittel

A) Überlegungen zum Modellsystem

Nachdem nun mit dem Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) ein für die SPOT-Synthese geeignetes Bromacetylierungsmittel zur Verfügung stand, schloß sich eine Untersuchung zur N/O-Selektivität an. Um die O-Acylierung sowohl von Zellulose- als auch von Seitenketten-Hydroxyfunktionen zu bestimmen, sollte exemplarisch während der Synthese des Tripeptoids **17** der Anteil an Veresterung zu **18** im Verhältnis zum Zielmolekül **17** ermittelt werden (Schema 12).

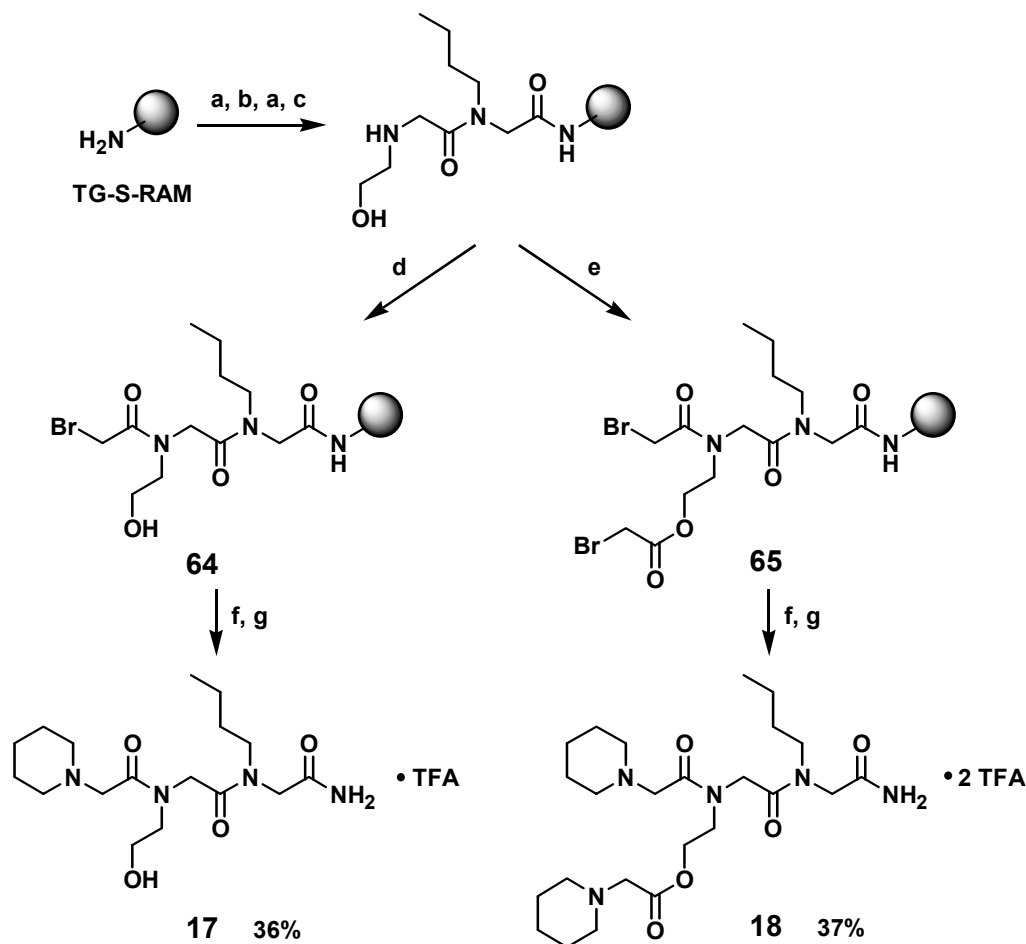


Schema 12: Bestimmung der N/O-Selektivität verschiedener Bromacetylierungsmittel durch Bestimmung des Verhältnisses von **17** zu **18**. Bei unvollständiger Acylierung wird **63** als Nebenprodukt beobachtet. **a)** Br-CH₂-COODnp (1.0 M in NMP, 2 x 15 min); **b)** n-Butylamin (5 M in NMP, 30 min); **c)** Ethanolamin (5 M in NMP, 30 min); **d)** Piperidin (5 M in NMP, 30 min); **e)** TFA (95% in H₂O, 20 min).

B) Synthese der Modellverbindungen **17** und **18** am Harz

Da die Reaktionsprodukte nach der Abspaltung von Zellulose quantifiziert werden sollten, wurden zunächst, wie schon bei der Untersuchung des Modell-Trimeren **16**, die Vergleichssubstanzen **17** und **18** am Harz hergestellt (Schema 13). Um bei der Synthese des Hydroxy-Tripeptoids **17** eine Veresterung der Seitenkette zu verhindern, wurde in der dritten Acylierung zum Dipeptoid **64** der Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) in nur 1.5 Äq. verwendet (Einfachkopplung, 20 min). Im Gegensatz dazu mußte die Veresterung der Seitenketten-Hydroxyfunktion bei der Synthese von **18** möglichst vollständig erfolgen. Dazu wurde die dritte Acylierung zum doppelt bromacetylierten Dipeptoid **65** mit Bromessigsäureanhydrid in einem unpolaren Lösungsmittel (CH₂Cl₂ statt DMF) sowie unter Zusatz eines großen Überschusses an Base (40 Äq. 2,6-Dimethylpyridin) durchgeführt (Veresterungseffizienz: 96% verestertes Produkt). Man erhielt die Trimeren in 36% (**17**) und

37% (**18**) Ausbeute nach Reinigung mittels präparativer HPLC. Da bei der Synthese des Hydroxy-Peptoids **17** unter Verwendung von nur 1.5 Äq. Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) weder Abbruchsequenzen noch das veresterte Produkt **18** als Nebenprodukte gebildet wurden (beide < 1%) ergab sich nicht nur ein Hinweis auf die gute *N/O*-Selektivität dieses Aktivesters sondern es zeigte sich auch seine hohe Reaktivität.



Schema 13: Harz-Synthese von **17** und **18**. **a)** 20 Äq. Br-CH₂-COOH, 10 Äq. DIC, 10 Äq. 2,6-Dimethylpyridin (DMF, 1 x 15 min); **b)** 150 Äq. *n*-Butylamin (DMF, 1 x 30 min); **c)** 150 Äq. Ethanolamin (DMF, 1 x 30 min); **d)** 1.5 Äq. Br-CH₂-COONp (DMF, 1 x 20 min); **e)** 20 Äq. Br-CH₂-COOH, 10 Äq. DIC, 40 Äq. 2,6-Dimethylpyridin (CH₂Cl₂, 1 x 20 min); **f)** 150 Äq. Piperidin (DMF, 1 x 30 min); **g)** TFA (95% in H₂O, 30 min).

Im Anschluß wurden die UV-Absorptionen mittels HPLC/UV-Detektion bestimmt. Es zeigte sich, daß die Absorptionen bei Messungen von Substanzmengen unter 25 nmol/Injektion annähernd linear von der injizierten Menge abhängen. Sie betragen $3.09 \cdot 10^5$ (**16**) bzw. $3.13 \cdot 10^5$ (**17**) Flächeneinheiten/nmol injizierte Substanz (Software: Finnigan Navigator Ver 1.1 an Hewlett Packard 1100 HPLC). Es zeigte sich, daß sich die Absorption des Esters **18** von derjenigen des Alkohols **17** kaum unterscheidet. Dies ist auf die verglichen mit Amidbindungen geringere UV-Absorption von Esterbindungen bei 220 nm zurückzuführen.

Die Verwendung von 2,6-Dimethylpyridin als Base führte in den meisten Fällen wie erwartet zu einer Verringerung der Selektivität der einzelnen Acylierungsmittel. Dabei erwies sich das aus Bromessigsäure mit DIC gewonnene Anhydrid deutlich empfindlicher gegenüber Basenzusatz als die Aktivester: die Ausbeute des Ester-Nebenproduktes stieg von 10% auf 32% (Einträge 2 und 5) im Fall des Anhydrids während bei den Aktivestern eine Steigerung von 6% auf 11% (**11**, Einträge 1 und 4) bzw. keine Steigerung (**10**, Einträge 3 und 6) beobachtet wurde.

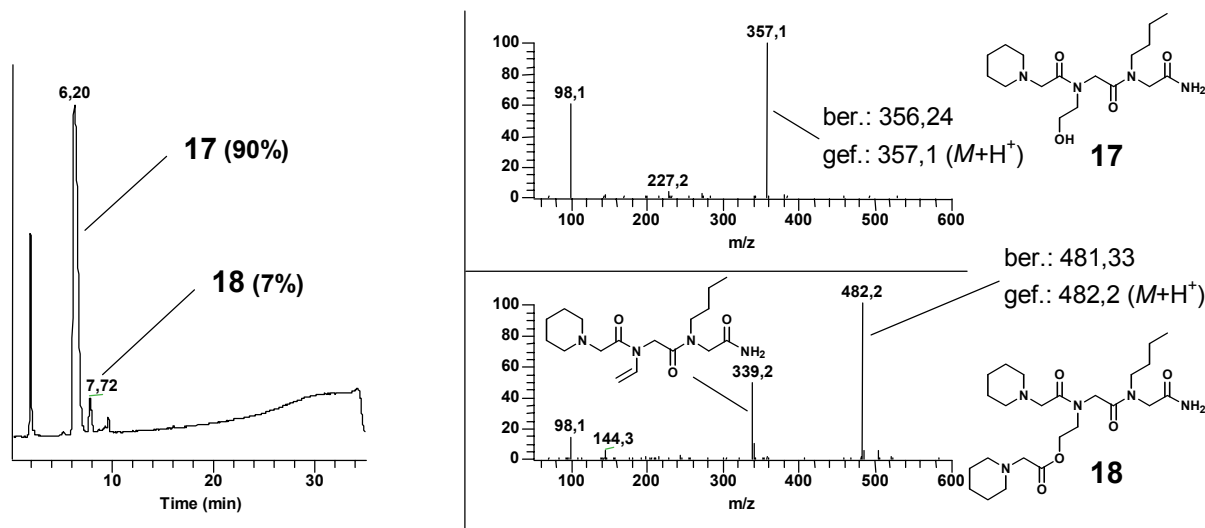


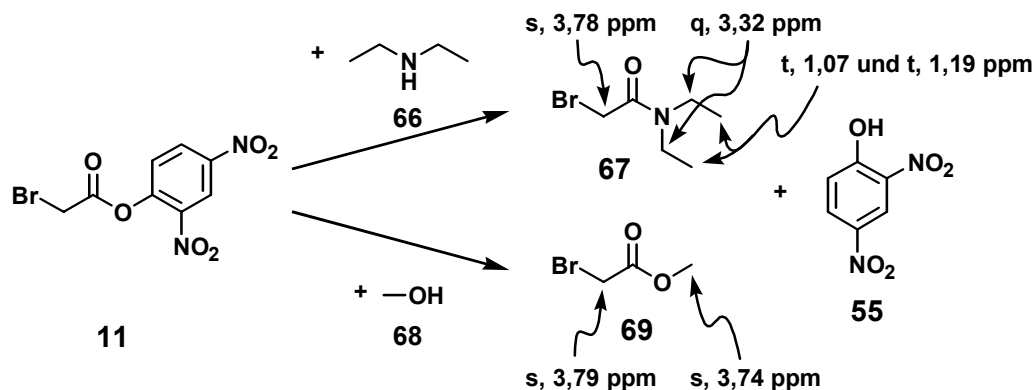
Abb. 18: HPLC-UV-Spur (220 nm, links) und ESI-Massenspektren (rechts) der Produkte der SPOT-Synthese von **17** an Zellulose (vergl. Eintrag 1, Tab. 7).

D) Untersuchung der *N/O*-Selektivität von **11** in CDCl₃

Um die *N/O*-Selektivität von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) auch in Lösung zu untersuchen, wurde in einem Konkurrenzexperiment eine Lösung des Esters **11** in Deuteriochloroform zu Diethylamin-Lösungen (**66**) gegeben, die mit Methanol (**68**) in unterschiedlichen Anteilen versetzt waren. Anhand des NMR-spektroskopisch bestimmten Verhältnisses aus gebildetem Diethylamid **67** und Methylester **69** konnte die *N/O*-Selektivität bestimmt werden (Tab. 8).

Zunächst wurden die Reaktionsprodukte in getrennten Experimenten dargestellt. In Abwesenheit von Methanol fand eine glatte Umsetzung zu Bromessigsäure-*N,N*-diethylacetamid (**67**) statt (Tab. 8, Eintrag 1). Da die Reaktion vollständig verlief, fand offenbar keine Behinderung durch eine Bildung von Diethylammonium-2,4-dinitrophenolat statt. Interessanterweise wies **67** nur ein ¹H-NMR-Signal (Quartett) für die an den Amidstickstoff gebundenen Methylengruppen auf, obwohl aufgrund der eingeschränkten Rotation der Amidbindung zwei verschiedene Signale erwartet wurden. Die beiden Methylgruppen zeigten allerdings getrennte Signale. Offenbar ist die chemische Verschiebung der beiden Methylengruppen zufällig gleich. Die Identität der anderen beiden Produkte **69** und **55** wurde durch authentische Vergleichsproben sichergestellt.

Tab. 8: Konkurrenzexperiment zur Untersuchung der *N/O*-Selektivität bei der Umsetzung von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) mit Diethylamin (**66**) und Methanol (**68**).



Nr.	Amin-Komponente (Äq.) ¹⁾	Hydroxy-Komponente (Äq.) ¹⁾	Reaktionszeit	Nicht umgesetztes Edukt 11 [%] ²⁾	<i>N/O</i> -Selektivität (67/69)
1	Et ₂ NH (0.95)	-	2 h	5	-
2	-	MeOH (1.9)	2 d	98	-
3	Et ₃ N (0.4)	MeOH (1.4)	2 h	67	-
4	Et ₃ N (0.4)	MeOH (2.0)	5 d	11	-
5	Et ₂ NH (0.78)	MeOH (0.62)	2 h	15	95 : 5
6	Et ₂ NH (0.78)	MeOH (0.62)	2 d	9	94 : 6
7	Et ₂ NH (0.71)	MeOH (6.6)	2 h	13	82 : 18

¹⁾ Bestimmt nach ¹H-NMR; ²⁾ Außer den angegebenen Produkten wurde in einigen Fällen Bromessigsäure in Mengen < 1% beobachtet.

In alleiniger Anwesenheit von Methanol ist der 2,4-Dinitrophenylester beachtlich stabil (Eintrag 2). Selbst nach zwei Tagen lag er praktisch unverändert vor. Durch Zusatz von katalytischen Mengen einer tertiären Base (Triethylamin) bildet sich jedoch im Verlauf mehrerer Tage langsam der Methylester (Einträge 3 und 4).

Im Konkurrenzexperiment mit etwa gleichen Mengen Diethylamin und Methanol findet die Reaktion mit einer *N/O*-Selektivität von 95:5 hauptsächlich zum Diethylamid statt (Eintrag 5). Dieser Wert entspricht recht gut dem an Zellulose gemessenen Wert (97:3; vergl. Tab. 7, Eintrag 1). Die Reaktion scheint beendet zu sein, denn auch nach zwei Tagen findet sich noch überschüssiger 2,4-Dinitrophenylester neben Methanol (Eintrag 6). Um eine Veresterung zu provozieren wurde der Aktivester zu einem leichten Unterschub an Diethylamin und 6.6 Äquivalenten Alkohol gegeben. Diese Verzehnfachung der Alkoholmenge bewirkte lediglich eine Verschlechterung der Selektivität auf 82:18 (Eintrag 7). Die Experimente machen deutlich, daß Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester im basenfreien Milieu in Deuteriochloroform praktisch nicht mit Alkoholen reagiert. Zum

geringen Anteil des Esterproduktes kommt es nach einem basenkatalysierten Mechanismus, bei dem auch das Nukleophil (in diesem Fall Diethylamin) als Base wirken kann.

3.3.1.3 Ergebnisse der Bromacetylierung sekundärer Amine

Auf der Grundlage der beschriebenen Experimente erweist sich Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) als optimales Bromacetylierungs-Reagenz in der SPOT-Synthese von Peptoiden (erste Ergebnisse wurden bereits in Lit.^[110] beschrieben). Er übertrifft in Ausbeute und *N/O*-Selektivität die anderen untersuchten Biselektrophile.

Den bei den verschiedenen Acylierungsbedingungen beobachteten Produktverteilungen und -ausbeuten liegen mehrere Ursachen zugrunde:

1. Je stärker die Bromessigsäureaktivierung ist, desto höher ist die Ausbeute an bromacetyliertem Produkt. Eine mangelnde Reaktivität ist am Auftreten der nicht acylierten Dimeren **61** und **63** abzulesen. Sie wurde beim Pentafluorphenylester **10** in wenigen Prozenten Ausbeute, beim 4-Nitrophenylester **12** und *N*-Succinimidylester **13** in deutlichem Ausmaß beobachtet.
2. Unterschreitet die Reaktivität des Aktivesters ein Minimum, so treten neben den unter 1.) diskutierten Dipeptoiden auch *N*-Alkylierungsprodukte auf. (Für den Pentafluorphenylester: < 1%, für den *N*-Succinimidylester: 5%). Bei Verwendung des 4-Nitrophenylesters der Bromessigsäure wird diese Reaktion zur Hauptreaktion. Die Reaktivität der beiden elektrophilen Zentren der Bromessigsäure (Carbonyl-Kohlenstoff- und Bromsubstituiertes-Kohlenstoffatom) kehrt sich hier um.
3. Ist die Reaktivität zu hoch, so tritt in zunehmendem Maße auch *O*-Acylierung ein – die *N/O*-Selektivität wird geringer. Basenzugabe (2,6-Dimethylpyridin) bewirkt ebenfalls eine Erhöhung der *O*-Acylierung, ohne die *N*-Acylierung nennenswert zu fördern.
4. Zusätzlich zu den Reaktivitäten spielen die Reaktionsbedingungen der SPOT-Synthese eine Rolle:
 - Anhand des Auftretens geringer Mengen an Dimer **61** bzw. **63** läßt sich der Bromessigsäurepentafluorphenylester als geringfügig reaktionsträger als der 2,4-Dinitrophenylester einstufen. Dennoch weist er eine geringere *N/O*-Selektivität auf, was auf eine entgegengesetzte Reaktivität schließen ließe. Hier kann die Kinetik der SPOT-Synthese eine Erklärung liefern: Während der flüssige, schwerflüchtige Pentafluorphenylester beim Eindampfen des Lösungsmittels auf der Zellulose konzentriert zurückbleibt und so auch zur langsamen Veresterung befähigt ist, kristallisiert der 2,4-Dinitrophenylester beim Verdampfen des Lösungsmittels als Feststoff aus und ist so der weiteren Reaktion entzogen.
 - Obwohl für das aus der Aktivierung der Bromessigsäure mit DIC gebildete Anhydrid die höchste Reaktivität erwartet wird, ergeben sich hier nicht die höchsten Ausbeuten. (Weder bei der Synthese von **16** noch bei der

Synthese von **17**, wenn man die Ausbeute des Esters **18** hinzurechnet.) Vermutlich sind hierfür Nebenreaktionen verantwortlich, die mit dem Kontakt mit der umgebenden Atmosphäre zu tun haben – vor allen Dingen die Hydrolyse durch Luftfeuchtigkeit.

Die verwendeten Bromacetylierungsmittel lassen sich auf der Basis der Ergebnisse in eine Reaktivitätsreihe gegenüber der Acylierung des sekundärenamins eines *N*-Alkylglycin-Bausteins einordnen (Abb. 19). Die Reihenfolge ist dabei im Einklang mit Literaturangaben zu Aktivestern von Fmoc-Aminosäuren.^[26] Das aus Aktivierung mit DIC hervorgegangene Bromessigsäureanhydrid läßt sich aus den obengenannten Gründen nicht ohne weiteres in die Reihe eingliedern. In jedem Fall ergeben sich jedoch geringfügig schlechtere Ergebnisse als unter Verwendung des 2,4-Dinitrophenylesters.

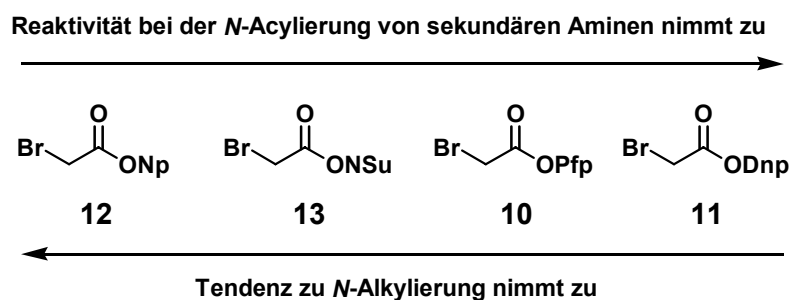


Abb. 19: Reaktivitätsreihe von Bromessigsäureestern gegenüber sekundären Aminen unter den Bedingungen der SPOT-Synthese.

3.3.2 Bromsubstitution durch primäre Amine

Im Zusammenhang mit der Optimierung des Bromacetylierungsmittels wurden im vorangegangenen Abschnitt erfolgreich Modell-Peptide an Zellulosemembranen synthetisiert. Zur Bromsubstitution wurden dabei jeweils die gesamten Membranen mit 5 M Amin-Lösungen behandelt, um eine sichere Bromsubstitution zu erreichen. Nach der Bromacetylierung galt es nun auch die nukleophile Substitution und damit die Einführung der Seitenkettenfunktionalitäten für die Bedingungen der SPOT-Synthese zu optimieren. Dazu sollte der Einfluß des Lösungsmittels und der Aminkonzentration auf die Produktqualität untersucht werden.

3.3.2.1 Lösungsmittel

Zusätzlich zu allgemeinen Funktionen wie der Solvataion der Reagenzien übernimmt das Lösungsmittel bei der SPOT-Synthese die Kontrolle der Reaktionszeit, die durch seine Flüchtigkeit begrenzt ist. Bei Verwendung von *N*-Methylpyrrolidon (NMP) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) bleibt die Membran pro Kopplung etwa 10-15 Minuten benetzt. Längere Reaktionszeiten können durch Mehrfachkopplungen erreicht werden. Die Synthese von Peptoiden am Syntheseharz wird mit einer zweistündigen Reaktionszeit für jeden Substitutionsschritt durchgeführt.^[104] Entsprechende 8- bis 12-fach-Kopplungen an Zellulose würden zu Problemen mit unflüchtigen Reagenzien führen, da diese auf der Membran

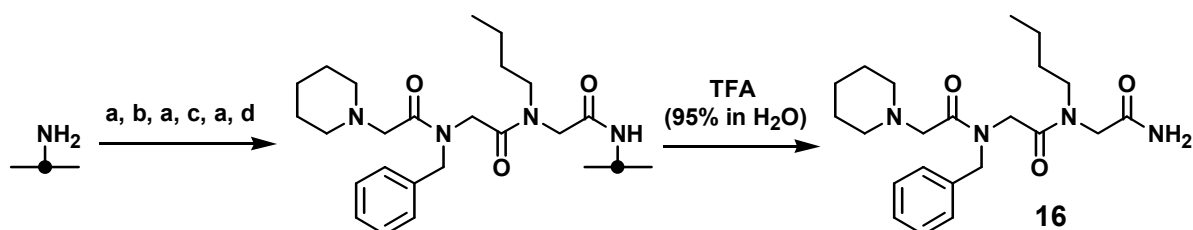
zurückbleiben. Die erfolgreichen Synthesen aus Abschnitt 3.3.1 lassen eine Kopplungszeit von 45 Minuten als ausreichend erscheinen, so daß für die hier durchgeführten Experimente Bromsubstitutionen als Dreifachkopplung durchgeführt wurden.

Für die SPOT-Synthese geeignete Lösungsmittel sollten folgende Eigenschaften aufweisen:

1. Hoher Siedepunkt und damit geringe Flüchtigkeit, um eine lange Reaktionszeit zu ermöglichen.
2. Gute Benetzungseigenschaften für Zellulose.
3. Gute Lösungseigenschaften für Reagenzien verschiedenster Art, um Konzentration > 1 M zu erlauben.
4. Nicht zu große Viskosität, um eine Pipettierung kleiner Lösungsmittelmengen im 10 nl-Bereich zu ermöglichen.

Die Lösungsmittel NMP und DMSO erfüllen diese Kriterien weitgehend. Insbesondere NMP (Siedepunkt: 203°C) hat sich in der SPOT-Synthese bewährt, da es unflüchtiger als DMSO (Siedepunkt: 189°C) ist und keine Oxidation von Sulfiden (wie z.B. in Methionin) bewirkt.^[39] Da einige Amine in der SPOT-Synthese eingesetzt werden sollten, die aufgrund ihrer Polarität nur schwer in organischen Lösungsmitteln löslich sind (z.B. Glycinamid), sollte auch Wasser als drittes Lösungsmittel mit in die Untersuchung einbezogen werden. Um den Einfluß des Lösungsmittels auf die Bromsubstitution zu bestimmen, wurde die trimere Testverbindung **16** unter Verwendung der genannten Lösungsmittel (NMP, DMSO, H₂O) an Rink-Linker-derivatisierter Zellulose synthetisiert (Tab. 9). Durch Iodid-Zusatz (0.05 M) sollte zusätzlich untersucht werden, ob sich die Reaktion durch *in situ*-Erzeugung des Iodacetamides beschleunigen läßt.^[12]

Tab. 9: Reinheiten der Rohprodukte einer Synthese des Tripeptoids **16** an einer Rink-Linker-derivatisierten Zellulosemembran.



a) Br-CH₂-COODnp (1 M in NMP, 2 x 15 min.); b) *n*-Butylamin (5 M, 3 x 15 min.); c) Benzylamin (5 M, 3 x 15 min.); d) Piperidin (5 M, 3 x 15 min.). Lösungsmittel und Iodidzusatz für b)-d) vergl. Tab. 9

Lösungsmittel	NMP		DMSO		H ₂ O ¹⁾	
Zusatz ²⁾	-	Me ₄ N ⁺ I ⁻	-	Me ₄ N ⁺ I ⁻	-	Cs ⁺ I ⁻
Reinheit [%] ³⁾	93	93	95	95	93	93

¹⁾ Zusatz von 0.05% Tween® 20; ²⁾ 0.05 M; ³⁾ HPLC, 220 nm; gemittelt aus zwei Synthesen; die Ausbeute betrug 55-100% (bestimmt durch quantitative Auswertung der UV-Absorption und Vergleich mit dem Derivatisierungsgrad).

Alle drei verwendeten Lösungsmittel lieferten das gewünschte Produkt in ausgezeichneten Reinheiten (> 93%) und guter bis sehr guter Ausbeute (55-100%). Ein Zusatz von Iodid führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse. Den wäßrigen Lösungen wurde Tween[®] 20 (0.05%) als Detergenz zugesetzt, um die Oberflächenspannung herabzusetzen und eine gleichmäßige Benetzung der Membran zu ermöglichen.

Die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel wurde bisher noch nicht in der Peptoid-Synthese beschrieben und ist generell unüblich bei Reaktionen an Synthescharzen. Die hier gezeigten Ergebnisse belegen, daß wäßrige Lösungen für die SPOT-Synthese an Zellulose geeignet sind. Es ist auf diese Weise möglich, das Spektrum anwendbarer Bausteine auf sehr polare Amine zu erweitern. Nachteilig ist allerdings die verglichen mit NMP und DMSO höhere Flüchtigkeit von Wasser.

3.3.2.2 Konzentrationen

In einer Reihe von Synthesen sollte die minimal benötigte Aminkonzentration ermittelt werden. Dazu wurde wie bei der Variation der Lösungsmittel das Tripeptoid **16** – in diesem Fall unter Anwendung verschiedener Aminkonzentrationen – aufgebaut (Abb. 20).

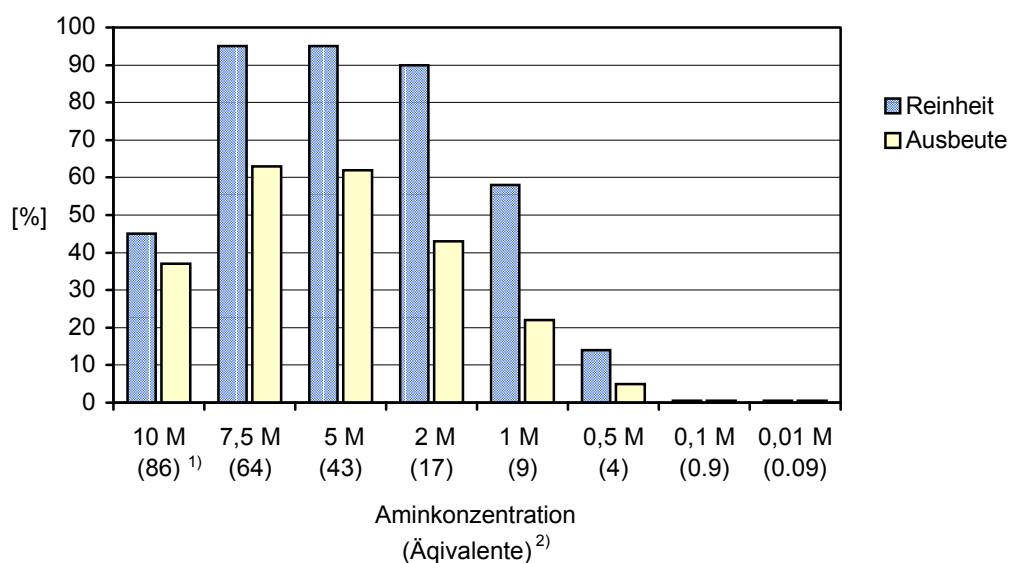


Abb. 20: Reinheiten und Ausbeuten der Rohprodukte einer Synthese des Tripeptoids **16** an einer Rink-Linker-derivatisierten Zellulosemembran (Lösungen in NMP). ¹⁾ 9 M (77 Äq.) für Benzylamin; ²⁾ Bei der verwendeten Membran (1.26 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$), einer Reagenzienmenge von ca. 3.6 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ und Dreifach-Pipettierung des Amins.

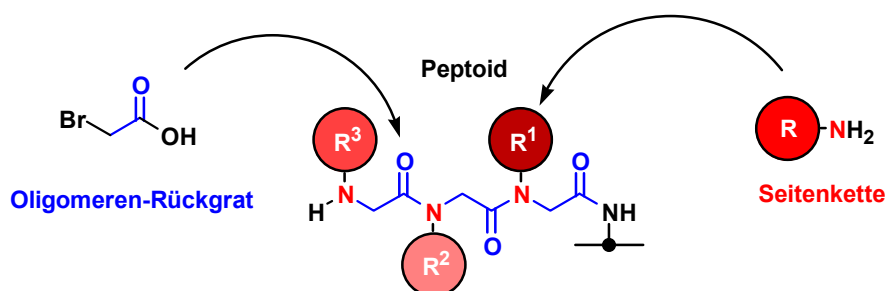
Die Meßwerte zeigen eine deutliche Abhängigkeit sowohl der Reinheit als auch der Ausbeute von der Aminkonzentration. Reinheiten über 90% werden erst bei Anwendung 2 M Amin-Lösungen, eine maximale Ausbeute sogar erst bei Anwendung 5 M Lösungen erreicht. Letztere Aminkonzentration entspricht bei der hier verwendeten Membran (1.26 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) einer Anwendung von rund 43 Äquivalenten. Mit einem Derivatisierungsgrad über 1 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ liegt die für die Optimierung verwendete Membran allerdings an der

oberen Grenze der für die SPOT-Synthese geeigneten Träger, so daß 2-5 M Aminkonzentrationen bei Membranen mit niedrigerer Derivatisierung in jedem Fall ausreichen sollten. Die unerwartet niedrige Reinheit und Ausbeute für die 10 M Lösungen ist vermutlich auf das schnellere Verdampfen der reinen Amine verglichen mit ihren Lösungen in NMP und die damit verbundene verkürzte Reaktionszeit zurückzuführen. Da die reinen Amine als Lösungsmittel auch eine von NMP verschiedene Polarität haben, könnten auch Lösungsmittelleffekte eine Rolle spielen.

Um die Amine stets in ausreichendem Überschuß einzusetzen, sollte die Synthese von Peptoiden im folgenden mit 50%igen Lösungen (bei flüssigen Aminen $\hat{=}$ ca. 4-5 M Lösungen bei Aminen mit $M < 150$ g/mol) bzw. mit 2-5 M Lösungen (bei Feststoffen) in NMP erfolgen. Der Substanz-Verbrauch bleibt trotz der hohen Konzentrationen begrenzt, da die SPOT-Synthese mit Lösungsmengen im μ l-Bereich auskommt.

3.3.3 Einführung von Diversität: Test von Aminen auf ihre Eignung in der SPOT-Synthese

In der Peptoid-Synthese nach der Sub-Monomer-Methode werden die Bausteine in einem 2-stufigen Prozeß eingeführt. Die Bromacetylierung dient dem Aufbau des Peptoid-Rückgrates (Carbonyl- und α -CH₂-Gruppe), während mit den Aminen die Seitenketten eingebracht werden. Die Eigenschaften der synthetisierten Verbindungen werden, wie auch bei den Peptiden, weitgehend von den Seitenketten bestimmt, denen daher eine entscheidende Bedeutung zukommt. Während man sich bei der Peptidsynthese häufig auf die 20 proteinogenen Aminosäuren sowie deren Enantiomere beschränkt, steht zur Synthese der Peptide das gewaltige Repertoire der (vielfach kommerziell erhältlichen) primären Amine zur Verfügung. Da die Auswahl der Bausteine die „Unterschiedlichkeit“ der einzelnen Peptide einer Peptoid-Bibliothek – ihre Diversität – bestimmt, kommt den Aminen eine entscheidende Bedeutung für den Erfolg der Bindungsstudien zu.



3.3.3.1 Untersuchung der zur Synthese notwendigen Amineigenschaften

Kommerziell sind primäre Amine in großer Anzahl erhältlich (> 13.000 in „*Available Chemicals Database*“, davon 1.000 zu einem Preis unter 10 DM/g^[108]). Zusätzlich existieren zahlreiche Methoden zu deren Synthese (z.B.: Reduktive Aminierung, Reduktion von Nitrilen, Gabriel-Synthese, Decarboxylierung von Aminosäuren^[141]). Um die Bausteine für die Synthese einer Peptoid-Bibliothek auswählen zu können, muß man die Kriterien kennen, nach denen sich die Eignung der Amine für die Peptoid-Synthese entscheiden läßt.

Generell muß der ausgewählte Baustein drei Kriterien genügen:

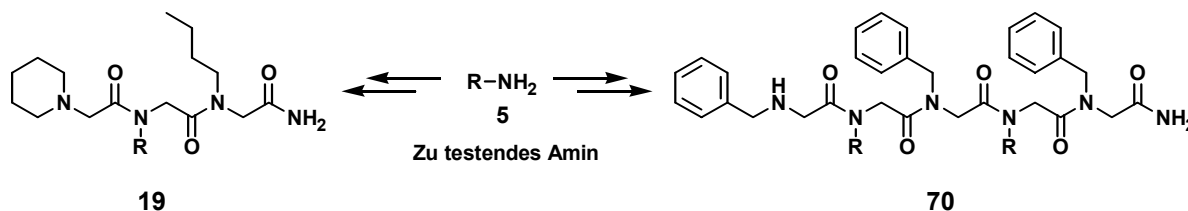
1. Er muß zur nukleophilen Substitution des Bromatoms befähigt sein.
2. Das gebildete sekundäre Amin muß durch Bromessigsäure acylierbar sein.
3. Er muß eine ausreichende Löslichkeit in einem zur SPOT-Synthese geeigneten Lösungsmittel (vergl. 3.3.2.1) besitzen.

Eine Ausnahme bilden Bausteine, die in der *N*-terminalen Position eingesetzt werden sollen. Sie brauchen Kriterium 2.) nicht zu erfüllen.

Mehrere Faktoren spielen bei der Erfüllung dieser Kriterien eine Rolle:

1. Reaktivität (Nukleophilie) des Stickstoffatoms.
2. Sterischer Anspruch, insbesondere in der Nähe der reaktiven Aminogruppe (α - und β -Position).
3. Löslichkeit in den geeigneten Lösungsmitteln.
4. Flüchtigkeit.
5. Anwesenheit von funktionellen Gruppen (zusätzlich zur Aminofunktion).

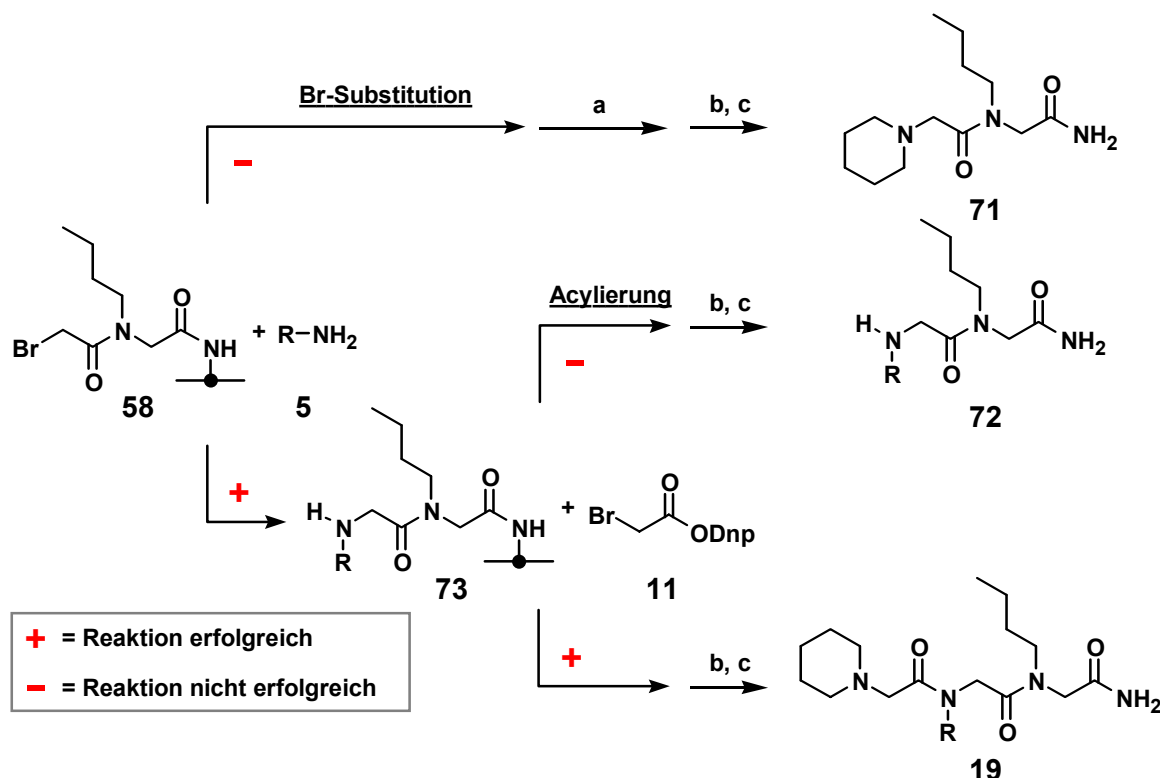
G.M. Figliozzi *et al.* schlugen die Synthese des Pentapeptoids **70** vor, um eine experimentelle Aussage über die Eignung eines Amin-Bausteins **5** in der Peptoidsynthese zu erhalten^[104]. Geeignete Amine sollten das Pentamer dabei in einer Reinheit von > 70% (HPLC) sowie einer Ausbeute > 50% ergeben. Die Identität sollte mittels ESI-MS überprüft werden.



Um die Amine auf eine Eignung zur SPOT-Synthese zu überprüfen, wurde die Synthese des kürzeren Tripeptoids **19** gewählt. Vorteile dieses Verfahrens sind eine schnellere Synthese und eine leichtere Interpretierbarkeit der Nebenprodukte. Aus Art und Menge der Nebenprodukte lassen sich wichtige Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Probleme ziehen und diese gegebenenfalls umgehen.

Ausgehend von einer Zellulosemembran, die bereits mit dem ersten bromacetylierten Monomer versehen war (**58**), wurde das zu testende Amin **5** unter SPOT-Bedingungen angewendet (Dreifachkopplung, 2-5 M, Schema 14). Gelang sowohl die Bromsubstitution zum Dimeren **73** als auch die anschließende Acylierung, so erhielt man das Tripeptoid **19**. War das Amin nicht in der Lage, das Halogen zu substituieren, dann blieb die Ausgangsverbindung **58** erhalten. Nach der anschließenden (in diesem Fall wirkungslosen) Acylierung bewirkte dann Piperidin den Brom austausch zu **71**. Das Auftreten des Dimers **72** schließlich zeigte eine unvollständige Bromacetylierung des Dimers **73** an. Anhand der

jeweiligen Mengen der drei Produkte konnte ein Reaktionsprofil des zu testenden Amins erstellt werden.



Schema 14: Mögliche Nebenprodukte bei der Synthese des Tripeptoids **19** mit dem Amin **5**.
 a) Br-CH₂COODnp (1 M in NMP); b) Piperidin (5 M in NMP); c) In Abhängigkeit vom verwendeten Linker: 95% TFA/H₂O (Rink-Linker) bzw. hv (365 nm) (Photolinker).

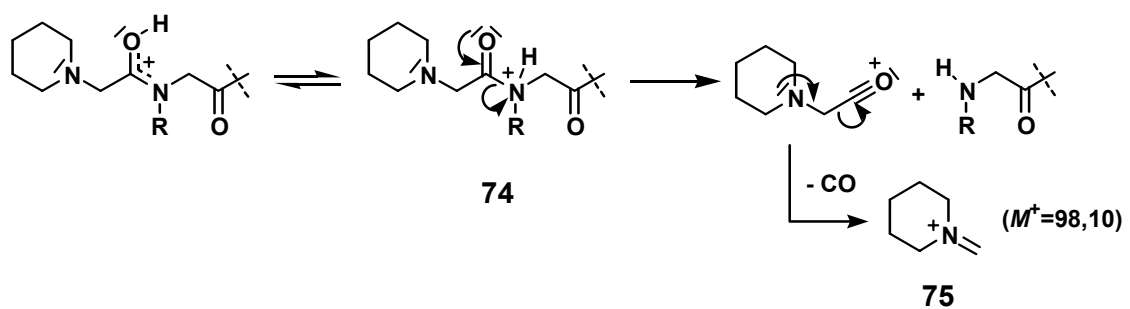
Auswahl der Amine

Es sollten repräsentative Amine ausgewählt und anhand der Synthese der entsprechenden Modell-Trimeren **19** auf ihre Eignung zur Peptoid-Synthese unter SPOT-Bedingungen untersucht werden. Die Kriterien der Auswahl gründeten sich in erster Linie auf der jeweiligen Fragestellung (z.B. der Untersuchung sterischer Faktoren). In zweiter Linie galt es Bausteine zu wählen, die aufgrund ihrer interessanten Struktur (wie beispielsweise den Seitenketten der proteinogenen Aminosäuren) einen Beitrag zu einer bioaktiven Struktur liefern könnten. Dazu war auch zu berücksichtigen, daß sich die gewählten Amine ausreichend in Struktur und Art der funktionellen Seitenketten-Gruppe unterscheiden, um das Erreichen einer hohen Diversität der später synthetisierten Peptoid-Bibliotheken zu gewährleisten.

Auf die Wahl des Amins folgte die Suche eines geeigneten Lösungsmittels (NMP oder DMSO, bei Schwerlöslichkeit H₂O). Amine, die nur als Hydrochloride erhältlich sind, mußten durch Basenzugabe freigesetzt werden. Dazu wurden bei relativ unpolaren Aminen 0.9 Äquivalente DIEA zur Lösung in NMP bzw. bei polaren Aminen 0.9 Äquivalente NaOH zur wäßrigen Lösung zugegeben (die unterstöchiometrische Basenzugabe sollte sicherstellen, daß Hydroxidionen nicht mit dem Amin um die Bromsubstitution konkurrieren).

Analytik mittels HPLC-MS

Nach der SPOT-Synthese wurde das membrangebundene Trimer **19** mit dem entsprechenden Membranstück ausgestanzt und vom Linker abgespalten. Man erhielt je nach Derivatisierungsgrad zwischen 50 und 300 nmol Substanz, die in einer Standardmessung mittels HPLC und gekoppelter ESI-MS analysiert wurden. Die Bedingungen der HPLC-Trennung waren wie folgt: C18 Reverse-Phase Säule (2.1 x 150 mm), linearer Gradient 5-95% **B**, wobei **A**: 0.05% TFA in Wasser und **B**: 0.05% TFA in Acetonitril, Fluß 0.3 ml/min, Gradienten-Länge: 25 Minuten. Die Produktreinheiten wurden durch quantitative Auswertung der Integralflächen des UV-Chromatogramms (220 nm) erhalten. Die Massenanalyse erfolgte mittels einer Abfolge verschiedener Massenspektren-Typen: Standard-Spektren in den Massen-Bereichen 50-600 und 150-2000 sowie MS²-Spektren der beiden intensivsten Ionen im Bereich 50-600 mit einer Kollisions-Energie von 24% und *Collision-Induced Dissociation*- (CID-)Spektren im gleichen Bereich bei 35% Kollisions-Energie. Die Zuordnung der Reaktionsprodukte zu den Signalen des UV-Detektors der HPLC wurde durch Anwendung von Massenfiltern für die gesuchte Masse durchgeführt. Die Identität der Verbindungen wurde durch Analyse charakteristischer Signale im Spektrum (im allgemeinen $M+H^+$) sowie der Betrachtung von Fragmenten im Haupt- sowie in den MS²-Spektren überprüft. Einige immer wiederkehrende Fragmentierungen resultieren aus Bindungsbrüchen der Amidbindungen insbesondere der Verlust von Ammoniak bei der Spaltung des C-terminalen Amides (-17). Carbonsäure- und Hydroxyethyl-Seitenketten zeigten eine Neigung zur Eliminierung von Wasser (-18). Bei Verwendung eines N-terminalen Piperidin-Bausteins wird stets ein Fragment **75** mit der Masse $m/z = 98.1$ beobachtet, welches aus protonierten Peptoiden **74** nach einem Bruch der N-terminalen Amidbindung und anschließender Eliminierung von Kohlenmonoxid gebildet wird. (Zur Analytik mittels ESI-MS vergleiche Lit.^[142-144] sowie zur speziellen MS-Analytik von Peptoiden Lit.^[145,146])



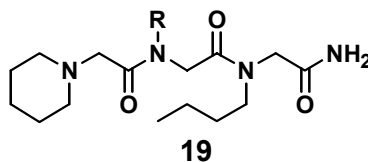
Die folgenden Parameter wurden untersucht, um die Anwendbarkeit von Aminen einschätzen zu können:

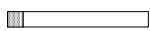
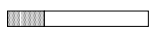




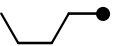
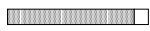
- A) Einfluß der Flüchtigkeit des Amins.
- B) Einfluß sterischer Faktoren (Verzweigungen).
- C) Einfluß der Nukleophilie der NH₂-Gruppe.
- D) Anwendbarkeit funktioneller Gruppen in der Seitenkette.

A) Einfluß der Flüchtigkeit des Amins

Zunächst sollte der Einfluß der Flüchtigkeit der Amine auf die Produktreinheiten untersucht werden (Tab. 10).

Tab. 10: Einfluß der Flüchtigkeit von Aminen R-NH₂ auf die Produktreinheiten bei der Synthese der Tripeptide **19** an Rink-Linker modifizierter Zellulose.



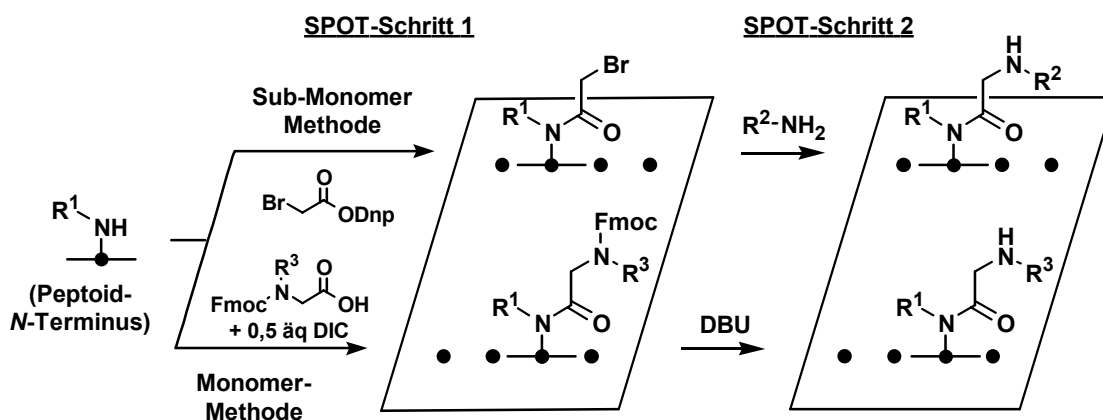
Nr.	R-●	Lösungs- mittel	Sdp. des Amins ¹⁾	Trimer 19 [%] ²⁾
1	H-●	H ₂ O [12 M]	-33°C	11 
2	Me-●	H ₂ O [12 M]	-6°C	26 ³⁾ 
3	 -●	H ₂ O [12 M]	17°C	32 ³⁾ 
4	 -●	NMP [50%] ⁴⁾	53°C	85 
5	 -●	NMP [50%] ⁴⁾	78°C	90 

¹⁾ Literaturwerte; ²⁾ Die Daten sind das Ergebnis von Einzelsynthesen; ³⁾ Synthetisiert am Photo-Linker **48**; ⁴⁾ Vol-%.

Es wird deutlich, daß die flüchtigen Amine Ammoniak, Methyl- und Ethylamin (Tab. 10, Einträge 1-3), selbst wenn sie in hoher Konzentration angewendet werden, keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern. Die Reaktionszeit ist durch ihr rasches Verdampfen zu kurz. Mit einem Siedepunkt von 53°C liefert Allylamin bereits gute Ergebnisse (Eintrag 4), die von *n*-Butylamin (Sdp. 78°C, Eintrag 5) noch übertroffen werden. Die Flüchtigkeit ist in diesem Fall allerdings nicht die einzige Variable: auch Nukleophilie und sterischer Anspruch unterscheiden sich bei den hier verwendeten Aminen. Der Flüchtigkeit wird jedoch in dieser Reihe die entscheidende Rolle zugeschrieben.

Es sei angemerkt, daß Glycin sowie die Peptide mit Methyl- und Ethylrest alternativ gut über die Anwendung der entsprechenden Fmoc-geschützten Monomer-Bausteine (Fmoc-Glycin, Fmoc-Sarcosin und Fmoc-*N*-Ethylglycin) eingeführt werden können. Die Kopplung

der Aminosäuren mit *N*-Alkylglycinen erfolgt in der SPOT-Synthese am besten nach einer Aktivierung zum Anhydrid durch DIC.^[110,123] Bei Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit einer unflüchtigen Base (DBU) anstelle von Piperidin kann die Monomer-Synthese mit der Sub-Monomer-Methode auf einer Membran kombiniert werden (Schema 15).



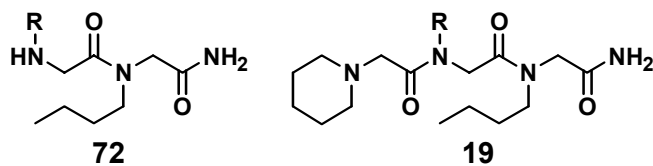
Schema 15: Parallele Durchführung der Peptoid-Synthese nach der Sub-Monomer- und der Monomer-Methode auf *einer* zusammenhängenden Membran.^[110,123] Die beiden Synthesewege können dabei an benachbarten SPOTs durchgeführt werden. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe innerhalb eines SPOT-Schrittes hat sich hier das im Vergleich zu Piperidin unflüchtigere DBU (4% in NMP) bewährt.

B) Einfluß sterischer Faktoren (Verzweigungen)

Es war zu erwarten, daß ein hoher sterischer Anspruch der Peptoid-Seitenkette die Synthese behindern kann – insbesondere bei der auf die Aminkopplung folgenden Acylierung des sekundären Amins **76** mit der aktivierten Bromessigsäure **11**. Der Raumbedarf des Peptoid-Rückgrates (α' - und β' -Positionen) ist dabei vom Amin unabhängig und konstant. Verzweigungen in α -, β - oder γ -Position des Amins lassen, verglichen mit den unsubstituierten Aminen, eine Behinderung der Acylierung erwarten. Eine Auswahl an Bausteinen wurde getestet, um die Abhängigkeit der Reaktion von sterischen Faktoren abschätzen zu können (Tab. 11).



Tab. 11: Einfluß sterischer Faktoren auf die Produktreinheiten bei der Synthese der Tripeptide **19** an Rink-Linker modifizierter Zellulose. Die zugrunde liegenden Amine R-NH₂ wurden als Lösungen in NMP eingesetzt (50%).



Nr.	R-●	Verzweigung	Dimer 72 [%]	Trimer 19 [%]	n ¹⁾
1		γ	-	80 	1
2a		β	-	95 (Bn) 	5
2b		β	-	87 (Napht) 	1
3		β	21	62 	1
4		α	-	97 	1
5		α	9	81 	2
6		α	20	72 	1
7		α	30	47 ⁵⁾ 	1
8		α	95	0 	1

¹⁾ Zahl der durchgeführten Synthesen; ²⁾ (+)-Dehydroabietylamin: tech. (60% GC); ³⁾ Die Synthese erfolgte mit dem entsprechenden Dimethylacetal; ⁴⁾ 4 M in NMP; ⁵⁾ Summe aus 27% der Tripeptoids **19** (R = ●-C(CH₂OH)₃) und 20% des entsprechenden im 3. Acylierungsschritt einfach O-acylierten Produktes; ⁶⁾ 0.8 M in NMP.

Bei keinem der hier getesteten Amine wurde ein Auftreten des Dimers **71** beobachtet (vergl. Schema 14, Seite 56), welches nach unvollständiger Brom-Substitution beobachtet wird. Selbst das sterisch sehr anspruchsvolle 1-Adamantylamin ermöglichte eine vollständige Reaktion. Die Dimere **72** traten jedoch in unterschiedlichem Maß auf und signalisierten unvollständige Bromacetylierung des membrangebundenen sekundären Amins in Abhängigkeit vom Verzweigungsgrad.

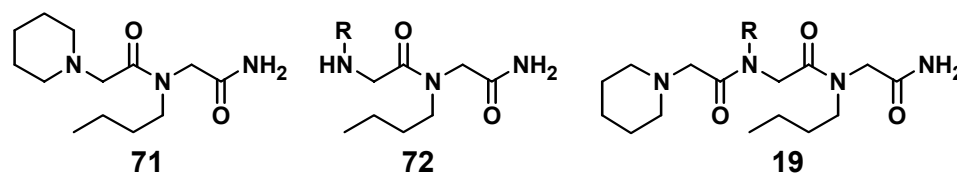
In γ -Position behinderte selbst eine Substitution mit zwei Phenylresten die Reaktion nicht (Tab. 11, Eintrag 1). Auch eine β -Substitution liefert bei Resten mittleren sterischen Anspruchs (z.B. Naphtyl, Eintrag 2b) vollständige Acylierung. Der sehr voluminöse (+)-Dehydroabietylrest, der ein quartäres C-Atom in β -Stellung aufweist, ließ sich nicht mehr vollständig umsetzen, lieferte das gewünschte Trimer jedoch immer noch in einer Reinheit von 62% (Eintrag 3).

In α -Position werden einfache Verzweigungen problemlos toleriert, wenn sie Teil eines Fünfringes sind (Eintrag 4). Der Cyclohexyl-Rest (Eintrag 5) sowie eine einfache offenkettige α -Verzweigung (Eintrag 6) ergeben noch gute Trimer-Reinheiten (81% bzw. 72%), wenngleich die Acylierung unvollständig ist. Nur sehr unvollständig oder gar nicht lassen sich Seitenketten mit drei α -Substituenten umsetzen (Einträge 7 und 8).

C) Einfluß der Nukleophilie der NH₂-Gruppe

Genau wie der sterische Anspruch kann sich die Nukleophilie des primären Amins sowohl auf die Brom-Substitution als auch auf die nachfolgende Bromacetylierung auswirken. Das Spektrum der *N*-Nukleophile reicht von einer hohen Reaktivität bei Hydrazinen und Hydroxylaminen auf der einen Seite über aliphatische Amine zu Arylaminen (Anilinen und heterocyclisch substituierten Aminen) auf der anderen Seite. Die Elektronendichte am Stickstoff wird bei letzteren entscheidend von Art und Position der Substituenten am aromatischen System sowie bei heterocyclischen Systemen von der Art des Heterocyclus bestimmt. Als Ergänzung zu den bereits getesteten aliphatischen Aminen (Tab. 10 und Tab. 11) wurde eine Auswahl an elektronenreichen und -armen Aminen getestet, um den Einfluß der Nukleophilie beurteilen zu können (Tab. 12). Dabei ist zu berücksichtigen, daß insbesondere bei den Anilinen durch die α -Verzweigung auch sterische Faktoren eine Rolle spielen.

Tab. 12: Einfluß der Nucleophilie der Amino-Gruppe von Aminen R-NH₂ auf die Produktreinheiten bei der Synthese der Tripeptide **19** an Rink-Linker modifizierter Zellulose.

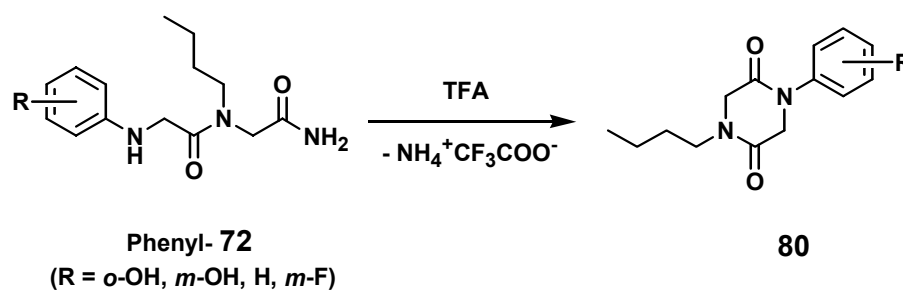


Nr.	R-●		Lösungs- mittel	Dimer 71 [%]	Dimer 72 [%]	Trimer 19 [%]	n ¹⁾
1	HO-●		H ₂ O [50%]	-	-	78 	2
2a	X HN-●	X = H ²⁾	NMP [2 M]	-	-	64 	3
2b		X =	H ₂ O [5 M]	-	-	80 	1
3			H ₂ O [5 M]	-	90	7 	5
4a		X = <i>p</i> -OH	NMP [1 M] ⁴⁾	12	0	80 	1
4b		X = <i>m</i> -OH	NMP [2 M]	-	28 ⁵⁾	48 	1
4c		X = <i>o</i> -OH	NMP [2 M]	-	-	16 ⁶⁾ 	2
4d		X = <i>p</i> -OMe	NMP [4 M]	-	-	68 ⁷⁾ 	1
4e		X = H	NMP [50%] ³⁾	-	-	35 	2
4f		X = <i>m</i> -F	NMP [50%] ³⁾	-	-	< 1 	1
5a		X = CH	NMP [1.5 M]	2	-	69 	2
5b		X = N	NMP [2 M]	20	13	22 	2
6			NMP [5 M]	-	36	4 	1

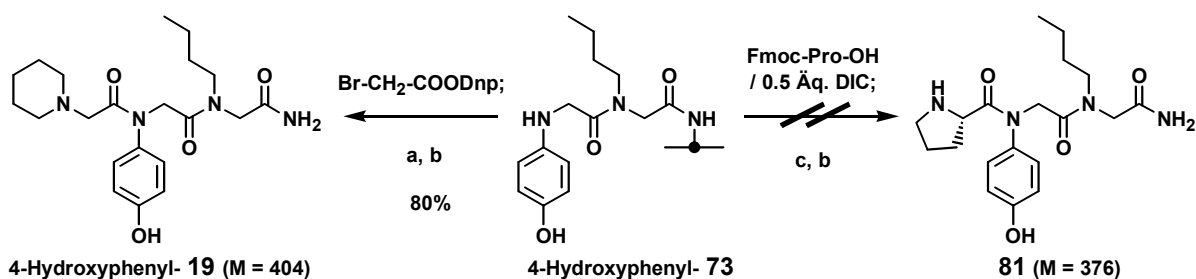
¹⁾ Zahl der durchgeführten Synthesen; ²⁾ Hydrazin wurde mono-Boc-geschützt eingesetzt; ³⁾ Vol-%; ⁴⁾ gesättigte Lösung; ⁵⁾ Als Diketopiperazin **80**; ⁶⁾ Nebenprodukt: 47% 4*H*-Benzo[1,4]oxazin-3-one **79**; ⁷⁾ Bei der Bestimmung der Reinheiten wurde das Signal von adhäsiv am Träger gebundenem und durch TFA abgelöstem Amin nicht berücksichtigt.

ungeeignet (Eintrag 4e). Die Reaktion kann bei den Synthesebedingungen am Harz zur Vollständigkeit gebracht werden, während sie an Zellulose vorzeitig endet – sie stellt ein Beispiel für die Grenzen der Peptoidchemie an Zellulose dar. Im Falle einer Fluor-substitution am Anilin ist der anilinische Stickstoff derart deaktiviert, daß eine Acylierung nicht mehr möglich ist (Eintrag 4f).

Eine bemerkenswerte Beobachtung in der Reihe der Aniline war das Auftreten von Produkten, die verglichen mit den Dimeren **72** eine um 17 Einheiten verminderte Masse aufwiesen. Sie trat hauptsächlich nach einer Behandlung mit TFA bei der Abspaltung vom Rink-Linker auf – nach einer vergleichenden Synthese am Photo-Linker und säurefreier Photolyse erhält man hauptsächlich das Dimer **72**. In einer Lösung von Acetonitril (30%) und TFA (0.1%) in Wasser verschwand letzteres allerdings nach 1-2 Tagen zugunsten des obengenannten Produktes. Eine säurekatalysierte Cyclisierung der Dimeren **72** zu den entsprechenden Diketopiperazinen **80** erklärt die Nebenreaktion.^[104] Sie ist jedoch nur im speziellen Fall von Peptoiden möglich, die einen Anilin-Rest *N*-terminal tragen.



Eine weitere Beobachtung machte die Grenzen der Reaktion am Beispiel der Aniline deutlich: Der Versuch, 4-Hydroxyphenyl-**73** mit Fmoc-Prolin an Stelle von Bromessigsäure zu acylieren, um ein Hybrid-Oligomer **81** aus Peptoid- und Peptid-Bausteinen (Peptomer^[17]) zu erhalten, war nicht erfolgreich (Schema 16). Aus der Beobachtung läßt sich ableiten, daß Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) unter den hier angewendeten Bedingungen sogar etwas reaktiver als Aminosäureanhydride ist, welche sich für die Acylierung aliphatisch substituierter Peptoide unter SPOT-Bedingungen als optimal erwiesen hatten.^[110]



Schema 16: Versuch der Synthese von Peptoid/Peptid Hybriden (Peptomeren) mit Anilinen. Das membrangebundene Anilin 4-Hydroxyphenyl-**73** läßt sich unter den für die SPOT-Synthese mit aliphatischen Aminen optimierten Bedingungen (mit Fmoc-Prolinanhydrid^[110]) nicht mehr zum Peptomer **81** acylieren, während die Reaktion mit Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester glatt zu 4-Hydroxyphenyl-**19** verläuft (vergl. Tab. 12, Eintrag 4a). **a**) Piperidin (50% in DMF); **b**) TFA (95% in H₂O); **c**) DBU (4% in DMF).

(Zur Peptomer-Synthese vergl. Schema 15, wobei statt des Fmoc-*N*-alkylglycins eine Fmoc-Aminosäure eingesetzt wird.) Für die Peptomer-Synthese ist die Reaktivität des 4-Hydroxyanilins nicht mehr ausreichend. Aniline sollten daher nur zur Synthese von „reinen“ Peptoiden eingesetzt werden.

Von den verwendeten heterocyclischen Aminen 2-Aminothiazol (Eintrag 5a), 2-Amino-1,3,4-thiadiazol (Eintrag 5b) und 2-Aminopyridin (Eintrag 6) wurde nur erstgenanntes in einer brauchbaren Reinheit von 69% zum gewünschten Trimer umgesetzt. Die elektro-negativen Ring-Stickstoffatome bewirken eine Verminderung der Reaktivität, so daß eine Acylierung mit Bromessigsäure nicht oder nur unvollständig möglich ist.

D) Anwendbarkeit funktioneller Gruppen in der Seitenkette

Als letzter Parameter sollte die Vereinbarkeit der Peptoid-Synthese mit funktionellen Gruppen in Seitenketten untersucht werden. Entscheidend war dabei, ob die gewünschte Gruppe ungeschützt eingebracht werden kann, oder ob eine Schutzgruppe notwendig ist. Für die Synthese am Harz wurde vorgeschlagen, Alkohole, Amine, Carbonsäuren, Thiole und Guanidine zu schützen, während weniger reaktive Gruppen wie Indole, Phenole und Imidazole ungeschützt bleiben können.^[12,104] Entsprechende Synthesen von geschützten Aminen für die Sub-Monomer-Methode wurden beschrieben.^[18,130]

Die Untersuchung der *N/O*-Selektivität bei der Bromessigsäureaktivierung (Abschnitt 3.3.1.2) ergab bereits, daß Aminoalkohole, anders als bei der Peptoid-Synthese am Harz, bei Verwendung von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) auch ohne Schutzgruppe eingesetzt werden können. Der Verzicht auf Schutzgruppen ist dabei vor allem in Hinblick auf die schnelle Zugänglichkeit der Bausteine von erheblichem Vorteil.

Die Schutzgruppen-Strategien bei den hier untersuchten Seitenkettenfunktionalitäten werden im folgenden erläutert (die Daten sind in Tab. 13 zusammengefaßt):

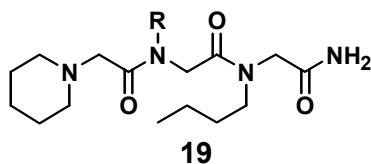
-COOH: Carbonsäuren

Vorversuche mit freien, ungeschützten Carbonsäurefunktionalitäten in der Seitenkette führten zu Nebenprodukten, in denen die Säure mit dem in der Synthese folgenden Amin zum Amid reagiert hatte. Vermutlich setzte sich das Carboxylat zum Teil mit der aktivierten Bromessigsäure zum gemischten Anhydrid um. Der Einsatz von säurespaltbaren *tert*-Butylestern sollte einen ausreichenden Schutz bewirken, ohne Aminolysen des sterisch anspruchsvollen Esters befürchten zu müssen. Zudem sind einige Bausteine für die Peptoid-Synthese (Glycin, β -Alanin) als *tert*-Butylester kommerziell erhältlich (Tab. 13, Einträge 1a und 1b).

-CONH₂: Carbonsäureamide

Carbonsäureamide wurden ungeschützt eingesetzt (Einträge 1c, 1d, 2 und 3b).

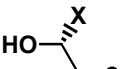

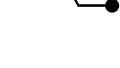

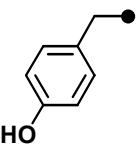

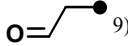

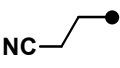

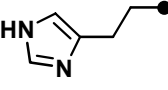

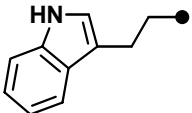

Tab. 13: Produktreinheiten bei Anwendung von bifunktionellen Aminbausteinen R-NH₂ in der Synthese der Tripeptide **19** an Rink-Linker modifizierter Zellulose



Nr.	R●		Lösungsmittel	Trimer 19 [%]	n ¹⁾
1a		X = OH, n = 1 ²⁾	H ₂ O [2.5 M]	68 	1
1b		X = OH, n = 2 ²⁾	H ₂ O [3 M]	85 	1
1c		X = NH ₂ , n = 1	H ₂ O [5 M]	78 	1
1d		X = NH ₂ , n = 2	H ₂ O [5 M]	69 	1
2				NMP [50%] ³⁾	96
3a		X = NH ₂ , n = 1 ⁴⁾	NMP [50%] ³⁾	93 	1
3b		X = NHAc, n = 1	NMP [50%] ³⁾	99 	1
3c		X = , n = 3	H ₂ O [3 M]	43 ⁵⁾ 	2
3d		X = OSO ₃ H, n = 1	H ₂ O [2 M]	59 	2
3e		X = OPO ₃ H ₂ , n = 1	H ₂ O [3 M]	17 	3
3f		X = SH, n = 1 ⁶⁾	NMP [3 M]	82 ⁷⁾ 	1
3g		X = SH, n = 2 ⁶⁾	NMP [3 M]	84 ⁷⁾ 	1

¹⁾ Zahl der durchgeführten Synthesen; ²⁾ Die zugrunde liegende Carbonsäure war als *tert*-Butylester geschützt; ³⁾ Vol-%; ⁴⁾ Das zugrunde liegende Diamin war mono-Boc-geschützt; ⁵⁾ Seitenkettenacyliertes Produkt: 10%; ⁶⁾ Die zugrunde liegenden Mercaptane waren *S*-Trityl geschützt; ⁷⁾ Bei der Abspaltung wurde Triisopropylsilan (5%) zugesetzt, Disulfid-Dimer: 3% bzw. 4%, Tritylfragment bei der Berechnung der Reinheit nicht berücksichtigt.

Fortsetzung Tab. 13:

Nr.	R-●		Lösungsmittel	Trimer 19 [%]	n ¹⁾
4a		X = H	NMP [50%] ³⁾	90 ⁸⁾ 	7
4b		X = Me	NMP [50%] ³⁾	97 	1
5			NMP [2 M]	95 	1
6		⁹⁾	NMP [50%] ³⁾	80 ¹⁰⁾ 	1
7			NMP [50%] ³⁾	96 	1
8			NMP [1.5 M]	64 ¹¹⁾ 	3
9			NMP [1.5 M]	73 	1

⁸⁾ Seitenkettenacyliertes Produkt: 6%; ⁹⁾ Die Synthese erfolgte aus dem entsprechenden Dimethylacetal; ¹⁰⁾ Nebenprodukt: 20% Aldol-Dimerisierungsprodukt; ¹¹⁾ Nebenprodukt: 8% bicyclisches Produkt **87**.

-NH₂: Primäre Amine

Primäre Amine in der Seitenkette werden zur Peptoidsynthese zweckmäßigerweise mit einer Boc-Gruppe geschützt. Einige einfach geschützte Diamine sind kommerziell erhältlich. Aus den entsprechenden Diaminen lassen sie sich auch im hohen Ausbeuten nach A.P. Krapcho *et al.* herstellen.^[147] (Eintrag 3a)

-NH-C(NH)NH₂: Guanidine

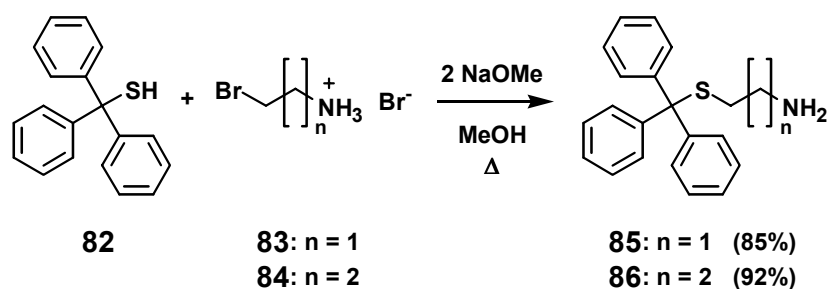
Im Verlauf dieser Arbeit wurde von T. Uno *et al.* von Schwierigkeiten bei der Synthese doppelt-Boc-geschützter Guanidin-Seitenkettenfunktionen für Sub-Monomer-Bausteine berichtet und ein neuer Zugang zu 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-geschützten Produkten vorgeschlagen.^[130] Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Guanidin-Funktionalität gänzlich ohne Schutzgruppe einzubringen, vor dem Hintergrund, daß auch Protonierung der sehr basischen Gruppe einen ausreichenden Schutz bewirken kann (Eintrag 3c).^[137,148]

-OPO₃H₂: Phosphate und -OSO₃H: Sulfate

Phosphorylierte Hydroxyfunktionen spielen im Organismus eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Proteinaktivitäten.^[149] Die kommerziell verfügbaren, einfachen Aminoethyl-ester der Phosphorsäure und der Schwefelsäure sollten daher auf ihre Anwendbarkeit in der SPOT-Synthese hin getestet werden, um einen Zugang zu Phospho- und Sulfato-Peptoiden zu erhalten. Wie schon bei den ungeschützten Amino-Guanidinen macht auch hier die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel den Einsatz erst möglich (Einträge 3d und 3e).

-SH: Thiole

Thiole in der Seitenkette sind insbesondere im Hinblick auf Cyclisierungen interessant. Das *S*-Trityl-geschützte Mercaptoethylamin (**85**) läßt sich leicht nach F.I. Carroll *et al.* aus Triphenylmethanthiol (**82**) und 2-Aminoethylbromidhydrobromid (**83**) herstellen.^[150] Auf dem gleichen Weg wurde das CH₂-homologe Mercaptopropylamin (**86**) aus 3-Aminopropylbromidhydrobromid (**84**) synthetisiert (Einträge 3f und 3g).

-OH: Alkohole/Phenole

Auf der Basis der positiven Ergebnisse in Abschnitt 3.3.1.2 wurden Hydroxyfunktionalitäten ungeschützt eingesetzt (Einträge 4a, 4b und 5).

-CHO: Aldehyde

Um die Bildung Schiff'scher Basen zu vermeiden, sollten Aldehyde acetalgeschützt eingesetzt werden. Die Dimethylacetale des Aminoacetaldehyds und 2-Aminopropionaldehyds sind kommerziell erhältlich (Eintrag 6 und Tab. 11, Seite 60, Eintrag 6).

-CN: Nitrile

Nitrile wurden ungeschützt eingesetzt (Eintrag 7).

Imidazole

Der Imidazolring des Histamins wurde ungeschützt eingesetzt (Eintrag 8).

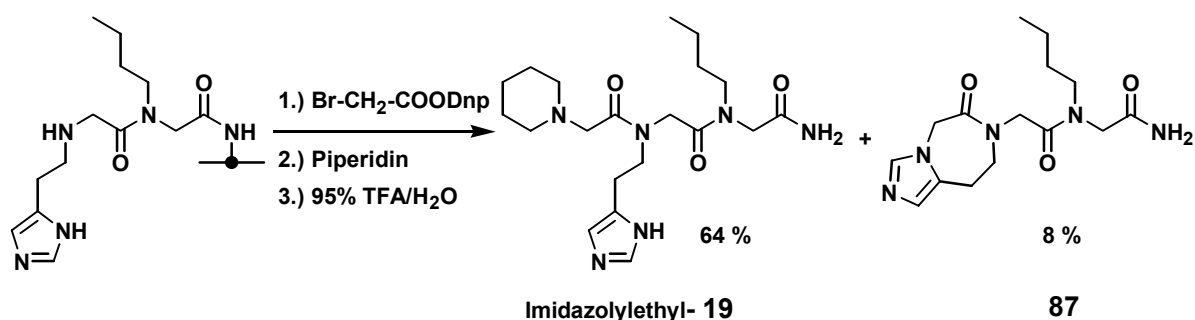
Indole

Indol Seitenketten wurden ungeschützt eingesetzt (Eintrag 9).

Die Ergebnisse zeigen, daß neben einfachen Alkyl- und Aryl-Resten auch eine große Anzahl von Seitenkettenfunktionalitäten in Reinheiten zwischen 64% und 99% zugänglich sind

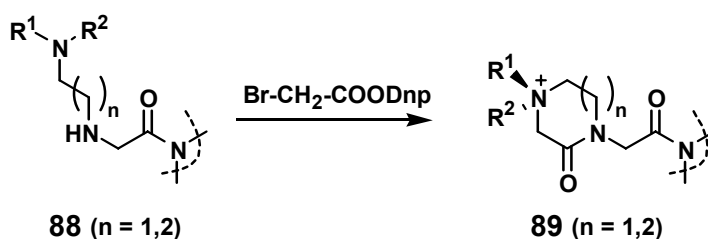
(Carbonsäuren, Carbonsäureamide, primäre Amine, Thiole, Alkohole, Phenole, Aldehyde, Nitrile, Imidazole, Indole).

Die Seitenkettenveresterung, die beim primären Alkohol noch zu 6% beobachtet wurde, trat beim sekundären Alkohol aus sterischen Gründen nicht mehr auf (Einträge 4a und 4b). Für Histamin mit einer Imidazol-Trityl-Schutzgruppe wurden Nebenreaktionen beschrieben^[104] – dennoch konnte das Test-Tripeptoid Imidazolylethyl-**19** hier bei Verwendung von ungeschütztem Histamin in einer Reinheit von 64% neben nur 8% des beschriebenen bicyclischen Nebenproduktes **87** erhalten werden (Eintrag 8). Der Verzicht auf eine Schutzgruppe scheint die Cyclisierung in diesem Fall (evtl. durch Protonierung des Imidazols) zu unterdrücken.



Mit niedrigen Ausbeuten von 43% bzw. 59% eignen sich die hier getesteten Bausteine zur Einführung von Guanidin- oder Sulfat-Seitenkette allenfalls zur Synthese kurzer Oligopeptide. Trotz einiger Versuche, den pH-Wert der Aminlösung zu variieren, ließ sich eine Phosphat-Seitenkette nur in 17% Reinheit erhalten. Der Baustein ist offenbar nicht zur Synthese geeignet. (Einträge 3d und 3e)

Eine interessante Gruppe von Diaminen wurde bereits als ungeeignet für die Peptoid-Synthese beschrieben^[104]: Amine, die eine tertiäre Aminofunktion im Abstand von 3-4 Atomen vom Rückgrat tragen. Entsprechende Peptoide **88** quaternisieren bei der Bromacetylierung spontan zu cyclischen Produkten **89**.



3.3.3.2 Seitenkettenfunktionalitäten der proteinogenen Aminosäuren

Im Hinblick auf die Ähnlichkeit der Peptoide mit den Peptiden sowie deren potentielle peptidmimetische Eigenschaften sind unter den verwendbaren Aminen diejenigen von besonderem Interesse, die zu Seitenketten der 20 proteinogenen Aminosäuren führen. Mit den im vorangegangenen Abschnitt gemachten Untersuchungen lassen sich alle entsprechenden funktionellen Gruppen in Peptoide einbringen. Dabei ist es allerdings oftmals nicht möglich, einen gleichen Abstand der Funktionalität vom Oligomeren-Rückgrat

zu wahren, da die entsprechenden Strukturen nicht stabil wären (z.B. *N*-Acylhemiaminal-Strukturen im Falle der Ser/Thr-Seitenketten). In Tab. 14 sind die zugänglichen Bausteine zusammengestellt.

Tab. 14: Zugänglichkeit der Sub-Monomer-Bausteine zur SPOT-Synthese von Peptoiden mit Seitenketten, die denen der proteinogenen Aminosäuren entsprechen. In der Zeile „0“ ist der Abstand zum Oligomeren-Rückgrat identisch mit den entsprechenden Peptiden. Bei „-1“ bzw. „+1“ ist der Abstand um eine Methylengruppe kürzer bzw. länger.

	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu
-1	+ ¹⁾	-	-	68%	-	-	-	-	+	-
0	+ ¹⁾	-	68%	85%	96%	+ ¹⁾	+ ²⁾	+	+	+
+1	+ ^{1,2)}	82%	85%	+ ²⁾	+	+ ¹⁾	64%	+ ²⁾	+	+

	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr
-1	-	-	+ ^{1,2)}	78%	+ ²⁾	78%	-	-	-	80%
0	+	78%	+ ¹⁾	69%	+ ²⁾	-	-	-	+ ²⁾	95%
+1	+ ²⁾	69%	+ ¹⁾	+ ²⁾	43%	90%	97%	+	73%	+

Legende: Prozentangaben: Reinheiten, die mit den entsprechenden Bausteinen im Modell-Tripeptoid **19** erreicht wurden (vergl. Tab. 11 - Tab. 13 im vorangegangenen Abschnitt); „+“: Baustein, wenn nicht anders vermerkt, im Rahmen dieser Dissertation getestet (Daten innerhalb dieser Arbeit nicht gezeigt); „-“: Synthese nicht möglich.
¹⁾ Verwendung des entsprechenden Fmoc-geschützten *N*-Alkylglycinbausteins (Monomer-Methode); ²⁾ Entsprechender Baustein nicht getestet, Synthese prinzipiell möglich.

3.3.4 Zusammenfassung: Möglichkeiten und Grenzen der Peptoid-Synthese

Aufgrund der speziellen Bedingungen der SPOT-Synthese wie einer besonderen Reaktionskinetik durch Verdampfung der Lösungsmittel oder der Anwesenheit von Hydroxyfunktionen des Zellulosesträgers ergeben sich Unterschiede zur Synthese an Harzen.

Es konnte gezeigt werden, daß Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) optimal für die SPOT-Synthese an Zellulose geeignet ist.

Amine sollten in hoher Konzentration (2-5 M) in NMP oder DMSO gelöst eingesetzt werden. Bei sehr polaren Aminen ist die Anwendung von Wasser als Lösungsmittel möglich. Nach der Synthese einer Reihe von Tripeptoiden konnten Kriterien bestimmt werden, nach denen die Eignung von Aminen für die SPOT-Synthese eingeschätzt werden kann:

Ein primäres Amin ist für die Peptoid-Synthese an Zellulose geeignet, wenn es

- einen Siedepunkt über ca. 50°C besitzt;
- *keine* α -Verzweigung (R-CH₂-NH₂) oder *eine* α -Verzweigung als Teil eines 5-Ringes (Cyclopentylamine) aufweist;
- *eine* α -Verzweigung aufweist und ein Anteil von 10-20% Abbruchsequenz im Produkt toleriert wird;
- zu einer der folgenden Verbindungsklassen gehört: Alkylamin, Arylamin (wenn es elektronenreicher als Anilin selbst ist), Hydroxylamin, Acylhydrazin, Aminoalkohol, -phenol, -carbonsäureamid, -nitril, -indol oder -imidazol;
- eine der folgenden Funktionalitäten in der Seitenkette trägt, die mit einer geeigneten Schutzgruppe versehen ist: Hydrazin (Boc), primäres/sekundäres Amin (Boc), Thiol (Trityl), Carbonsäure (*tert*-Butyl) oder Aldehyd (Acetal).

Es werden dabei Tripeptide in einer Reinheit von 62% bis 99% erhalten.

Mit Nebenprodukten ist die Verwendung von Aminen mit freien Alkylsulfat- und Guanidin-Funktionen in der Seitenkette verbunden. In Rahmen von Synthesen kurzer Oligomere (z.B. Trimere) kann eine Verwendung jedoch erwogen werden.

Ungeeignet sind u.a. Amine, die an ein tertiäres Zentrum gebunden sind, Alkylhydrazine, und 2-Hydroxyaniline. Elektronenreiche Aniline sind zwar für die Synthese von Peptoiden, nicht aber für die Acylierung mit Fmoc-Aminosäureanhydriden nach der Monomer-Methode (Peptomer-Synthese^[110]) geeignet.

Trotz der abgeleiteten Gesetzmäßigkeiten ist bei Aminen, die in der SPOT-Synthese von Peptoiden noch nicht eingesetzt wurden, ein chemischer Test durch die Synthese des Tripeptoids **19** zu empfehlen. Auch die genaue Einhaltung aller Syntheseparameter ist von großer Bedeutung für die Synthesequalität. Insbesondere sollte der Derivatisierungsgrad nach der Membranalkylierung und Kopplung des Linkers im Bereich von 200-1400 nmol/cm² liegen, um eine zur Analyse ausreichende Produktmenge zu erhalten.

4 Identifizierung bioaktiver Peptoide de novo

Für die Suche nach Liganden für Proteine und anderen bioaktiven Verbindungen existieren zwei grundlegend unterschiedliche Ansätze:

1. Identifizierung und Optimierung eines bindenden Moleküls auf der Basis einer bekannten aktiven Verbindung, z.B. eines Rezeptors oder eines natürlich vorkommenden Peptids.
2. Suche nach einer aktiven Verbindung *de novo*, d. h. ohne strukturelle Vorinformationen zu nutzen.

Die erste Methode ist naturgemäß direkter als die zweite Methode, da sie sich an einer bereits aktiven Struktur, der sogenannten Leitstruktur, orientiert. Die zweite Methode birgt ein hohes Potential, da bioaktive Verbindungen ohne Vorinformationen gefunden und zudem völlig neuartige aktive Strukturen identifiziert werden können. Ziel des *de novo* Ansatzes ist nicht die direkte Auffindung hochaffiner Liganden, sondern die Identifizierung einer *neuen* aktiven Substanz im Sinne einer Leitstruktur. Diese soll dann ihrerseits als Ausgangspunkt zu weiteren Optimierungen dienen.

Bei der *de novo* Methode müssen deutlich mehr Verbindungen getestet werden, um eine aktive Verbindung zu finden als bei der zielgerichteten Synthese, da die Trefferwahrscheinlichkeit aufgrund der fehlenden Vorinformationen deutlich geringer ist. Die Entwicklung von Bindungsstudien mit hohem Durchsatz (*High Throughput Screening*, HTS) lieferten eine erste Voraussetzung zur Durchführung von *de novo* Ansätzen.^[151] Eine zweite Voraussetzung war die Einführung der kombinatorischen Chemie, die eine ausreichende Zahl an Verbindungen innerhalb kurzer Zeit zur Verfügung stellen kann.^[152] Die SPOT-Synthese an Zellulose besitzt in diesem Zusammenhang ein hohes Potential, da in *einer* Synthese bis zu 8000 verschiedene Verbindungen innerhalb einer Woche parallel synthetisiert werden können.

Auf der Ebene von Peptiden war es bereits gelungen, die Erkennungsmotive von Antikörpern (Epitope) *de novo* mittels SPOT-Synthese zu identifizieren (Übersichten in Lit.^[44,45]). Im Rahmen dieser Arbeit sollte am Beispiel von Peptoiden untersucht werden, ob sich auch nichtpeptidische Liganden für den auf peptidischer Ebene gut untersuchten monoklonalen Antikörper Tab-2^[41,42,49,50] identifizieren lassen.

4.1 Chemische Voraussetzungen

Bei den Untersuchungen des vorangegangenen Abschnitts wurden die Peptoide stets auf einer Fläche synthetisiert, die eine zur Analyse ausreichende Substanzmenge trägt („große“ SPOTs). Typischerweise wurden die Substanzen an SPOTs im Abstand von etwa 1 cm synthetisiert und nach Ausstanzen einer 0.23 cm² großen Fläche aus der SPOT-Mitte analysiert.

Um Bindungsstudien mit membrangebundenen Substanzen durchzuführen, reichen weitaus geringere Substanzmengen und damit verbunden kleinere SPOTs aus. In mehreren

Untersuchungen wurden Bindungsstudien mit zellulosegebundenen Peptiden durchgeführt, die mit einem SPOT-Abstand von ca. 2.2 mm und einer Dichte von ca. 21 SPOTs / cm² synthetisiert wurden, so daß auf einer typischen Membran (19 x 28 cm) etwa 8000 SPOTs sowie Kontrollen Platz fanden.^[41,45,96] Der Vorteil dieser Methode lag auf der Hand: eine große Zahl an Verbindungen ließ sich simultan an einem Träger synthetisieren und ohne großen apparativen Aufwand auf Bindung testen.

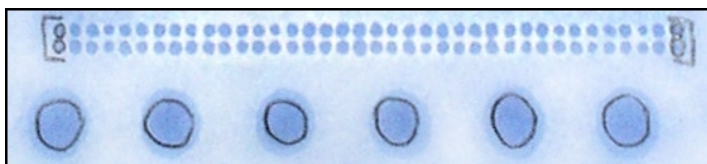
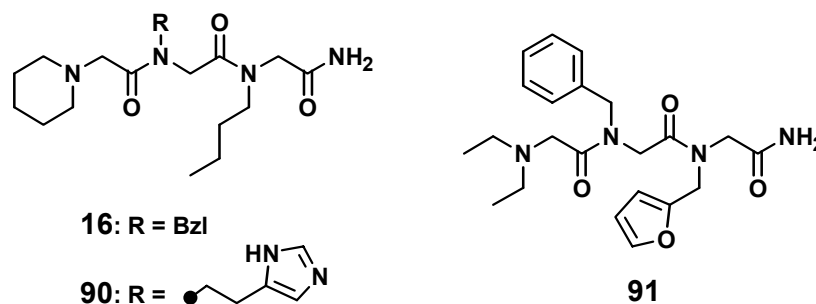


Abb. 21: Zellulosemembran (9.4 x 2.1 cm) mit „großen“ und „kleinen“ SPOTs im Vergleich. Die Aminogruppen des Rink-Linkers wurden durch Inkubation mit Bromphenolblau angefärbt. Die Markierungen wurden mit Bleistift gemacht.

Bevor auch Peptoid-Bibliotheken mit 8000 Verbindungen pro Membran synthetisiert werden konnten, sollte die Synthesequalität an „kleinen“ SPOTs anhand von drei Modelltrimeren untersucht werden. Die Verbindungen wurden dazu unter den entsprechenden Bedingungen synthetisiert (automatische Pipettierung, geringe SPOT-Größe und kleiner SPOT-Abstand; vergl. Abb. 21). Die Synthesequalität sollte mit der an „großen“ SPOTs erreichbaren verglichen werden. Da der verwendete Syntheseroboter die Pipettierung unterschiedlicher Volumina innerhalb eines Synthesecyclus, wie sie zur Erzeugung unterschiedlich großer SPOTs benötigt werden, nicht unterstützte, wurden größere SPOTs durch mehrfaches Pipettieren an die gleiche Stelle erzeugt. Zur Analyse wurden zehn „kleine“ SPOTs mit identischer Sequenz synthetisiert und zusammen analysiert, um eine ausreichende Substanzmenge zu erhalten.

In Tab. 15 sind die Produktreinheiten bei der Synthese an unterschiedlich großen SPOTs gegenübergestellt. Es läßt sich erkennen, daß die Reinheiten der Tripeptide, die von „kleinen“ SPOTs (Durchmesser: ca. 1.2 mm) erhalten wurden, etwa 2/3 der Werte von „großen“ SPOTs erreichen. Eine etwas geringere Synthesequalität wurde jedoch erwartet, da der Randbereich, der durch kleine Unterschiede im Pipettiervolumen Fehlsequenzen trägt, bei der Analyse „kleiner“ SPOTs mit untersucht wurde, während er bei den „großen“ SPOTs ausgespart werden konnte. Bei der quantitativen Auswertung der Ergebnisse von Bindungsstudien werden auch bei „kleinen“ SPOTs nur die SPOT-Zentren berücksichtigt, wo mit großer Wahrscheinlichkeit höhere Reinheiten als am Rand vorliegen. Durch die erfolgreiche Miniaturisierung der SPOT-Größe konnte die Peptoid-Synthese auf „kleine“ SPOTs übertragen werden.

Tab. 15: Produktreinheiten bei einer vergleichenden Synthese der Tripeptide **16**, **90** und **91** auf „großen“ und „kleinen“ SPOTs an Rink-Linker derivatisierter Zellulosemembran.



Tripeptoid	Reinheit an „großem“ SPOT [%] ¹⁾	Reinheit an „kleinem“ SPOT [%] ²⁾
16	98	69
90	63	42
91	90	57

¹⁾ Analyse der SPOT-Mitte (0.23 cm²) ohne Randbereich. Substanzmenge pro „großem“ SPOT: 170 nmol [nach Quantifizierung der Fmoc-Schutzgruppe des Rink-Linkers]; ²⁾ Gemeinsame Analyse von jeweils zehn „kleinen“ SPOTs (je 0.01 cm²), ohne den SPOT-Rand zu entfernen. Substanzmenge pro „kleinem“ SPOT: 8.3 nmol [nach Fmoc wie in ¹⁾].

4.2 Biochemische Voraussetzungen: Bindung eines Antikörpers als Modellsystem

Der monoklonale Antikörper Tab-2 erkennt die lineare Sequenz VVSHFND aus dem *N*-Terminus des *transforming growth factor-α* (TGF- α).^[42,49] Dessen Bindungsspezifität gegenüber dem Peptid wurde durch eine Substitutionsanalyse bestimmt (vergl. Abb. 4, Seite 4). Dabei zeigt sich, daß die Bindung im *C*-terminalen Bereich des Peptids (SHFND) durch Kontakte zu den Seitenketten charakterisiert ist, während an den Positionen der beiden *N*-terminalen Valin-Bausteine Kontakte zum Rückgrat bestehen.^[41] Durch kombinatorische Peptid-Bibliotheken an Zellulose und unter Verwendung der *phage-display*-Technik konnte das Bindungsmotiv auch *de novo* identifiziert werden.^[42,50] Dieser allgemeine Ansatz ermöglicht dabei prinzipiell auch die Identifizierung von zuvor unbekanntem, bindenden Peptiden mit Sequenzen, die sich von derjenigen des Antikörper-Epitops unterscheiden. Während im Falle von mAk Tab-2 hauptsächlich ähnliche Sequenzen gefunden wurden, gelang es, für den Antikörper mAk CB4-1 völlig verschiedene Sequenzen auf kombinatorischem Weg zu identifizieren.^[94]

Bei *de novo* Strategien in der Peptidchemie an Zellulose wurde im allgemeinen mit Peptiden aus 6-14 Aminosäuren gearbeitet, die in 2-3 Positionen eine definierte Aminosäure besitzen, während die anderen Positionen randomisiert vorliegen. Ein SPOT einer solchen Bibliothek

kann beispielsweise eine Sequenz der Art XXB_1B_2XX besitzen, in der die mittleren Positionen zwei bestimmte Aminosäuren B_1 und B_2 tragen, während an den übrigen Positionen Mixturen aus allen 20 Aminosäuren zur Synthese eingesetzt werden, so daß letztlich eine sehr große Zahl an Sequenzen/SPOT vorliegt.

Da durch die, verglichen mit der Peptidsynthese, geringere Synthesequalität der Peptoide die Synthese längerer Sequenzen erschwert war, sollte zunächst versucht werden, ein bindendes trimeres Peptoid für mAk Tab-2 zu identifizieren. Der monoklonale Antikörper sollte dabei als Modellsystem für die Identifikation von Proteinbindung im Hinblick auf Affinität und Spezifität dienen. Dabei war die Verfügbarkeit und Stabilität des Proteins sowie die Verfügbarkeit von Bindungsdaten auf Peptidebene für die Auswahl ausschlaggebend. Es wurde aufgrund der geringen Molekülgröße eine relativ schwache Bindung erwartet, so daß keine Mischungen sondern einzelne, definierte Verbindungen auf jedem SPOT synthetisiert werden sollten. Bei Verwendung von 20 Bausteinen läßt sich an einer Zellulosemembran (19 x 28 cm) der vollständige Sequenzraum von 8000 (= 20 x 20 x 20) Tripeptoiden synthetisieren.

4.3 Identifizierung Antikörper-bindender Tripeptide

Basierend auf 20 Bausteinen sollte eine Bibliothek aller 8000 möglichen Tripeptide **92** synthetisiert werden. Dabei sollten sich die Bausteine nach Möglichkeit stark unterscheiden, um möglichst verschiedene Tripeptide zu erhalten. Der Auswahl wurden die folgenden Kriterien zugrunde gelegt:

1. Es sollten möglichst viele verschiedene funktionelle Gruppen vertreten sein, die die Strukturelemente Wasserstoff-Donor (HD) und -Akzeptor (HA), aromatischer Ring (Ar), hydrophobe Kontaktmöglichkeit (Lip) sowie bei neutralem pH-Wert in wäßrigen Lösungen positiv (+) sowie negativ (-) geladene Gruppen beinhalten.
2. Die Auswahl der Reste sollte funktionelle Gruppen der proteinogenen Aminosäuren beinhalten.
3. Der Satz an Bausteinen sollte auf der Grundlage einer Berechnung des Verteilungskoeffizienten zwischen Wasser und *n*-Octanol (logP) das Polaritätsspektrum möglichst gleichmäßig abdecken.
4. Für die Bausteine sollte auf der Basis der in Abschnitt 3.3.3 gemachten Untersuchungen und der daraus abgeleiteten allgemeinen Prinzipien (vergl. 3.3.4) eine hohe Synthesequalität zu erwarten sein.

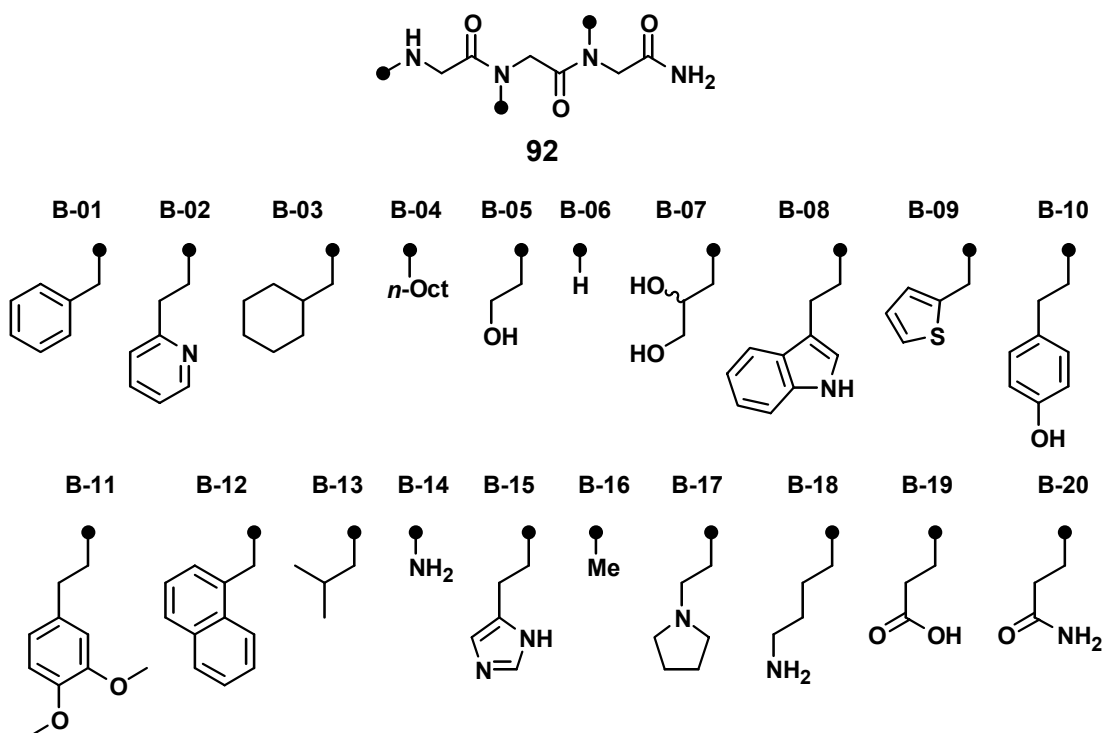


Abb. 22: 20 Bausteine zur Synthese einer Bibliothek aus Tripeptiden **92** (*n*-Oct = *n*-Octyl).

Die gewählten Bausteine (Abb. 22) erfüllen diese Kriterien in folgender Weise:

1. Funktionelle Gruppen (Einzelne Bausteine können mehreren Strukturelementen zugeordnet sein):

HD: **B-05, B-06, B-07, B-08, B-10, B-14, B-15, B-17, B-18, B-20**

HA: **B-02, B-05, B-07, B-10, B-11, B-14, B-15, B-19, B-20**

Ar: **B-01, B-02, B-08, B-09, B-10, B-11, B-12, B-15**

Lip: **B-03, B-04, B-13**

+ : **B-15, B-17, B-18**

- : **B-19**

2. Seitenketten, die den proteinogenen Aminosäuren gleichen, haben (ohne Berücksichtigung des korrekten Abstandes zum Rückgrat):

B-01: Phe; **B-05**: Ser; **B-06**: Gly; **B-08**: Trp; **B-10**: Tyr; **B-13**: Leu; **B-15**: His; **B-16**: Ala; **B-18**: Lys; **B-19**: Glu; **B-20**: Gln

3. Die Verteilung der LogP-Werte der den Aminbausteinen entsprechenden *N*-Methylacetamide **93** ist in Abb. 23 wiedergegeben.
4. Alle Bausteine entsprechen den in Abschnitt 3.3.4 zusammengefaßten Kriterien, so daß eine ausreichend hohe Synthesequalität erwartet wurde. Mit Ausnahme der Bausteine **B-14** und **B-18** (Boc) sowie **B-19** (*t*Bu) wurden alle Bausteine ohne Seitenkettenschutzgruppe eingesetzt. Die Bausteine **B-06** und **B-16** wurden nicht nach der Sub-Monomer-Methode synthetisiert, sondern mittels ihrer entsprechend Fmoc-geschützten Monomerbausteine eingebracht

(Fmoc-Gly-OH für **B-06**, Fmoc-Sar-OH für **B-16**). Es zeigte sich zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit, daß die Verwendung der Bausteine **B-02** und **B-17** aufgrund ihrer tertiären Stickstoffatome zu Nebenreaktionen führt (vergl. Betrachtungen zu den Peptoiden **88** auf Seite 69). Trimere, die diese Bausteine in den beiden C-terminalen Positionen enthielten, wiesen daher vermutlich nicht die gewünschte Struktur auf.

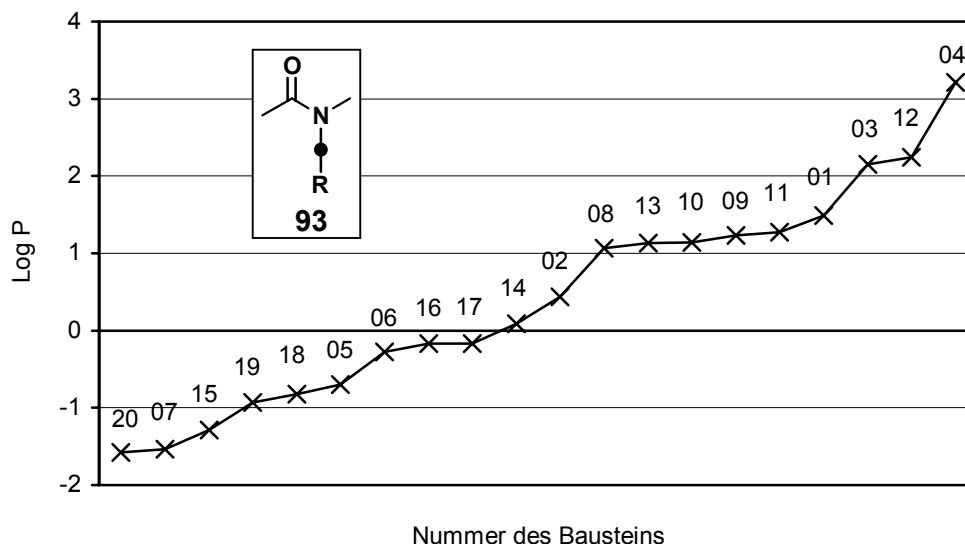
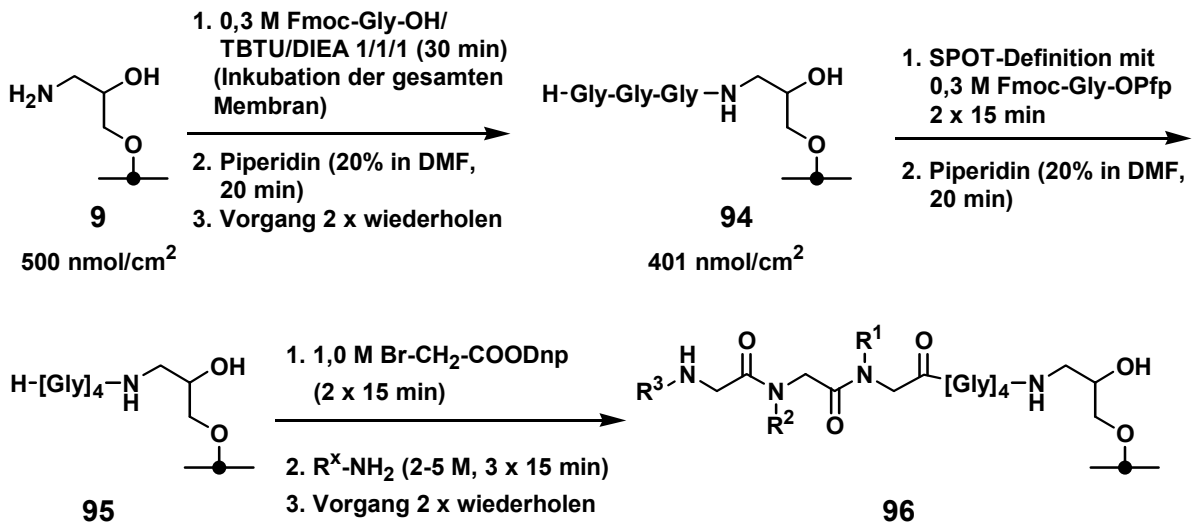


Abb. 23: LogP-Werte der *N*-Methylacetamide **93** der 20 Bausteine (R-• = **B-1** - **B-20**), die zur Synthese einer Tripeptoid-Bibliothek verwendet wurden (Berechnet mit ChemDraw Ultra, Cambridge Soft; zur Identität der Bausteine vergl. Abb. 22).

Die Bibliothek wurde zu einem relativ frühen Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit synthetisiert. Daher wurde die Synthese an einer Zellulosemembran **9** durchgeführt, die mit Epibromhydrin und anschließend Ammoniak anstelle des später verwendeten 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamins (**37**) derivatisiert wurde (Derivatisierungsgrad: 500 nmol/cm²). Um ein flexibles Abstandselement einzuführen, ging der Synthese des Tripeptoids die Einführung einer Tetraglycin-Einheit voraus, bei der die drei ersten Bausteine durch Inkubation der gesamten Membran eingeführt wurden. Die so erhaltenen Triglycin-derivatisierte Zellulosemembran **94** (Derivatisierungsgrad: 401 nmol/cm²) diente als Grundlage für die SPOT-Synthese mit Hilfe des Pipettierroboters, wobei die SPOT-Definition mit dem vierten Glycinbaustein (Fmoc-Gly-OPfp) zur Membran **95** durchgeführt wurde (Schema 17).



Schema 17: Synthese der membrangebundener Tripeptide **96**.

Um die Synthese zu kontrollieren wurde am Rand der Membran das Tripeptoid **16** (aus den Aminen *n*-Butylamin, Benzylamin und Piperidin) synthetisiert. Der Synthese ging dazu die Kopplung des *N*-terminal Fmoc-geschützten Rink-Linkers anstelle des vierten Glycinbausteins voraus, um eine Abspaltung und Analyse zu ermöglichen. Die Reagenzien wurden für jeden Kopplungszyclus manuell pipettiert, um SPOTs der notwendigen Größe zu erhalten. Die Analyse nach der Abspaltung ergab das gewünschte Tripeptoid in einer Reinheit von 45% als Hauptprodukt (HPLC). Die Synthesequalität war zwar niedriger als erwartet, die Tatsache, daß das Produkt als Hauptkomponente vorhanden war, ließ die Qualität als ausreichend für eine Festphasen-Bindungsstudie erscheinen.

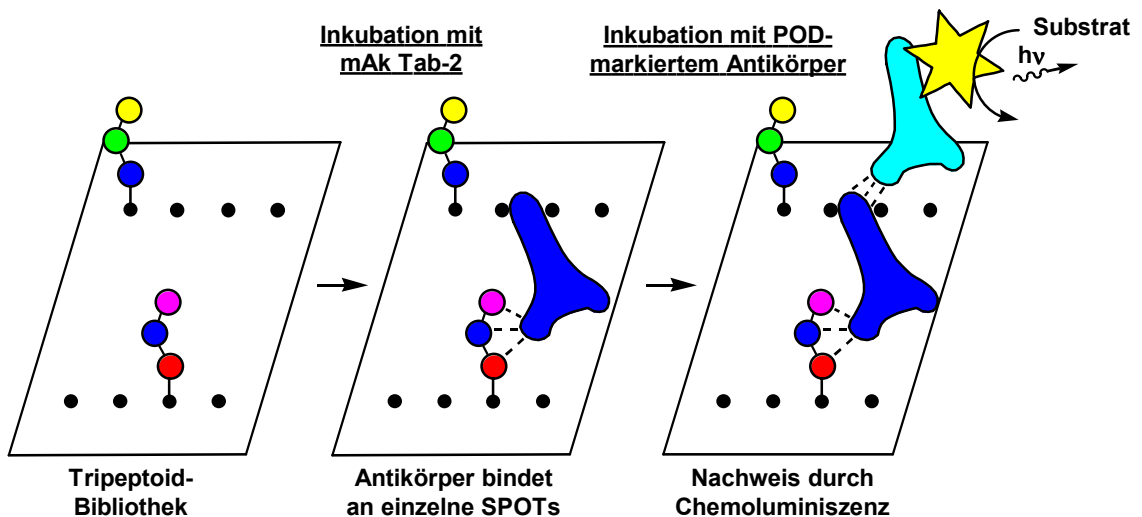


Abb. 24: Festphasen-Bindungsstudie einer zellulosegebundenen Tripeptoid-Bibliothek (POD = Meerrettich-Peroxidase, Substrat: Chemolumineszenz-Substrat auf Luminol-Basis).

Die Membran wurde in einer Festphasen-Bindungsstudie mit dem Antikörper mAk Tab-2 inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit einem zweiten, Meerrettichperoxidase-markierten Antikörper durch eine Chemolumineszenzreaktion nachgewiesen (Abb. 24). Die

digitale Detektion (LumiImager™) ermöglichte darüberhinaus eine quantitative Bestimmung der Signalintensitäten. Als Kontrolle ging der Inkubation mit mAk Tab-2 eine Behandlung der Membran mit dem zweiten Antikörper voraus, die keine Signale zeigte.

Das Ergebnis der Bindungsstudie ist in Abb. 25 dargestellt. Anstelle von einzelnen bindenden Tripeptoiden, die eine sequenz- und seitenkettenspezifische Erkennung signalisieren würden, werden Bindungsmuster beobachtet. Diese werden durch eine positionsabhängige Bindung einzelner Reste verursacht: In der C-terminalen Position erfolgt eine Bindung des Antikörpers bevorzugt an die Reste **B-01** (Benzyl), **B-03** (Cyclohexylmethyl) und **B-04** (*n*-Octyl), erkennbar an Signalen in den entsprechenden Spalten der Membran. Da sich in den Zeilen keine ausgeprägten durchgehenden Muster erkennen lassen, scheint der Antikörper dort keine Seitenketten zu bevorzugen. Am auffälligsten sind jedoch die starken Signale für diejenigen Tripeptide, die den Baustein **B-03** (Cyclohexylmethyl-) in der N-terminalen Position tragen.

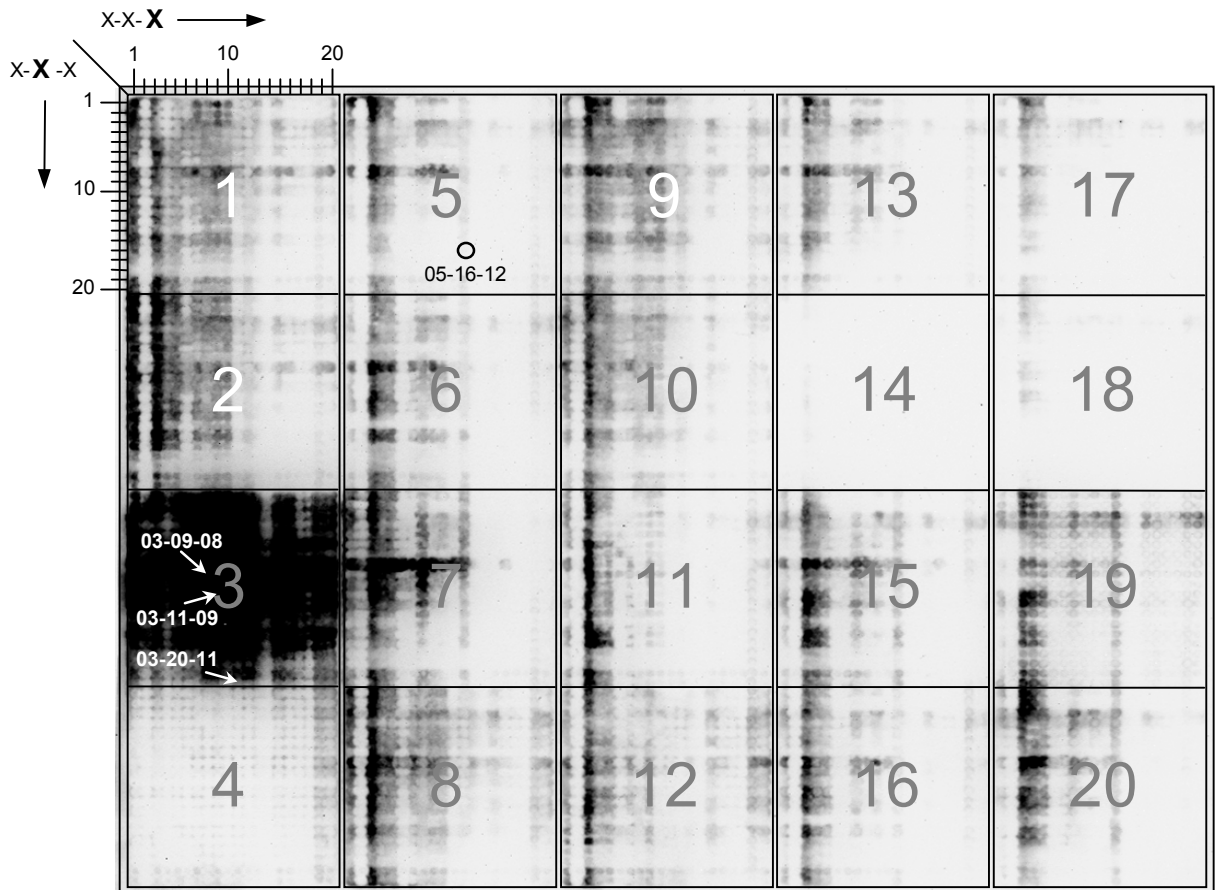


Abb. 25: Bindung von mAk Tab-2 an eine Bibliothek aus 8000 trimeren Peptoiden, die auf 20 Bausteinen basieren. Peptide in den 20 markierten Blöcken besitzen den gleichen N-terminalen Baustein, Substanzen in einer Zeile gleichen sich im mittleren Baustein, in den Spalten ist jeweils der C-terminale Baustein identisch. Die markierten Verbindungen wurden später am Syntheseharz resynthetisiert.

Zur besseren Übersicht ist in Abb. 26 eine Ausschnittsvergrößerung des dritten Quadranten mit veränderter Gradationskurve gezeigt. In dieser Einstellung läßt sich erkennen, daß von den Tripeptoiden mit N-terminalem Cyclohexylmethylrest (**B-03**) diejenigen ein besonders

intensives Signal zeigen, die in der mittleren Position einen der aromatischen Reste **B-08**, **B-09**, **B-10**, **B-11** oder **B-12** tragen (Zeilen), wenn gleichzeitig *C*-terminal ein Thiophenmethyl- (**B-09**) bzw. *p*-Hydroxyphenethyl-Rest (**B-10**) vorliegt (Spalten).

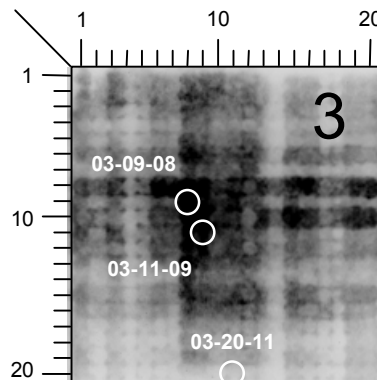
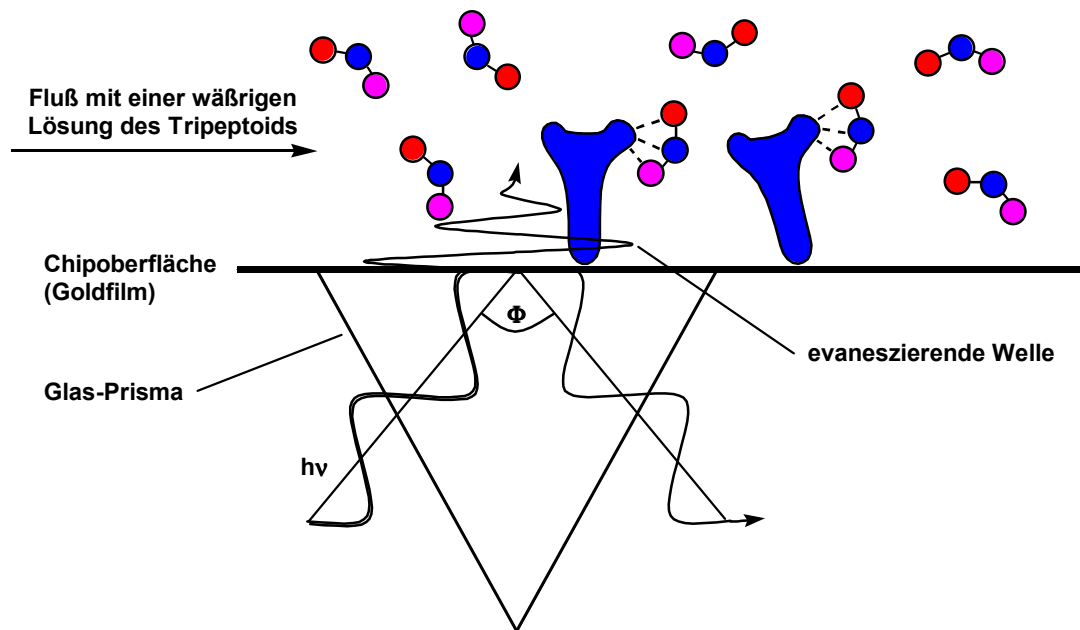


Abb. 26: Ausschnittsvergrößerung von Block 3 in Abb. 25 (Baustein **03** in der *N*-terminalen Position), dargestellt mit veränderter Gradationskurve verglichen mit Abb. 25.

Um zu überprüfen, ob eine spezifische Bindung an das Paratop des Antikörpers vorlag und wenn ja, wie stark diese Bindung ist, wurden vier Substanzen ausgewählt und am



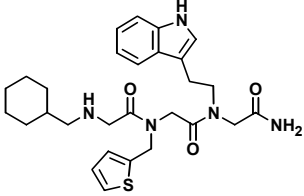
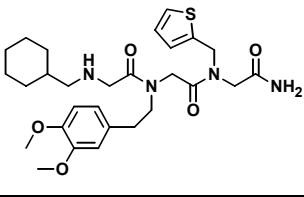
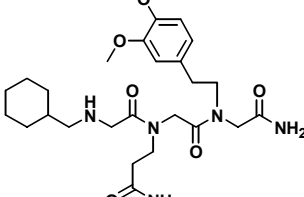
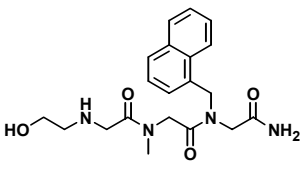
Schema 18: Vereinfachte Darstellung der Messung von Bindungsaffinitäten durch Oberflächen-Plasmonenresonanz: Monochromatisches, polarisiertes Licht ($h\nu$) wird unter Totalreflektionsbedingungen durch ein Prisma auf eine Grenzfläche Glas/Wasser eingestrahlt. Ein Anteil des Lichtes (evaneszierende Welle) dringt dennoch, begünstigt durch eine Goldbeschichtung, in das wässrige Medium in der direkten Nähe der Oberfläche ein (bis ca. 300 nm). Die resultierende Abschwächung des reflektierten Lichts ist bei einem bestimmten Winkel Φ maximal (Resonanz). Die Resonanzbedingung hängt vom Brechungsindex des wässrigen Mediums und damit von der Masse der an der Oberfläche gebundenen Substanzen ab (hier: Antikörper und Tripeptide).

Syntheseharz synthetisiert (vergl. Markierungen in Abb. 25 und Abb. 26, die Bezeichnung der Substanzen bezieht sich auf die Nummer der Bausteine vom *N*- zum *C*-Terminus, die Strukturen finden sich in Tab. 16). Dabei wurden zwei Peptide mit sehr intensiven Signalen (**03-09-08** und **03-11-09**), eine Substanz mit einem schwachen Signal aus dem auffällig aktiven Block 3 [*N*-terminaler Cyclohexylmethyl-Rest (**B-03**) **03-20-11**] sowie eine inaktive Substanz als Negativkontrolle (**05-16-12**) gewählt. Die Substanzen wurden in mäßigen bis sehr guten Ausbeuten (24% - 93%) und guten Reinheiten (76% - 89%) als Salze der Trifluoressigsäure erhalten. Sie wurden ohne weitere Reinigung für die Bindungstests eingesetzt.

Die Bindung wurde durch Messung der Resonanzbedingung eines in die goldbeschichtete Oberfläche eines Glas-Chips eingekoppelten Lichtanteils (evaneszente Welle) bestimmt (Oberflächen-Plasmonenresonanz, Schema 18, vergl. Lit.^[153,154]). Sie hängt u.a. vom Brechungsindex des Mediums in direkter Nähe der Oberfläche (ca. 300 nm) und damit von der Masse der dort gebundenen Moleküle ab. Aus der Änderung des Wertes bei einer Behandlung der Oberfläche mit Lösungen der Tripeptide lassen sich so Rückschlüsse auf die Menge der vom immobilisierten Antikörper gebundenen Substanzmenge ziehen. Die Messung wurde nach einem Standardprotokoll^[154] durchgeführt (Gerät: Biacore X). Unspezifische Wechselwirkungen wurden durch Subtraktion des Signals einer Vergleichs-Meßzelle, die den Antikörper mAk TE-33 der gleichen Antikörper-Klasse (Maus-IgG) trug, herausgemittelt. Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten wurden die in einer Konzentrationsreihe bestimmten Primärdaten nach der *Steady-State*-Methode berechnet (Programm: Bia-Evaluation^[154]). Die Daten ließen sich dabei sehr gut anpassen, was sich in einer deutlichen Unterschreitung des empfohlenen Bereichs für den engsten Kurvenfit zeigte. Der Fehler der gesamten Meßmethode ist weniger leicht zu quantifizieren. Für das Antikörper-Epitop VVSHFND-NH₂ wurde in dieser Messreihe eine Dissoziationskonstante von $K_D = 20$ nM bestimmt. In einer anderen Messreihe an einem Gold-Chip, der den Vergleichs-Antikörper mAk CB4-1 trug, wurde eine Dissoziationskonstante von $K_D = 31$ nM bestimmt^[155], so daß in diesem Fall ein Fehler von $\pm 30\%$ abgeschätzt werden kann.

Wie in Tab. 16 gezeigt ist, konnten für die Tripeptide Dissoziationskonstanten im μ M-Bereich gemessen werden: für das Tripeptoid **97** (**03-09-08**) wurde eine Dissoziationskonstante von $K_D = 282$ μ M und für **98** (**03-11-09**) sogar $K_D = 87$ μ M bestimmt. Die Verbindung **100** (**05-16-12**), welche als Negativkontrolle synthetisiert wurde, zeigte wie erwartet bis zur höchsten gemessenen Konzentration (2 mM) keine Bindung. Allerdings konnte auch eine Bindung für das Trimer **99** (**03-20-11**) gemessen werden ($K_D = 225$ μ M), das als eine zweite Negativkontrolle dienen sollte, welche den *N*-terminalen Cyclohexylmethyl-Rest zusammen mit einer ungünstigen Kombination der übrigen Reste trägt. Eine Erklärung könnte sein, daß das *C*-terminale, freie Amid in **99** an der Bindung in Lösung beteiligt ist, während die Verankerung an der Membran die Wechselwirkung bei der Bindungsstudie an Zellulose verhinderte.

Tab. 16: Signalintensitäten von vier Tripeptoiden bei der Festphasen-Bindungsstudie (BLU) mit dem Antikörper mAk Tab-2 sowie Dissoziationskonstanten (K_D) der freien Tripeptide, bestimmt durch Oberflächen-Plasmonenresonanz.

	Sequenz	Struktur	BLU	K_D [μM]
97	03-09-08		738.708	282
98	03-11-09		624.489	87
99	03-20-11		88.364	225
100	05-16-12		13.976	> 2000

4.4 Identifizierung Antikörper-bindender Hexapeptide

Die Ergebnisse der Untersuchung der Tripeptide legten den Schluß nahe, daß die beobachtete Bindung zu einem hohen Anteil auf den Wechselwirkungen eines einzelnen (*N*-terminalen Cyclohexylmethyl-)Restes beruhte. Um ein Peptoid zu finden, das mehrere bindende Kontakte ausbildet, und das somit durch additive Effekte zu einer stärkeren Bindung befähigt ist, sollte daher eine Bibliothek von Hexapeptoiden synthetisiert werden, die dem Antikörper eine größere molekulare Kontaktfläche präsentieren können. Zusätzlich sollte ein größerer Satz an Bausteinen gewählt werden.

Beide Bedingungen erhöhen jedoch die Zahl der möglichen Verbindungen enorm (Tab. 17). Kann auf einer Membran noch der gesamte Sequenzraum der auf 20 Bausteinen basierenden Tripeptide synthetisiert werden, so lassen sich mit 8000 Hexapeptoiden nur 0.013% der möglichen Sequenzen synthetisieren. Erhöht man die Zahl der Bausteine und damit die eingebrachte Diversität auf das doppelte, so sind mit 8000 Verbindungen nur noch 0.00020% des Sequenzraumes repräsentiert. Trotz dieses geringen Ausschnitts aus dem Sequenzraum wurden mit solchen Bibliotheken auf der Basis von Peptiden erfolgreich bindende

Substanzen gefunden, wenn die Sequenzen statistisch ausgewählt wurden.^[156] Der Hintergrund dieser Erfolge ist vermutlich die Tatsache, daß Antikörper oft relativ kleine Bereiche erkennen (4-12 Aminosäuren^[70]), die darüberhinaus eine gewisse Bandbreite an ähnlichen Resten tragen dürfen (Supertope^[94]). Zusätzlich ermöglicht die Bindungsstudie an Zellulose auch, relativ schwache Bindungsaffinitäten zu detektieren.^[45] Auf der Basis dieser Ergebnisse sollte eine entsprechende Bibliothek aus 8000 Hexapeptoiden synthetisiert und auf Bindung zum Antikörper mAk Tab-2 untersucht werden.

Tab. 17: Größe des Sequenzraumes in Abhängigkeit von der Oligomerenlänge und der Anzahl der Bausteine. Zusätzlich ist der Anteil des Sequenzraumes tabelliert, der von 8000 Verbindungen abgedeckt wird.

Oligomerenlänge	Zahl der Bausteine	Größe des Sequenzraumes	Anteil des Sequenzraumes, der von 8000 Verbindungen abgedeckt wird
3	20	$20^3 = 8000$	100%
6	20	$20^6 = 6.4 \cdot 10^7$	0.013%
6	40	$40^6 = 4.1 \cdot 10^9$	0.00020%

Es wurden 40 Bausteine gewählt, was der maximalen Zahl der am Pipettierroboter verfügbaren Reagenzienplätze entspricht. Die Kriterien zur Auswahl stimmten dabei mit denjenigen bei der Synthese der Tripeptoid-Bibliothek überein. Bis auf fünf Ausnahmen wurden daher die Bausteine der Trimeren-Bibliothek übernommen [(1,2): Für die Bausteine **B-02** und **B-17** wurden in Vergleichsexperimenten Nebenreaktionen beobachtet, so daß sie nicht mehr eingesetzt wurden; (3,4,5): Die Bausteine **B-04**, **B-11** und **B-12** wurden durch die Bausteine **B-40**, **B-39** und **B-45** ersetzt.]. Das Spektrum der Seitenkettenfunktionalitäten wurde anschließend durch Hinzufügen weiterer Peptoidbausteine auf 40 ergänzt (Abb. 27). Prolin und Pipecolinsäure wurden als „Peptoide“ hinzugenommen, die eine Verbrückung zum Rückgrat aufweisen. Um auch mögliche Proteinkontakte zu gestatten, die in einer Position auf eine α -Alkylierung neben einer unsubstituierten Amidbindung unbedingt angewiesen sind, wurde das Peptoidkonzept dahingehend modifiziert, daß auch L-Alanin zu den Bausteinen hinzugenommen wurde. Die drei letztgenannten Aminosäuren wurden, wie schon Glycin und Sarcosin, unter Verwendung der entsprechenden Fmoc-geschützten Bausteine nach der Monomer-Methode eingebracht.

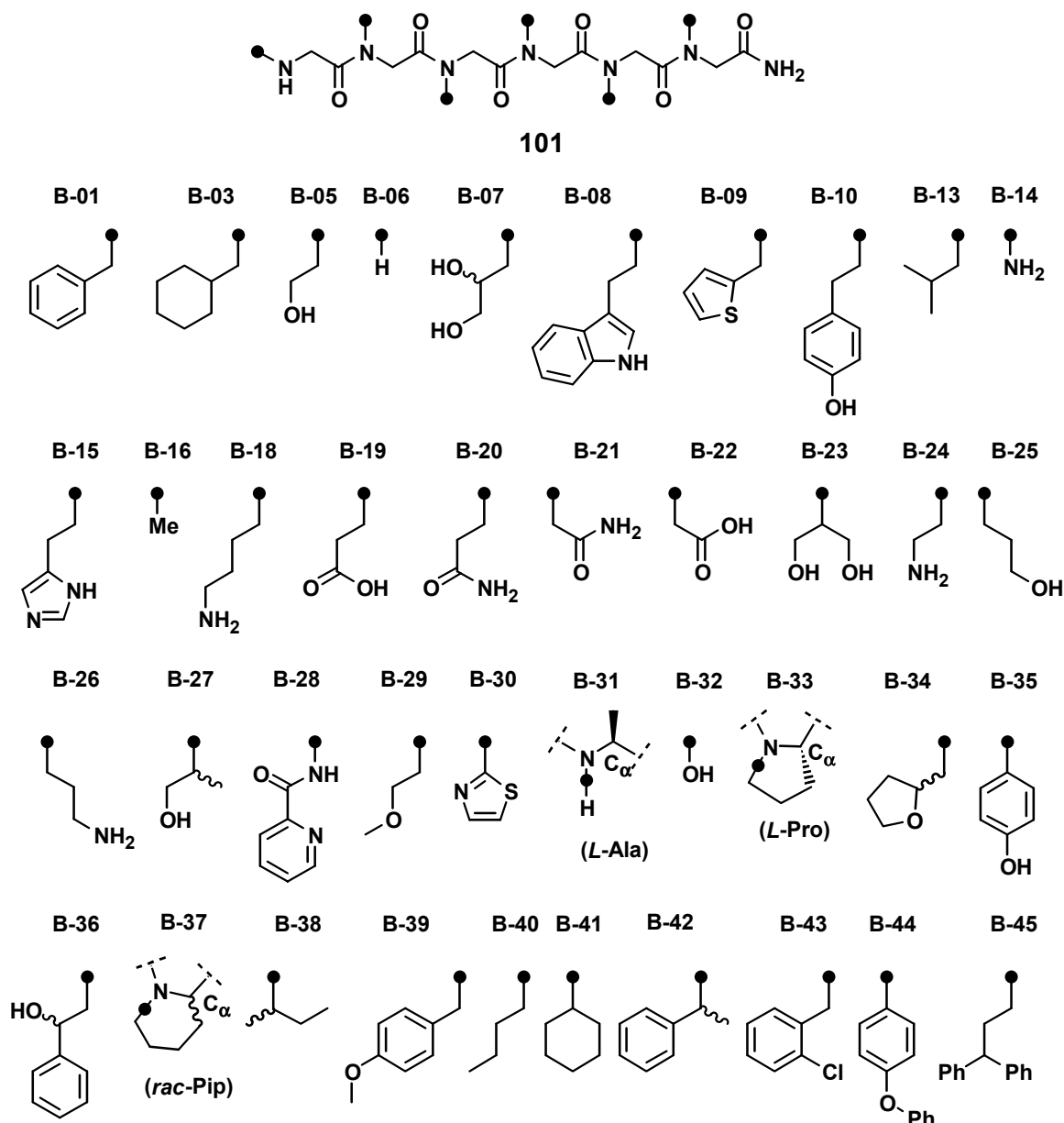


Abb. 27: 40 Bausteine zur Synthese einer Bibliothek aus Hexapeptoiden **101**. Für die Bausteine, bei denen die α -Position des Rückgrates beteiligt ist (**B-31**, **B-33** und **B-36**) wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit ein Teil des Rückgrates mit dargestellt (Pip = Pipecolinsäure).

Mit Hilfe des Programmes LISA wurden 8000 Hexamerensequenzen basierend auf 40 Monomerbausteinen erzeugt. Jede einzelne Position in jedem Hexapeptoid wurde dabei zufällig gewählt.

Die Synthese wurde, wie der überwiegende Teil der Synthesen in dieser Arbeit, an einer Zellulosemembran **38** durchgeführt, die unter Verwendung von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**) derivatisiert wurde. Im Gegensatz zur Synthese der Tripeptoid-Bibliothek wurde daher auf Tetraglycin als abstandhaltendes Element verzichtet. Nach der Definition der SPOTs mit Fmoc- β -Ala-OPfp (Derivatisierungsgrad: 387 nmol/cm²) wurden die Hexapeptide direkt mit Hilfe des Pipettierroboters synthetisiert. Da ein Synthesecyclus zwischen 6 und 9 Stunden dauerte (Doppel- bzw. Dreifachkopplung), wurden die

Reagenziengefäße zusätzlich mit Aluminiumfolie verschlossen, um eine Verflüchtigung von Lösungsmitteln und Reagenzien zu minimieren. Eine Öffnung minimaler Größe wurde direkt vor Beginn der Synthese eingeführt.

Am Rand der Membran wurde zur Kontrolle der Synthesebedingungen das Tripeptoid **16** sowie acht Hexapeptide synthetisiert (drei Modellverbindungen mit Seitenketten, die in hoher Ausbeute koppeln sowie fünf Verbindungen, die exemplarisch aus der Bibliothek gewählt wurden). Um die Abspaltung und nachfolgende Analytik zu ermöglichen, wurde statt β -Alanin der Rink-Linker zur SPOT-Definition gekoppelt. Ausreichend große SPOTs wurden erhalten, indem man die Reagenzien an der betreffenden Stelle 45 mal pipettieren ließ. Die Analyse mittels HPLC-MS nach der Abspaltung vom Linker ergab die gewünschten Peptide in durchschnittlich 48% Reinheit (HPLC) und in sieben Fällen als Hauptprodukte (Tab. 18). Die Synthesequalität wurde als zufriedenstellend für eine Bindungsstudie bewertet.

Tab. 18: Reinheiten der Kontrollpeptide bei der Synthese der Hexapeptoid-Bibliothek. Gekennzeichnet ist darüberhinaus, ob das gewünschte Produkt das Hauptprodukt darstellt.

Peptoid ¹⁾	Reinheit [%] ²⁾	Hauptprodukt	Peptoid ¹⁾	Reinheit [%] ²⁾	Hauptprodukt
46-01-40³⁾	84	+	29-44-05-16-26-31⁵⁾	55	+
46-01-40-20-01-40⁴⁾	63	+	14-36-36-16-33-03⁵⁾	47	+
46-01-40-20-01-34⁴⁾	76	+	15-45-27-30-08-44⁵⁾	11	-
33-29-27-13-19-10⁴⁾	42	+	23-25-22-03-28-13⁵⁾	< 10 ⁷⁾	-
33-38-24-21-20-29⁵⁾	44 ⁶⁾	+	Mittelwert:	48	+(7) -(2)

¹⁾ **B-46**: Piperidin (50% in NMP); ²⁾ HPLC, 220 nm; ³⁾ entspricht **16**; ⁴⁾ Modellverbindungen; ⁵⁾ Hexamere zufällig aus der Bibliothek ausgewählt; ⁶⁾ die Reinheit ließ sich nur schwer bestimmen, da das Produkt sehr polar und das Signal bei HPLC daher breit ist; ⁷⁾ Substanz vermutlich zusätzlich verunreinigt von Verbindungen gleicher RT.

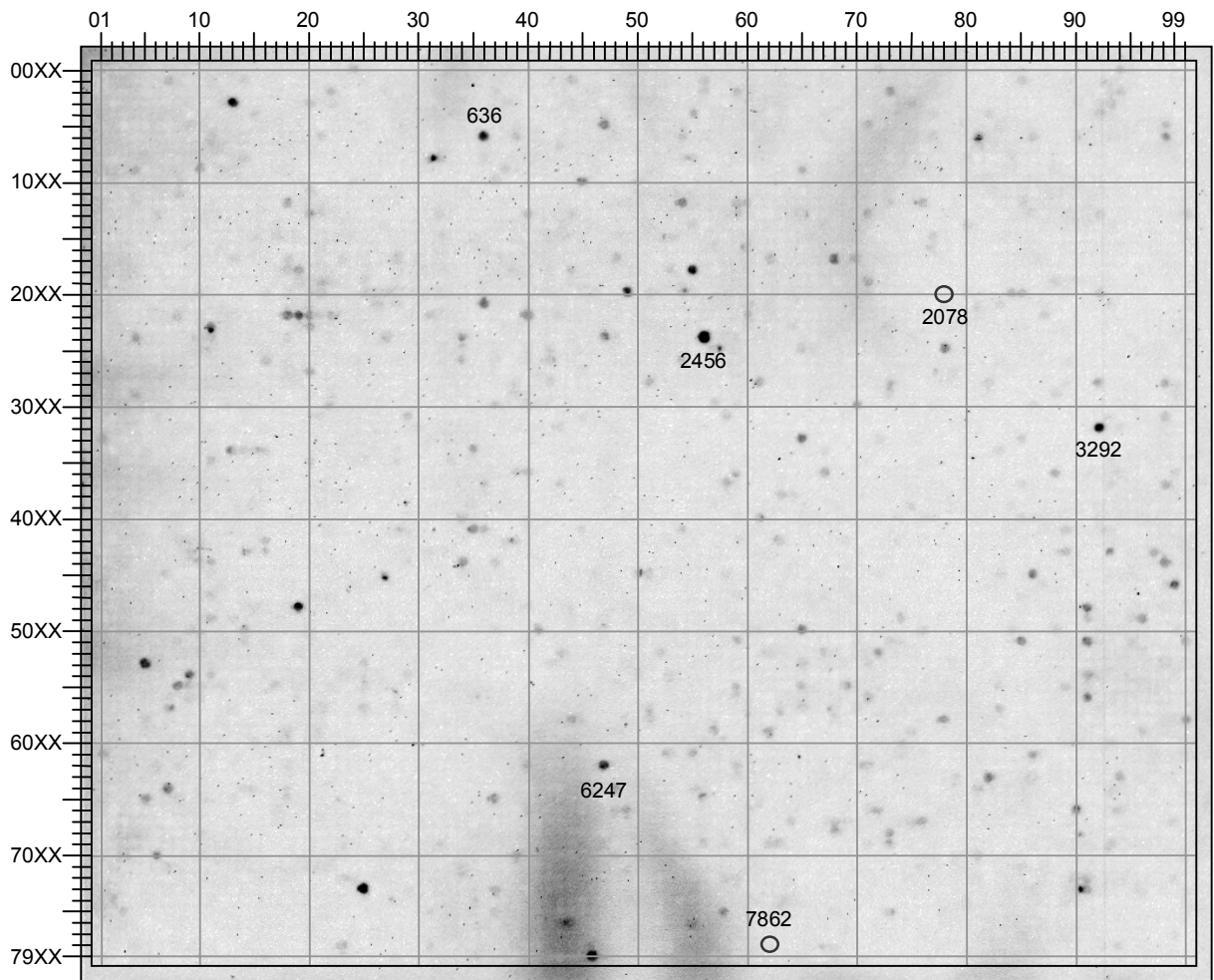


Abb. 28: Bindung von mAk Tab-2 an eine Bibliothek aus 8000 hexameren Peptoiden, deren Sequenzen aus 40 Bausteinen nach dem Zufallsprinzip generiert wurden. Auf einem SPOT wurde stets nur eine Sequenz synthetisiert. Die markierten Verbindungen wurden später am Syntheseharz resynthetisiert (eingekreiste Verbindungen: Negativ-Kontrollen).

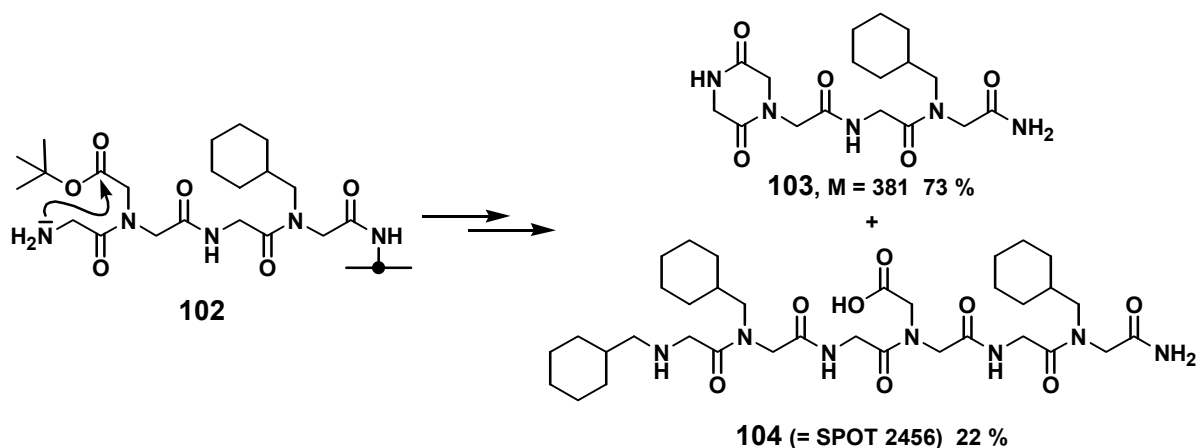
Das Ergebnis der Bindungsstudien der membrangebundenen Hexapeptide auf Bindung des Antikörpers mAk Tab-2 ist in Abb. 28 dargestellt (auch hier wurde in einer Kontrollinkubation mit dem zweiten Antikörper kein Signal beobachtet). Im Gegensatz zur Trimeren-Bibliothek sind hier wesentlich weniger, dafür aber deutlicher vom Hintergrund abgegrenzte Signale zu beobachten. Aus den 15 stärksten Signalen wurden vier Sequenzen gewählt, die am Syntheseharz resynthetisiert wurden (SPOT-Nummern **2456**, **3292**, **6247** und **636**, vergl. Tab. 19). Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, daß nicht zu viele unpolare Gruppen im Molekül vorhanden waren, damit die Verbindung zum Zwecke der Bindungsstudie in ausreichend hoher Konzentration in Wasser löslich ist. Zusätzlich wurden zwei nicht-bindende Sequenzen gewählt (**2078** und **7862**).

Bei der Resynthese der gewählten Verbindungen wurden in drei Fällen sequenzspezifische Nebenreaktionen beobachtet. Da sie vermutlich in der gleichen Weise auch an der Zellulose aufgetreten sind, sind die erhaltenen Verbindungen dennoch zur Reproduktion der Ergebnisse des Festphasen-Screenings geeignet.

Tab. 19: Sequenzen und Signalintensitäten (BLU) der SPOTs mit höchster Signalintensität in Abb. 28. Die kursiv hervorgehobenen Verbindungen wurden am Syntheseharz resynthetisiert und auf Bindung getestet. Die Nummerierungen der Verbindungen beziehen sich auf die Reste in Abb. 27.

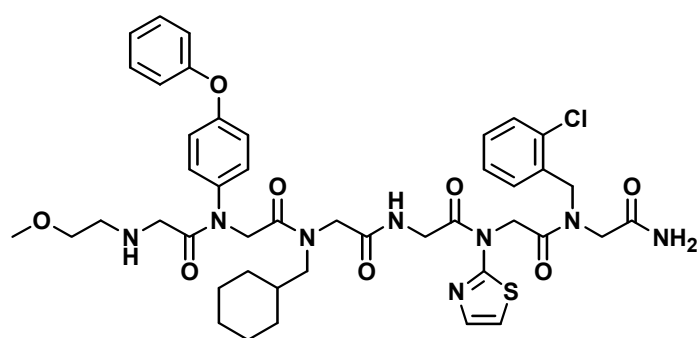
SPOT-Nummer	BLU	Sequenz (Bausteine B-XX)	SPOT-Nummer	BLU	Sequenz (Bausteine B-XX)
2456 (1)	78923	<i>03-03-06-22-06-03</i>	636 (10)	33200	<i>39-26-03-31-39-03</i>
7325 (2)	49361	03-25-43-13-01-43	2311 (11)	32372	32-03-06-28-16-39
3292 (3)	43956	<i>29-44-03-06-30-43</i>	2049 (12)	30231	03-26-39-10-34-10
7946 (4)	43673	33-03-36-09-16-45	2219 (13)	30148	42-39-19-09-08-03
313 (5)	41557	13-01-41-38-39-03	831 (14)	29113	28-03-08-09-33-41
4819 (6)	40215	44-29-41-03-03-43	5409 (15)	27669	08-45-01-20-44-03
5305 (7)	37365	43-03-06-10-10-45			
1855 (8)	34586	03-06-13-42-34-45	7862	15379	<i>15-37-29-22-40-39</i>
6247 (9)	33598	<i>32-22-39-03-13-43</i>	2078	14569	<i>33-31-26-38-18-39</i>

Die Synthese von **104**, dem Hexapeptoid von SPOT **2456**, lieferte hauptsächlich ein Produkt der Masse $M = 381$, wobei es sich um das Diketopiperazin **103** handelte. Es bildete sich aus dem Vorläufer **102** durch Angriff der *N*-terminalen Aminogruppe auf die Esterbindung des vorangegangenen Bausteins. Eine analoge Bildung von Diketopiperazinen ist beispielsweise aus der Peptidchemie bekannt, wenn Prolinester (= Ester einer *N*-Alkylaminosäure) mit α -Aminosäuren acyliert werden. Da die Cyclisierung nicht mit sekundären Aminen stattfindet, war im vorliegenden Fall die ungünstige Abfolge von Glycinesterseitenkette und Glycinbaustein (mit primärer Aminofunktion) für die Nebenreaktion entscheidend. Beide

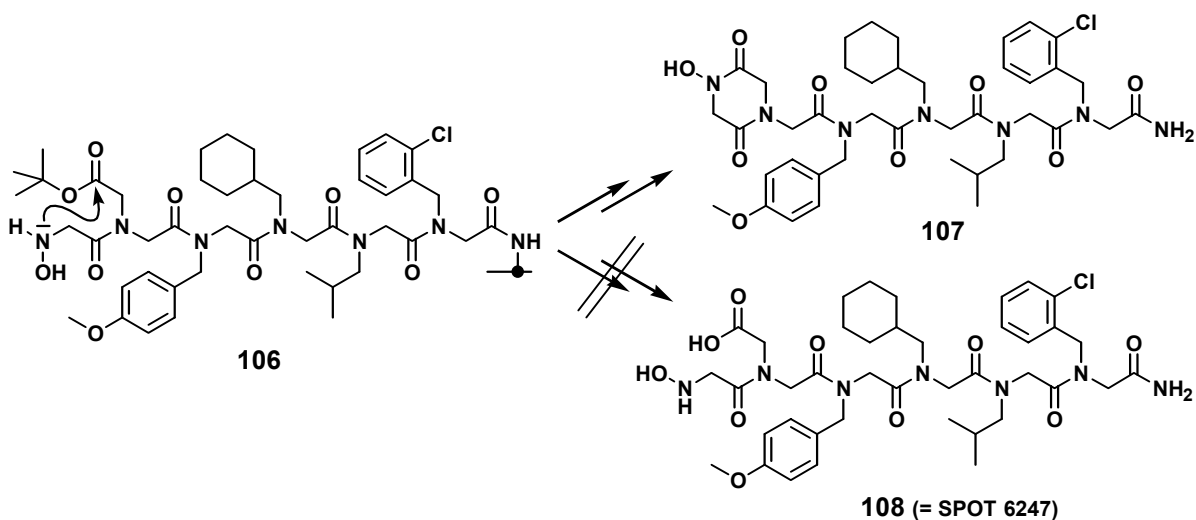


Produkte konnten in ausreichenden Mengen isoliert und somit beide auf Bindung untersucht werden.

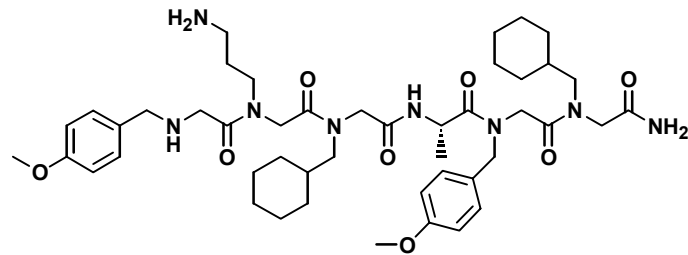
Bei der versuchten Synthese von **105** wurde eine Mischung aus mindestens sechs Substanzen erhalten, die die gewünschte Verbindung nur in 17% Reinheit enthielt. Verantwortlich sind hier die beiden Bausteine, die auf aromatischen Aminen basieren (2-Aminothiazol und 4-Phenoxyanilin). Durch besonders unvollständige Acylierungen, insbesondere bei der Umsetzung des 2-Aminothiazol-Bausteines mit Fmoc-Glycinanhydrid, wurden neben der gewünschten Sequenz auch mehrere Abbruchsequenzen gebildet. Die einzelnen Verbindungen wurden nicht isoliert. Um zu überprüfen, ob sich ein Bindungssignal in Lösung reproduzieren lässt, wurde jedoch die gesamte Mischung untersucht.



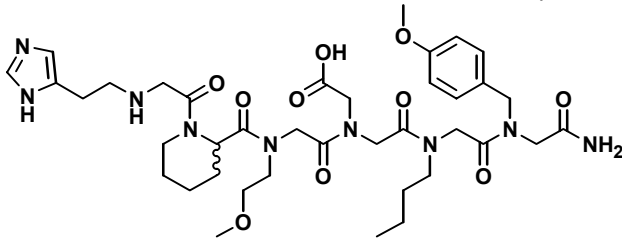
Bei der Synthese von **108** schließlich deutete die um 17 Einheiten verringerte Masse des Produktes wiederum auf eine Diketopiperazinbildung zu **107** hin. Wie schon beim Hexapeptoid **104** lag hier eine besonders ungünstige Sequenz vor: in diesem Fall ermöglichte der besonders nukleophile *N*-hydroxylierte *N*-Terminus des seitenketten-geschützten Hexapeptoids **106** die Cyclisierung zur vorangegangenen *tert*-Butylester-Seitenkette – eine Art der Cyclisierung, die bei *N*-alkylierten, „gewöhnlichen“ Peptoiden nicht beobachtet wird.



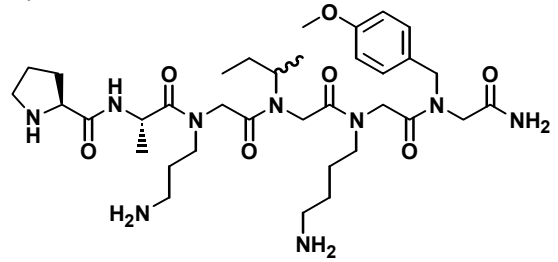
Die Synthesen der Hexameren **109**, **110** und **111** verliefen problemlos und in guten Ausbeuten (54%, 35% und 33%).



109 (= SPOT 636)



110 (= SPOT 7862)



111 (= SPOT 2078)

Mit Ausnahme der bei der Synthese von **105** erhaltenen Mischung wurden alle Substanzen mittels präparativer HPLC gereinigt und in Reinheiten zwischen 89 und 98% als TFA-Salze erhalten. Wie schon bei den Tripeptoiden schloß sich eine Messung der Bindungsaffinitäten an immobilisiertem Antikörper mAk Tab-2 mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz an. Die Ergebnisse sind in Tab. 20 zusammengestellt.

Tab. 20: Dissoziationskonstanten [K_D] von sechs Hexapeptoiden gemessen durch Bestimmung der spezifischen Bindung an den immobilisierten Antikörper mAk Tab-2 mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz. Gekennzeichnet sind Substanzen, die Diketipiperazine (DKP) bei der Harzsynthese bildeten. Die Signalintensitäten (BLU) der Festphasen-Bindungsstudie sind zum Vergleich angegeben (vergl. Tab. 19).

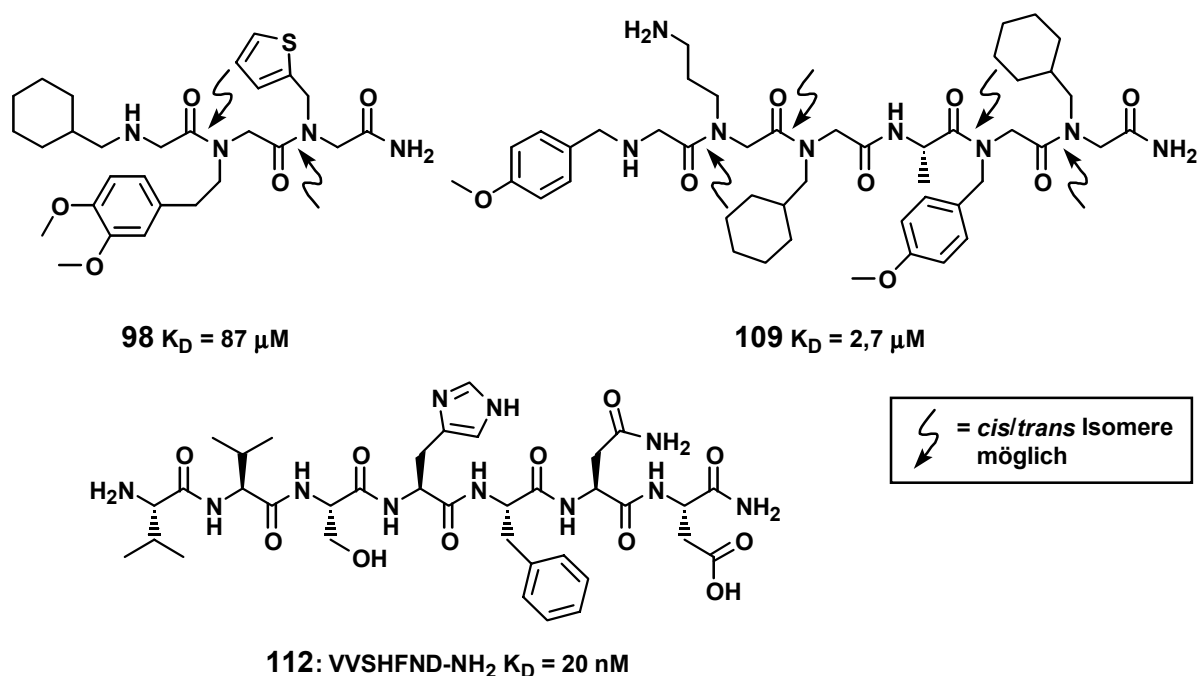
Peptoid (SPOT-Nr.)	Sequenz	BLU	K_D [μM]
104 (2456)	03-03-06-22-06-03	} 78.923	408
103 (DKP, 2456)	06-22-06-03		> 2000
105 (3292)¹⁾	29-44-03-06-30-43	43.956	(163 ²⁾)
107 (DKP, 6247)	32-22-39-03-13-43	33.598	> 500
109 (636)	39-26-03-31-39-03	33.200	2.7
110 (7862)	15-37-29-22-40-39	15.379	> 2000
111 (2078)	33-31-26-38-18-39	14.569	> 2000

¹⁾ Es wurde das Rohprodukt der Synthese eingesetzt (Mischung aus mindestens 6 Substanzen); ²⁾ Um eine Bindungskonstante abschätzen zu können wurde zur Bestimmung das Molgewicht von **105** verwendet, obwohl eine Mischung vorlag.

Die Werte zeigen, daß sich die in der Festphasen-Bindungsstudie gefundenen Bindungen, abgesehen vom Hexameren **107**, auch an den freien Hexapeptoiden bestätigen und quantifizieren lassen. Interessant ist, daß die volle Sequenz von **104**, die bei der Harzsynthese in deutlich geringerer Menge als das Diketopiperazin **103** entstand, offenbar dennoch für die Bindung ($K_D = 408 \mu\text{M}$) verantwortlich ist. Für das Diketopiperazin wurde bis zur höchsten betrachteten Konzentration kein Signal beobachtet. Die Rohmischung, die das Hexamere **105** beinhaltete, zeigte ebenfalls Bindung. Eine Dissoziationskonstante kann jedoch nicht angegeben werden, da es sich um eine Mischung handelt und die bindende Komponente nicht bekannt ist. Unter der Annahme der Molmasse des Hexameren kann der Bereich jedoch auf den μM -Bereich eingegrenzt werden. Da es vermutlich zu ähnlichen Nebenprodukten bei der Synthese an Zellulose kam, spiegelt das Experiment auch hier die Bindungsdaten an Zellulose wider. Für das Hexapeptoid **107**, das *N*-terminal ein Diketopiperazin trägt, konnte bis zur betrachteten Konzentration ($500 \mu\text{M}$) keine Bindung beobachtet werden. Höhere Konzentrationen konnten nicht untersucht werden, da die sehr unpolare Substanz in Wasser nicht in höheren Konzentrationen löslich ist. Die stärkste Bindung zeigte das Hexapeptoid **109** mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 2.1 \mu\text{M}$. Durch diese hohe Affinität ließ sich die Bindung hier nicht nur, wie bei allen anderen Peptoiden, über die im Gleichgewicht an den Chip gebundene Menge (*Steady-State*-Bedingung), sondern auch über den Verlauf der Bindungs-Kinetik auswerten: Die Assoziations- und Dissoziations-Konstanten wurden mit $k_a = 1.13 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_d = 1.55 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ bestimmt, was einer Dissoziationskonstante von $K_D = 1.37 \mu\text{M}$ und damit im Rahmen der Meßgenauigkeit dem Wert aus der Auswertung der Gleichgewichts-

Sättigung entspricht. Die im gleichen Experiment gemessene Dissoziationskonstante des Peptids VVSHFND-NH₂ (**112**), welches dem Tab-2-Epitop von TGF- α entspricht, wurde mit $K_D = 20$ nM aus den kinetischen Konstanten $k_a = 1.10 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_d = 2.18 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Damit entspricht der gemessene Wert in den Fehlergrenzen dem in der Literatur beschriebenen Wert für die Verdrängung des Antikörpers von festphasengebundenem TGF- α mittels ELISA ($IC_{50} = 9.0$ nM).^[41] Mit einem *de novo* gefundenen Hexapeptoid (**109**) konnte also innerhalb eines einzelnen Bindungsexperiments eine Verbindung erhalten werden, die bis auf zwei Größenordnungen an das hochaffine Wildtyp-Peptid heranreicht.

Betrachtet man die Zahl der identifizierten bindenden Peptide (je nach Setzung der Grenzen 10-25), so ergibt sich eine Trefferquote von 0.1-0.3%. Das entspricht einem bindenden Peptoid auf 300-1000 Verbindungen. Bibliotheken mit mehreren tausend Verbindungen wurden folglich in diesem System tatsächlich benötigt, um Liganden mit einer ausreichenden Wahrscheinlichkeit zu finden.



Zur näheren Untersuchung der Strukturen des Tripeptoids **98** sowie des Hexapeptoids **109** wurden ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren der Verbindungen aufgenommen (vergl. Anhang, Seite 179, Abb. 33-Abb. 35). Die Spektren zeigten überlagerte Signale mehrerer Amidbindungs-Isomere. Bei cyclischen und nichtcyclischen dialkylierten Amididen ist die Rotationsbarriere um die Amid-C-N-Bindung hoch genug, um die einzelnen Isomere mittels NMR beobachten zu können.^[119] Für Prolin sowie einige Prolin-Derivate wurden beispielsweise Barrieren von $\Delta G^\ddagger = 70-85$ kJ/mol bestimmt.^[111] Für das Tripeptoid **98** sind maximal vier sowie für das Hexapeptoid **109** sechzehn Isomere möglich (basierend auf zwei bzw. vier dialkylierten Amidbindungen in diesen Molekülen). Die genaue Zahl der wirklich vorliegenden Isomere ließ sich aus den Spektren im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig ablesen, da charakteristische Signale verschiedener Isomere nicht unbedingt unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen müssen. Für die beiden Methoxygruppen in **98** beispielsweise wurden im ¹H-Spektrum vier getrennte Signale

beobachtet, was für mindestens zwei Isomere spricht. Im Bereich 110-158 ppm des ^{13}C -Spektrums wurden jedoch 30 Signale beobachtet, die auf 10 Kohlenstoffatome zurückzuführen sind, was auf das Vorhandensein von mindestens drei der vier möglichen Isomere hindeutet. Schwieriger war die Bestimmung der Zahl der Isomere im Fall des Hexapeptoids **109**. Im Bereich der zwei Methoxygruppen (3.68-3.77 ppm) zeigte das ^1H -Spektrum 12 Signale, was auf mindestens sechs Isomere (von maximal 16) hindeutet. Das ^{13}C -Spektrum ließ sich aufgrund der Vielzahl von Isomeren nicht vollständig auswerten, da die einzelnen Signalintensitäten zu gering waren (zur Diskussion der Peptoid-Struktur vergl. auch Abschnitt 2.4: „*Stukturelle Eigenschaften von Peptoiden*“, Seite 18).

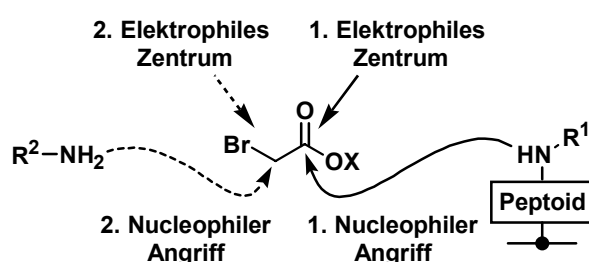
Zur Bindung an ein Protein wie den Antikörper Tab-2 ist ein Molekül im allgemeinen in nur einer Konformation (Aktivkonformation) und damit in nur einer Amidgeometrie befähigt. Die hohe Zahl der Isomere bedeutet allerdings nicht, daß nur ein geringer Anteil der gelösten Substanz zur Bindung zur Verfügung steht. Die Isomerisierungsgeschwindigkeit ist hoch genug ($k_{\text{cis}\rightarrow\text{trans}} = 0.06\text{-}6.0 \text{ s}^{-1}$ bei 300 K für Prolin sowie einige Prolin-Derivate^[111]), um eine Umwandlung der freien Peptoide in die für die Bindung bevorzugte Konformation im Rahmen eines Bindungsexperiments zu gestatten (Die Inkubationszeit mit dem Protein beträgt zwei Stunden). Ferner sind *Induced-Fit*-Mechanismen denkbar, die die Isomerisierung beschleunigen können.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß sich mit jeweils nur einer Bibliothek Tri- bzw. Hexapeptide *de novo* identifizieren lassen, die den Antikörper mAk Tab-2 mit Dissoziationskonstanten im mittleren bis unteren μM -Bereich binden. Die Strukturen der gefundenen Verbindungen unterscheiden sich dabei deutlich von denjenigen des Peptid-Epitops VVSHFND-NH₂ (vergl. **98**, **109** und **112**). Beim Vergleich der Strukturen, auch unter Einbeziehung der weniger affinen Liganden, fällt auf, daß der Antikörper bevorzugt an den Cyclohexylmethyl-Rest (nicht aber an den Benzylrest) sowie an elektronenreiche Aromaten bindet. Da die Bibliothek der Hexapeptide nur einen kleinen Teil des Sequenzraumes abgedeckt hat, sind die gefundenen Substanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht die optimalen Hexameren, die sich auf der Basis der Bausteine identifizieren lassen. Es ist folglich zu erwarten, daß eine Optimierung der Strukturen (z.B. durch eine Reihe von Substitutionsanalysen) zu einer deutlichen Steigerung der Bindungsaffinitäten führen kann.

Von einer Überprüfung der Bindungskonstanten mit einer weiteren biochemischen Methode mußte im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen abgesehen werden. Die gemessenen Daten für das Kontrollpeptid stimmten jedoch gut mit den Literaturwerten, die aus ELISA-Bindungsstudien erhalten wurden, überein.

5 Rückgratmodifizierte Peptoide

In der Peptoid-Synthese nach der Sub-Monomer-Methode macht man sich Bromessigsäure als bifunktionellen Baustein zunutze, der in der Lage ist, zwei Nukleophile (Amine) selektiv unter Aufbau des Peptoid-Rückgrats zu verbinden (Schema 19). Dazu ist es notwendig, daß sich die beiden elektrophilen Zentren der Bromessigsäure in ihrer Reaktivität ausreichend unterscheiden, um die Bildung von Regioisomeren durch eine Vertauschung der Reihenfolge zu verhindern. In Abschnitt 3.3.1. konnte gezeigt werden, daß eine zu schwache Aktivierung der Carbonsäure (z. B. als 4-Nitrophenylester **12**) tatsächlich eine Umkehr der Regioselektivität bewirkt. Als zweite Voraussetzung, zusätzlich zum notwendigen Reaktivitätsunterschied, muß eine schnelle Reaktion auch am weniger reaktiven Zentrum gewährleistet sein.



Schema 19: Bromessigsäure als Biselektrophil zur sequenziellen Acylierung (1) und nachfolgenden Alkylierung (2) bei der Peptoid-Synthese nach der Sub-Monomer-Methode [X = Aktivierende Gruppe (z.B. -Dnp)].

Um weitere Rückgratstrukturen zugänglich zu machen, bot es sich an, andere Biselektrophile im Sinne einer Sub-Monomer-Synthese einzusetzen.^[157,158]

Die in Abb. 29 gezeigten Bausteine erschienen potentiell geeignet und waren zudem kommerziell erhältlich. Es sollte im Rahmen eines „chemischen Screenings“ untersucht werden, ob diese Bausteine für einen Einschub in Peptoide geeignet sind. Im Vordergrund stand dabei zunächst nicht wie in Abschnitt 3 die *N/O*-selektive Reaktion sondern die generelle Untersuchung der Anwendbarkeit der Bausteine. Daher wurden die Reagenzien nicht als potentiell selektive Aktivester bzw. analoge Verbindung eingesetzt, sondern sie wurden in einer möglichst leicht zugänglichen, aktiven Form angewendet (als Anhydrid, Säurechlorid, Chloroformiat bzw. Isocyanat).

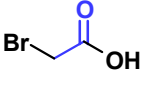
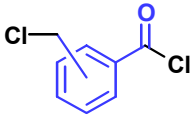
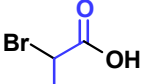
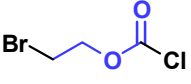
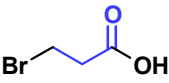
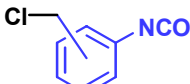
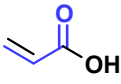
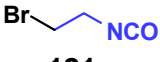
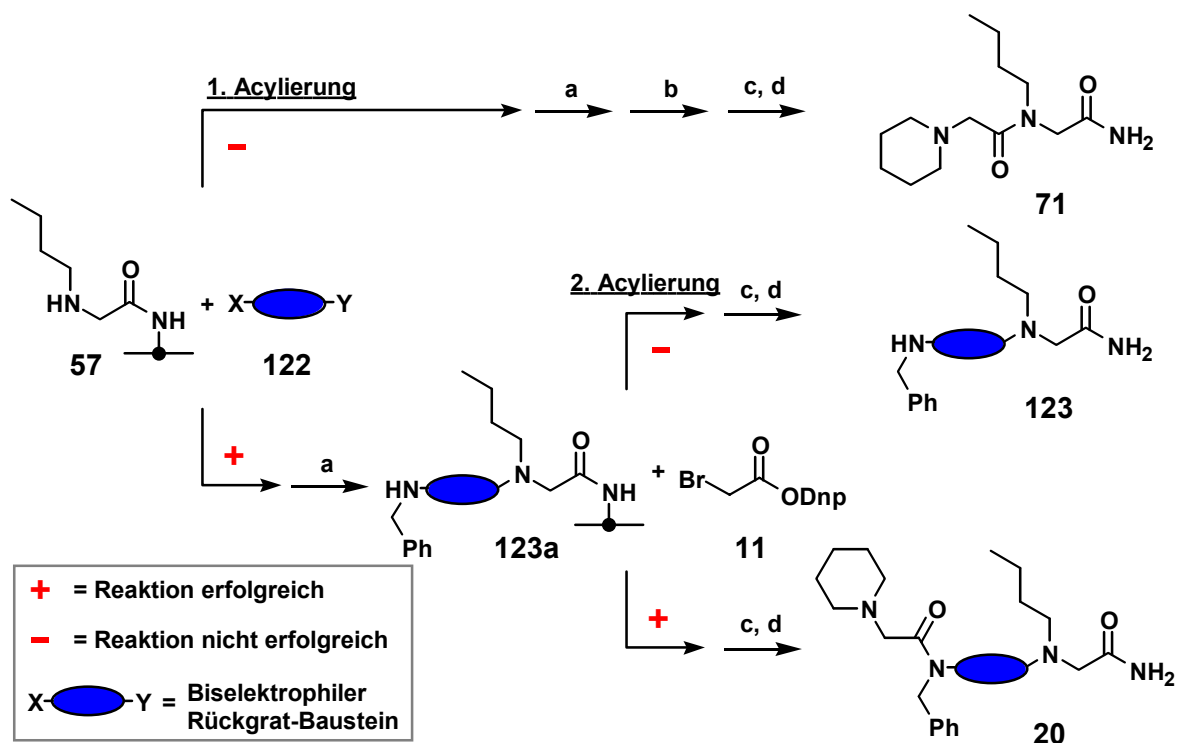
Sub-Monomer Baustein	Entsprechendes Monomer (Stoffklasse des Produktes)	Sub-Monomer Baustein	Entsprechendes Monomer (Stoffklasse des Produktes)
 53	<i>N</i> -Alkyl-glycin (Peptoid)	 116 (meta) 117 (para)	<i>N</i> -Alkyl-3(bzw. 4)-amino-methyl-benzoessäure
 113	<i>N</i> -Alkyl-alanin (<i>N</i> -Alkyl-peptid)	 118	<i>N</i> -Alkyl-2-aminoethyl-kohlensäure (Carbamat)
 114	} <i>N</i> -Alkyl- β -alanin (β -Peptoid)	 119 (ortho) 120 (para)	<i>N</i> -Alkyl-2(bzw.4)-aminomethyl-phenyl-carbaminsäure (Harnstoff)
 115		 121	<i>N</i> -Alkyl-2-aminoethyl-carbaminsäure (Harnstoff)

Abb. 29: Bifunktionelle Bausteine, die auf ihre Eignung für eine Synthese nach dem Sub-Monomer-Konzept getestet wurden (Bromessigsäure zum Aufbau von Peptoiden ist zum Vergleich aufgeführt). Der Teil der Bausteine, der zum späteren Rückgrat beiträgt, ist farbig hervorgehoben.

In Anlehnung an die Versuche in Abschnitt 3.3. sollte versucht werden, die Bausteine in einer Modellreaktion in der Mitte eines Dipeptoids zum Trimer **20** einzubauen (Schema 20). Aus Art und Menge der Nebenprodukte sollte die Eignung der Bausteine abgeleitet werden: Ausgehend von einer Rink-Linker-derivatisierten Zellulosemembran **57**, die bereits mit einem *N*-Butylglycin-Monomer versehen war, sollten die Bausteine **122** unter SPOT-Bedingungen angewendet (Doppelkopplung, 1 M Lösungen). Bei gelungener Acylierung zum Dimeren **123a** und anschließender Verlängerung der Oligomerenkette im Sinne einer fortgesetzten Peptoid-Synthese beobachtet man die Bildung des Trimers **20**. Falls die entscheidende erste Acylierung nicht stattfindet, wird aus dem Ausgangsmonomer **57** in der sich anschließenden Synthesesequenz das Dipeptoid **71** gebildet. Mißlingt hingegen nur die nachfolgende zweite Acylierung mit Bromessigsäure, erhält man das Dimer **123**.

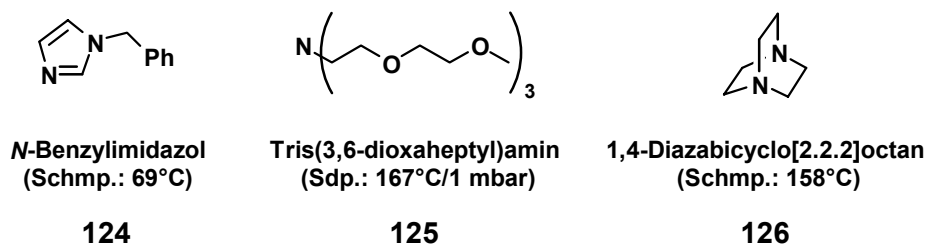


Schema 20: „Chemisches Screening“ auf die Möglichkeit zur Anwendung neuartiger Rückgrat-Strukturelemente nach der Sub-Monomer-Methode. Es ist der Reaktionsweg einschließlich der beobachteten möglichen Nebenprodukte beim Aufbau des Test-Trimeren **20** gezeigt. **a**) Benzylamin (5 M in NMP); **b**) Br-CH₂COODnp (1 M in NMP); **c**) Piperidin (5 M in NMP); **d**) 95% TFA/H₂O.

Es wurden zunächst einige Vorversuche unternommen, in denen eine geeignete Möglichkeit gesucht wurde, die aus den Acylchloriden freigesetzte Chlorwasserstoffsäure abzufangen. Als ungünstig erwies sich eine Basenzugabe zur Reagenzienlösung, da in Abwesenheit des Nukleophils eine Hydrolyse und/oder Zersetzung der Reagenzien *vor* der Pipettierung und damit vor der Reaktion in teilweise erheblichem Ausmaß beobachtet wurde (z.B. durch CO₂-Entwicklung im Fall des Chloroformiates **118** oder starker Verfärbung der Lösung von **116**). Diese Reaktionen wurde auf den Kontakt der Reagenzien-Lösungen mit atmosphärischer Feuchtigkeit zurückgeführt.

Um dieses Problem zu umgehen, erwies es sich als günstig, die Membran *vor* der Acylierung in einem zusätzlichen Schritt mit einem unflüchtigen, nicht nukleophilen, tertiären Amin mittlerer Basizität zu behandeln. Die Reagenzien kommen dann erst in Anwesenheit des membrangebundenen Oligomers in Kontakt mit der Hilfsbase. In einer vergleichenden Synthese des Trimeren **20** mit dem Säurechlorid **116** zeigte sich, daß bei Verwendung von

N-Benzylimidazol (**124**) und Tris(3,6-dioxaheptyl)amin (**125**) die Acylierung des *N*-Butylglycins **57** nahezu vollständig verlief, was zu geringen Mengen des Nebenproduktes **71** führte (3% bzw. 2%). Die Verwendung von Diazabicyclo[2,2,2]octan (**126**) verlief weniger erfolgreich (9% **71**) und führte zudem zu mehreren Nebenprodukten. Für die folgenden Experimenten wurde eine 3 M Lösung von *N*-Benzylimidazol (**124**) dem Tris(3,6-dioxaheptyl)amin (**125**) vorgezogen, da ersteres auf der Zellulosemembran auskristallisiert, so daß eine bessere Benetzung der Membran mit dem nachfolgenden Acylierungsmittel (hier: **116**). Eine verzögerte Wiederauflösung des Amins kann zusätzlich eine Verdrängung der Base vom SPOT im Sinne einer Papier-Chromatographie unterdrücken.

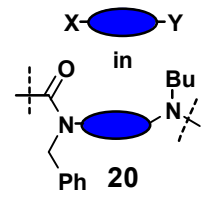
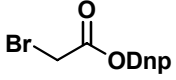
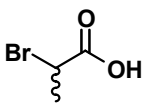
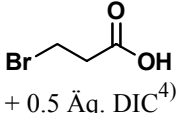
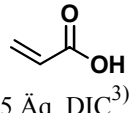
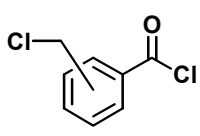
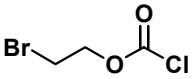
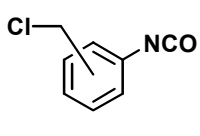
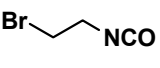


Die Ergebnisse der Versuchsreihe zum Test der Acylierungsmittel **113-121** ist in Tab. 21 zusammengefaßt.

N-Alkylalanine:

Der Übergang von Bromessigsäure (**53**) auf die α -alkylierte 2-Brompropionsäure (**113**) und damit der Einschub eines sterisch anspruchsvollen *N*-Benzylalanin-Bausteins in ein Peptoid erwies sich mit einer Produktreinheit von 39% verglichen mit dem für das entsprechende Peptoid erreichbaren Wert (98%, Eintrag 1) als sehr unvollständig (Eintrag 2). Die zusätzliche α -Methylgruppe verringerte die Zugänglichkeit des sekundären Benzylamins in **123a** offenbar so stark, daß eine vollständige Acylierung nicht mehr möglich war. Dabei ist der Effekt deutlich ausgeprägter, als bei der Einführung einer α -Verzweigung in die Peptoid-Seitenkette (vergl. Einträge 4 bis 6 in Tab. 11, Seite 60). Durch einen versuchsweisen Übergang zu einer Acylierung mit Bromessigsäureanhydrid (aus der Säure und DIC) im dritten Acylierungsschritt ließ sich das Ergebnis nicht wesentlich verbessern. Die Einführung einer Modifizierung des Peptoid-Rückgrates über α -alkylierte Bromessigsäure erschien daher unter den Bedingungen der SPOT-Synthese nicht in ausreichender Ausbeute möglich.

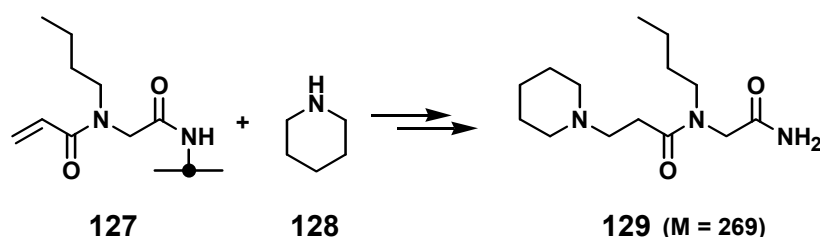
Tab. 21: Produktreinheiten bei der Synthese der Trimere **20** an Rink-Linker modifizierter Zellulose unter Verwendung verschiedener Rückgrat-Bausteine **122**. Zum Vergleich ist die Synthese mit Bromessigsäure gezeigt (Eintrag 1; vergl. Abschnitt 3.3.).

Nr.		 20	Base 1)	Dimer 71 [%]	Dimer 123 [%]	Trimer 20 [%]	n ²⁾
1	11		-	-	-	98	1
2	113	 + 0.5 Äq. DIC ³⁾	-	-	59	39	1
3	114	 + 0.5 Äq. DIC ⁴⁾	-	23	3	61 ⁵⁾	2
4	115	 + 0.5 Äq. DIC ³⁾	-	-	7	69 ⁵⁾	1
5a	116		+	3	-	84 ⁶⁾ (<i>meta</i>)	2
5b	117		+	3	-	83 ⁶⁾ (<i>para</i>)	2
6	118		+	8	-	82	2
7a	119		+	-	7	75 ⁷⁾ (<i>ortho</i>)	1
7b	120		+	-	1	59 ⁸⁾ (<i>para</i>)	1
8	121		-	-	-	14 ⁹⁾	1

¹⁾ Vorinkubation der SPOTs mit *N*-Benzylimidazol (1 x 3 M in DMF); ²⁾ Zahl der durchgeführten Synthesen; ³⁾ 2 M Carbonsäure-Lösung + 0.5 Äq. DIC; ⁴⁾ Aktivierung in CH₂Cl₂, Pipettierung nach Entfernen des Lösungsmittels und Resuspendieren in NMP; ⁵⁾ Nebenprodukt: Dimer **129** (12% bei **114**, 19% bei **115**); ⁶⁾ Nebenprodukt: **130** [8% (*meta*) bzw. 10% (*para*)]; ⁷⁾ Betrag beinhaltet Hydantoin **131** (32%); ⁸⁾ Betrag beinhaltet Hydantoin **132** (57%); ⁹⁾ Als Hydantoin **133**. Das Trimer **20** wurde nur massenspektrometrisch detektiert (Reinheit nach UV: < 1%). Nebenprodukt: 4,5-Dihydro-oxazol **135** (28%).

β -Peptide:

Um einen von β -Peptiden abgeleiteten „ β -Peptoid“-Baustein einzuführen, standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: (1) Die Verwendung von 3-Brompropionsäure (**114**) mit nachfolgender Halogensubstitution analog zur Peptoidsynthese und (2) die Acylierung mit Acrylsäure (**115**) und anschließender Michael-Addition, wie es von B.C. Hamper *et al.* beschrieben wurde.^[159] Erstere Methode lieferte das gewünschte Trimer **20** bei einer Aktivierung von 3-Brompropionsäure mit DIC in NMP (45 Minuten Voraktivierung) in nur 47% Reinheit. Ein hoher Anteil an Dimer **71** (39%) deutete auf eine unvollständige Acylierung hin, für die möglicherweise eine zu langsame Aktivierung der 3-Brompropionsäure aufgrund des Fehlens eines elektronenziehenden α -Substituenten verantwortlich war. Daher wurde die Säure in einem weiteren Versuch im unpolaren Lösungsmittel CH_2Cl_2 aktiviert (10 Minuten) und nach einem Wechsel des Lösungsmittels durch Evaporieren und Resuspendieren in NMP zur Reaktion gebracht (Eintrag 3). Die Reinheit des Produktes konnte tatsächlich auf 61% gesteigert werden, eine vollständige Acylierung wurde jedoch auch so nicht erreicht. Bei der Verwendung von Acrylsäure (**115**) erhielt man das Trimer **20** in nur wenig höherer Reinheit (69%, Eintrag 4). Zwar war die Acylierung hier vollständig, dafür bereitete die Michael-Addition Probleme. Das Auftreten eines Produktes **129** mit $M = 269$ g/mol (19%) läßt sich durch die Addition von Piperidin (**128**) im letzten Schritt der Synthese an zuvor in der Reaktion mit Benzylamin unumgesetztes Acrylamid **127** erklären.

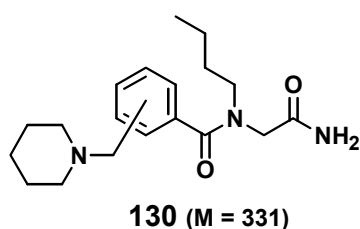


Auch bei der Verwendung von 3-Brompropionsäure wurde das Dimer **129** beobachtet, wenn auch in etwas geringerem Ausmaß (12%). Möglicherweise ist die Halogensubstitution verglichen mit Bromessigsäure verlangsamt, wahrscheinlicher erscheint jedoch, daß Benzylamin als Base zu HBr-Eliminierung zum Acrylamid **127** führte, welches wie oben beschrieben nur eine unvollständige Aminaddition zuläßt.

Die Tatsache, daß bereits das reaktive Benzylamin zu Problemen bei der Brom-Substitution bzw. Michael-Addition führt, läßt eine weitaus geringere Anwendbarkeit von Amin-Bausteinen vermuten, als dies für Peptide der Fall ist. Ein Einschub von β -Peptoid-Bausteinen in Peptide kann daher nur bei sterisch wenig anspruchsvollen, schwerflüchtigen Aminen (wie z.B. Benzylamin) empfohlen werden, wobei nur mäßige Reinheiten zu erwarten sind (< 70%). Aufgrund der größeren Acylierungsausbeute ist dazu die Acrylsäure der 3-Brompropionsäure vorzuziehen.

N-Alkylaminomethylbenzoesäuren:

Gute Ergebnisse lieferte die Einführung von *meta*- und *para*-Aminomethylbenzoesäure in das Peptoid-Rückgrat. Mit bis zu 84% Reinheit wurden beide verwendeten Bausteine gut gekoppelt und die Kette anschließend erfolgreich fortgesetzt (Einträge 5a und 5b). Offenbar glich der Übergang vom Aktivester bei der Bromessigsäureaktivierung zum Säurechlorid zur Benzoesäureaktivierung die geringere Reaktivität der Benzoesäuren aus. Parallel durchgeführte Versuche ohne Hilfsbase zeigten, daß eine Vorbehandlung mit *N*-Benzylimidazol notwendig ist, um entstehende Säure zu neutralisieren. Das mit einem Anteil von 8-10% gebildete Nebenprodukt **130** weist auf eine nicht ganz vollständige Chlor-Substitution durch Benzylamin am membrangebundenen Benzylchlorid hin, welche in weiteren Verlauf der Synthesesequenz durch Piperidin erreicht wurde. Durch Verwendung der entsprechenden *Brom*methylbenzoylhalogenide könnte dieses Problem umgangen werden.



Y. Feng *et al.* beobachteten die Induktion von β -Schleifenstrukturen beim Einbau eines den Benzoesäurederivaten **116** und **117** analogen, *ortho*-substituierten Bausteins in cyclische Tripeptide.^[160] Dies läßt die Bausteine **116** und **117** auch vor dem Hintergrund einer möglichen Ausbildung stabilisierter Rückgrat-Strukturen als interessant erscheinen.

Carbamate:

Mit dem 2-Bromethylchloroformiat (**118**) steht ein Reagenz zur eleganten Einführung einer Carbamat-Gruppe in ein Peptoid zur Verfügung. Mit einer Reinheit von 82% wird das gewünschte Trimer **20** in guter Ausbeute gebildet (Eintrag 6). Der Schlüssel zur Synthese war hier wie schon bei den Benzoesäurechloriden die Vorbehandlung der Membran mit *N*-Benzylimidazol.

Harnstoffe:

Mit den beiden verwendeten Chlormethylphenylisocyanaten **119** und **120** ließen sich mittlere bis gute Umsetzungen erzielen (Einträge 7a und 7b). Vergleiche mit einer Reaktion ohne Beteiligung von *N*-Benzylimidazol (11% Dimer **71**) zeigten einen günstigen Einfluß der Base auf die Vollständigkeit der Umsetzung, obwohl sie hier nicht zum Abfangen von Säure benötigt wird. In beiden Fällen traten Produkte mit einer um 17 Einheiten verringerten Masse auf. Diese Beobachtung ließ sich gut mit einer säurekatalysierten Cyclisierung der erwarteten Trimere **20** zu den Hydantoinen **131** bzw. **132** im Verlauf der Abspaltung vom Rink-Linker erklären (Schema 21).^[161]

Zusammenfassung

Die Untersuchungen der bifunktionellen Bausteine **113-121** machten die Einführung von Aminomethylbenzoesäure- sowie Carbamat-Bausteinen in das Peptoid-Synthese-Protokoll in effizienter und modularer Weise möglich. Die erreichten Produkt-Reinheiten sind etwas geringer als bei der Verwendung von Bromessigsäure (ca. 85% gegenüber 98%), so daß die Bausteine in erster Linie zum punktuellen Einschub in Peptoide geeignet sind. Zum Aufbau der entsprechenden Homopolymere müßten die Acylierungsbedingungen weiter optimiert werden.

Bei den Synthesen mit *N*-Alkylalanin- und β -Peptoid-Bausteinen zeigte sich, daß kleine Veränderungen der Rückgratbausteine (jeweils ein Einschub einer CH₂-Einheit) zu deutlich niedrigeren Produktreinheiten führen. Erstere sind mit der SPOT-Synthese nicht in ausreichender Reinheit, letztere nur in Kombination mit reaktiven Aminen zugänglich.

Die neuen Bausteine können neben den Aminen als Diversitätselemente von Peptoiden verstanden werden. Bei der Optimierung eines bioaktiven Peptoids könnten sie beispielsweise durch eine Fixierung des Rückgrates oder durch die Induktion einer Schleifenstruktur zu einer Bindungsverbesserung führen. Auch die Veränderung der Seitenkettenabstände durch eine CH₂-Homologisierung des Rückgrates kann zu einer Verbesserung eines biologischen Effektes führen.

Als Nebenreaktion wurde die Cyclisierung von Harnstoff-Derivaten zu Hydantoinen beobachtet, die Anlaß zu weiteren Untersuchungen gab, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

6 SPOT-Synthese von Heterocyclen: Hydantoine

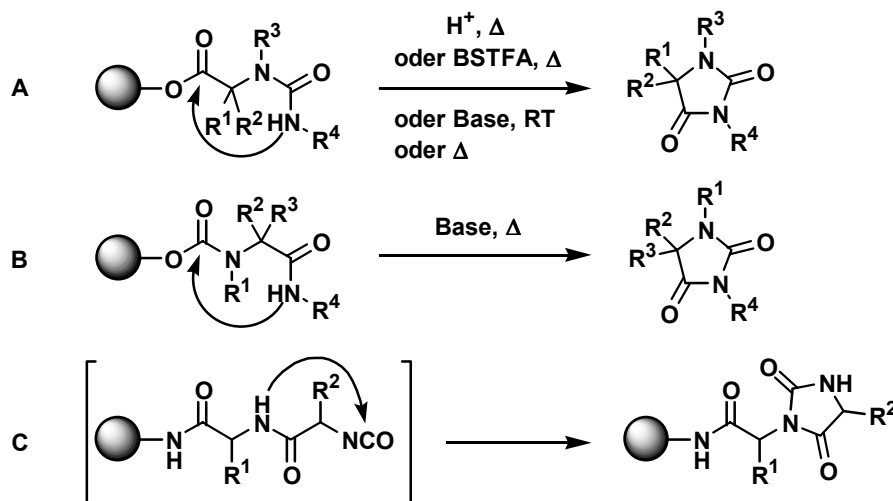
6.1 Hydantoine – Neue Perspektiven in der SPOT-Synthese

Beim Versuch, Harnstoffe nach der Sub-Monomer-Methode aufzubauen, wurde unter den Bedingungen der Abspaltung vom Rink-Linker (95% TFA/H₂O, 25°C, 20 min) die Bildung von Hydantoinen beobachtet (Vergl. Abschnitt 5, Schema 21). Mit dieser interessanten Reaktion können heterocyclische Strukturen in Peptide eingebracht werden, die für die Suche nach bioaktiven Verbindungen aus den folgenden Gründen von Interesse sind:

1. Als Templat zur neuen Anordnung der umgebenden Reste können ggf. bindende Konformationen durch die Einführung der Hydantoin-Struktur in das Oligomeren-Rückgrat fixiert werden (Rückgrat-Fixierung).
2. Der Heterocyclus selbst bietet durch seine Carbonyl-Sauerstoffatome die Möglichkeit zu bindenden Kontakten, die mit einer linearen Struktur nicht möglich gewesen wären (neue Rückgrat-Kontakte).

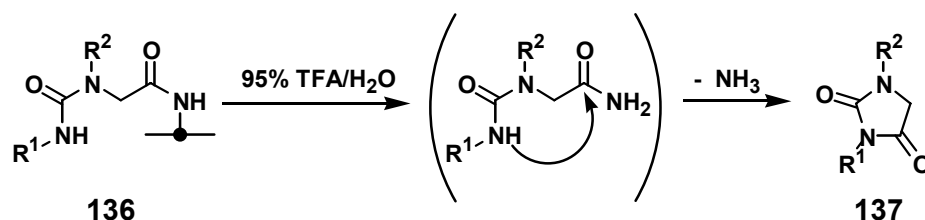
Nach der Synthese von Peptidmimetika (z.B. Peptoiden) würde mit der Einführung eines Heterocyclus ein weiterer Schritt in Richtung der Synthese pharmazeutisch relevanter Verbindungen^[52] mit der SPOT-Methode unternommen (zur Übersicht über Synthesen von Heterocyclen an fester Phase vergl. Lit.^[163-165]).

Die Synthese von Hydantoinen wurde im Jahr 1861 von A. Baeyer erstmals beschrieben (Übersichten^[166,167]). Nicht zuletzt aufgrund der biologischen Aktivität einiger Hydantoine^[166-168] hielt dieser Heterocyclus 1993 durch die Arbeiten von S.H. DeWitt *et al.* als einer der ersten nicht-oligomeren Strukturen Einzug in die kombinatorische Synthese an fester Phase.^[169] Seitdem sind zahlreiche Festphasensynthesen beschrieben worden.^[52,170-184] In den meisten Fällen wurde ein linearer Vorläufer während der Abspaltung zum Hydantoin cyclisiert (unter (Lewis-)Säurekatalyse^[169,170,182], Basenkatalyse^[171-177] oder neutralen Bedingungen^[178,184]; Schema 22, **A/B**). In anderen Fällen wurde intermediär ein Isocyanat erzeugt, welches an der festen Phase cyclisiert wurde (Schema 22, **C**).^[52,179-181,183]



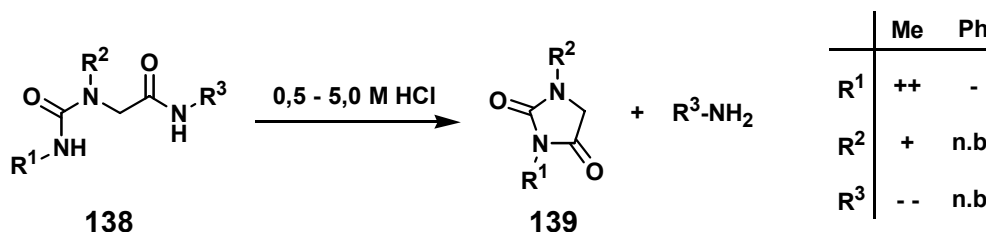
Schema 22: Verschiedene Systeme und Bedingungen zur Synthese von Hydantoinen an fester Phase (BSTFA = Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid).

Während Hydantoin-Cyclisierungen meistens mit Alkoholen oder Phenolen als Abgangsgruppen durchgeführt wurden, fand in dieser Arbeit eine Cyclisierung unter Austritt von Ammoniak unter milden Bedingungen (95% TFA/H₂O) statt (Schema 23). In der Festphasenchemie wurde dieser Cyclisierungsweg bislang noch nicht genutzt.



Schema 23: Säurekatalysierte Cyclisierung von Peptoiden mit *N*-terminaler Harnstoff-Modifizierung **136** zu Hydantoinen **137** unter Austritt von Ammoniak.

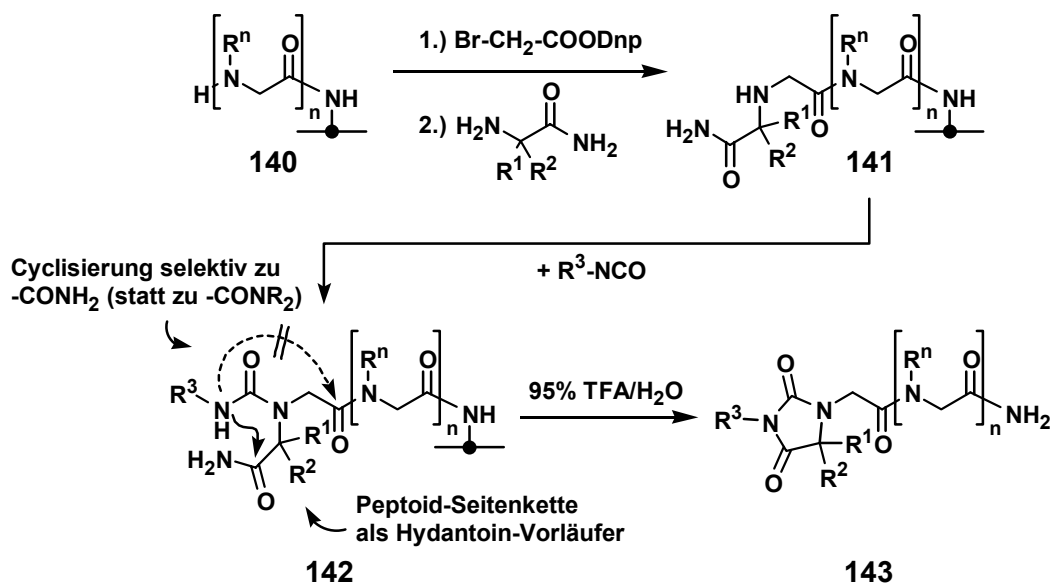
In homogener Phase untersuchten J. Kaválek *et al.* den Einfluß der Substituenten auf die Kinetik einer derartigen Hydantoin-Cyclisierung (Schema 24).^[161] Dabei wurde deutlich, daß



Schema 24: Substituenteneinfluß auf die Cyclisierungsgeschwindigkeit von Harnstoffen **138** zu Hydantoinen **139** nach J. Kaválek *et al.*^[161] In der Tabelle ist angegeben, ob die Reaktion beschleunigt (+) bzw. verlangsamt (-) wird, wenn ein Substituent Rⁿ = H gegen Rⁿ = Methyl bzw. Rⁿ = Phenyl ausgetauscht wird (n.b. = nicht bestimmt).

ein Alkyl-Substituent an Position R^2 des Harnstoffs **138**, wie er im Fall dieser Arbeit stets vorliegt, die Cyclisierungsgeschwindigkeit verglichen mit einem Wasserstoffsubstituenten erhöht. Verantwortlich für diese Beschleunigung ist der in diesem Fall vorliegende höherer Anteil an *cis*-konfiguierter Geometrie am Harnstoff, die für den Ringschluß notwendig ist. Ein Substituent in Position R^1 , der vom Isocyanat eingebracht wird, kann die Reaktion entweder beschleunigen (Alkyl-) oder verlangsamen (Aryl-Substitution). Die stärkste Hemmung wird für den Übergang eines unsubstituierten Amids zu einem Amid mit Alkyl-Substitution (R^3) am Amid-Stickstoff beschrieben.

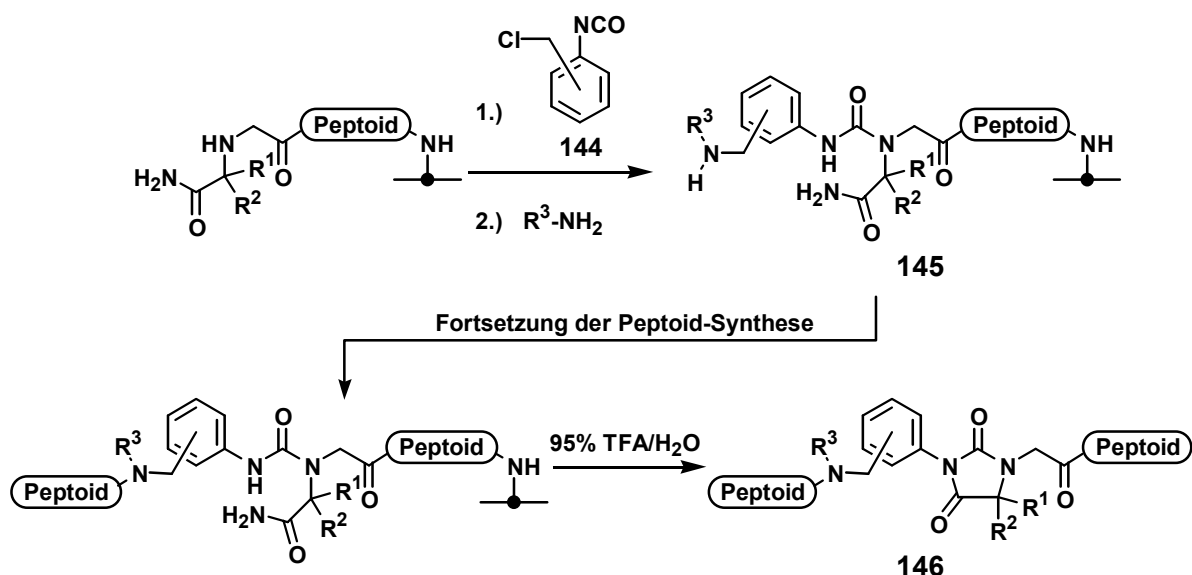
Letztere Eigenschaft eröffnet vielfältige Möglichkeiten der Hydantoin-Synthese in Kombination mit der Peptidsynthese: Sie ermöglicht neben der Synthese von Hydantoinen am *C*-Terminus, wie sie in Schema 23 beschrieben ist, auch eine selektive Bildung eines *N*-terminalen Hydantoins **143** aus einem Harnstoff **142** durch Cyclisierung mit einer geeigneten Seitenkette eines Peptoids **141** (Schema 25). Die konkurrierende Cyclisierung zur *N*-Alkylamidbindung des Rückgrates, die einen unerwünschten Bruch des Oligomers bewirken würde, ist kinetisch benachteiligt. Die korrekte Anordnung wird erreicht, wenn der Harnstoffeinheit im Oligomer ein Peptoid-Baustein mit (substituierter) Glycinamid-Seitenkette als Hydantoin-Vorläufer vorausgehen.



Schema 25: Schema zur Synthese von Hydantoinen am *N*-Terminus von Peptoiden **140**.

Die in der Literatur bislang beschriebenen Methoden zur *N*-terminalen Modifizierung von Harzgebundenen Peptiden durch Hydantoinen^[52,179-181,183] führen zu einer Bindung des Oligomers über das Imid-Stickstoffatom des Heterocyclus (vergl. Schema 22, C). Mit der hier beschriebenen Methode wurde erstmals ein Zugang zu einer Hydantoin-Modifizierung über das Harnstoff-Stickstoffatom geschaffen.

Wenn, wie bereits in Abschnitt 5 durchgeführt, ein bifunktionelles Isocyanat (wie z.B. **144**) zur Erzeugung des Harnstoffes **145** verwendet wird, ließe sich das Hydantoin sogar an beliebiger Stelle innerhalb des Oligomers **146** einsetzen und so eine Hydantoinstruktur universell mit der Peptoidchemie kombinieren (Schema 26).



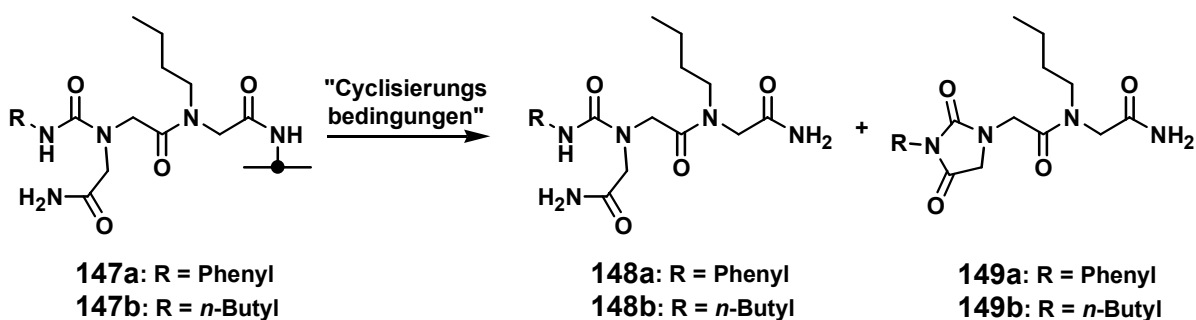
Schema 26: Verwendung bifunktionaler Isocyanate zur Synthese von Oligomeren **146**, in die eine Hydantoin-Einheit eingeschoben ist (hier gezeigt am Beispiel von Chlormethylphenylisocyanaten **144** und Peptoiden).

6.2 Optimierung der Cyclisierungsbedingungen

Im Gegensatz zu den Hydantoin-Synthesen mittels cyclisierender Abspaltung von Harz findet die Hydantoin-Bildung hier *nach* der Abspaltung statt. Es sollte eine Möglichkeit gefunden werden, die in Abschnitt 5 beobachtete unvollständige Cyclisierung zur Vollständigkeit zu bringen. Dazu wurden verschiedene Cyclisierungsbedingungen an den Modellverbindungen **147** getestet (Tab. 22).

Die Cyclisierung von membrangebundenen Harnstoffen **147a** zu Hydantoinen **149a** wurde unter allen angewendeten Abspaltbedingungen beobachtet. Sogar die Vermeidung von sowohl sauren als auch basischen Bedingungen durch die Synthese des Cyclisierungsvorläufers **147a** an Photo-Linker führte zu 21% cyclisiertem Produkt neben 79% linearem Harnstoff (Tab. 22, Eintrag 1). Es zeigte sich allerdings, wie schon bei den Versuchen im vorangegangenen Abschnitt, daß die Cyclisierung unvollständig war. Unterschiedlich lange Behandlungen mit TFA bei 25°C zeigten nur eine geringe Abhängigkeit des Hydantoin-Anteils von der Reaktionszeit (Einträge 2-4). Auch die basische Cyclisierung mit methanolischer Natriummethanolat-Lösung bewirkte ein nur geringfügig günstigeres Ergebnis als die unkatalysierte Reaktion, obwohl gerade der Aryl-Substituent als günstig in basenkatalysierten Cyclisierungen beschrieben wurde (Vergleich der Einträge 5 und 1).^[185] Erst die säurekatalysierte Abspaltung bei erhöhter Temperatur (60°C) brachte die Reaktion zu Vollständigkeit (Eintrag 6). Durch Variation der Reaktionszeit wurde deutlich, daß die Cyclisierung bei dieser Temperatur bereits nach 10 Minuten abgeschlossen war (Einträge 7 und 8).

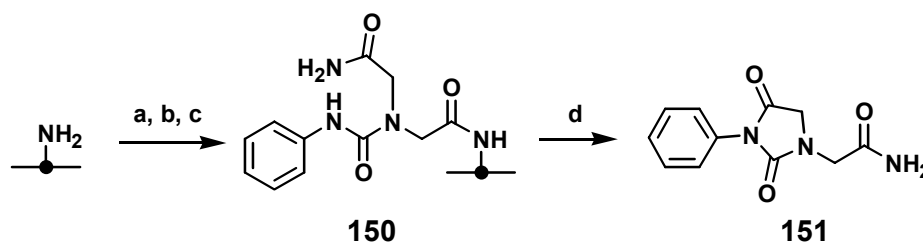
Tab. 22: Optimierung der Cyclisierungsbedingungen zur Synthese von Hydantoinen. Bestimmt wurde das Verhältnis der Produktreinheiten der linearen Harnstoffe **148** zu den entsprechenden Hydantoinen **149**. Die Synthese wurde an Photo-Linker (PL) bzw. Rink-Linker (R) durchgeführt.



Nr.	R in Linker 149	Cyclisierungs- bedingungen	t [min]	Gesamt- Reinheit 148 + 149	Verhältnis 148 : 149
1	Ph	PL	–	91%	79 : 21
2	Ph	R	95% TFA/H ₂ O, 25°C	72%	50 : 50
3	Ph	R	"	74%	46 : 54
4	Ph	R	"	82%	41 : 59
5	Ph	PL	30% NaOMe/MeOH, 25°C	83%	65 : 35
6	Ph	PL	95% TFA/H ₂ O, 60°C	81%	0 : 100
7	Ph	PL	"	66% ¹⁾	0 : 100
8	Ph	PL	"	67% ¹⁾	14 : 86
9	But	PL	–	64%	100 : 0
10	But	PL	95% TFA/H ₂ O, 60°C	82%	0 : 100
11	But	PL	"	53% ¹⁾	0 : 100
12	But	PL	"	52% ¹⁾	7 : 93

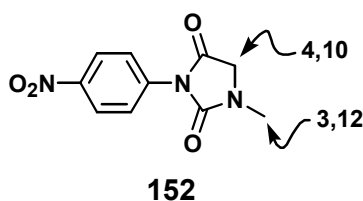
¹⁾ Ein Nebenprodukt ist eine nicht identifizierte Verunreinigung (22-29%), die nur bei den gekennzeichneten Substanzen beobachtet wurde. Es handelte sich vermutlich um ein Photolyse-Nebenprodukt, welches unabhängig von den gewünschten Reaktionsprodukten auftrat und daher das Verhältnis **148 : 149** nicht beeinflusst.

Auch der *n*-Butyl-Harnstoff **148b**, der ohne Säurebehandlung nicht cyclisierte (Eintrag 9), bildete unter den optimierten Bedingungen das entsprechende Hydantoin **149b** (Eintrag 10). Es war hier allerdings eine etwas längere Reaktionszeit von etwa 20 Minuten erforderlich, um die Reaktion zur Vollständigkeit zu bringen (Einträge 11 und 12).



Schema 27: Synthese des Hydantoins **151** zur NMR-spektroskopischen Untersuchung. **a)** Br-CH₂-COODnp (1 M in NMP); **b)** Glycinamid (5 M in H₂O); **c)** Ph-NCO (1 M in NMP; Zusatz von 1.1 Äq. NMI); **d)** TFA (95% in H₂O, 60°C, 20 min).

Zur Bestätigung der Struktur^[186] sollte ein Hydantoin an Zellulose in einer für die NMR-Spektroskopie ausreichenden Menge synthetisiert werden. Damit sollte erstmals das NMR-Spektrum einer Substanz gemessen werden, die durch SPOT-Synthese an Zellulose hergestellt wurde. Der Harnstoff **150** wurde zu diesem Zweck an einem 25 cm² großen Zellulosestück synthetisiert, welches mit dem Rink-Linker derivatisiert war (Derivatisierungsgrad: 0.58 μmol/cm², vergl. Schema 27). Das nach Abspaltung unter cyclisierenden Bedingungen (95% TFA/H₂O, 60°C, 20 min) und Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum isolierte Rohprodukt (7.1 mg) enthielt neben dem Hydantoin **151** noch Zellulosefasern. Zur Analyse wurde die Substanz in [D₆]-DMSO gelöst und ungelöste Fasern durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand enthielt das Hydantoin in ausgezeichneter Reinheit [$> 99\%$ (HPLC); Abb. 30]. Im ESI-Massenspektrum wurden neben dem Moleküllion zwei charakteristische Fragmente beobachtet, die die Hydantoin-Struktur bestätigten (Abb. 30, rechts). Die Protonen-Resonanzen bei $\delta = 3.95$ und 4.14 im ¹H-NMR-Spektrum ließen sich gut mit den beiden Methylengruppen der Zielverbindung vereinbaren (vergl. Abb. 31), wobei das Signal der Ring-Methylengruppe durch Vergleich mit dem Wert des literaturbeschriebenen^[187], ähnlichen Hydantoins **152** zugeordnet wurde.



Es traten zwei Resonanzen bei $\delta = 7.27$ und 7.65 auf, die den Amid-Protonen zuzuordnen sind. Zunächst ungewöhnlich war ein Triplett aus drei Signalen gleicher Intensität bei $\delta = 7.13$ mit einer Kopplungskonstante von $J = 51$ Hz. Es handelte sich dabei um die Resonanzen des bei der Cyclisierung gebildeten Ammoniumtrifluoracetats, wie durch die Messung einer authentischen Probe bestätigt werden konnte. Die ungewöhnliche Kopplung wurde durch das ¹⁴N-Atom ($I = 3/2$) des Ammoniumions hervorgerufen, dessen ¹J-Kopplung nur durch die hohe Symmetrie der tetraedrischen Anordnung der vier Wasserstoffatome beobachtet werden konnte.^[188] Auch das ¹³C-NMR-Spektrum ließ sich mit der Struktur vereinbaren. Das Vorhandensein eines uncyclisierten Harnstoffes konnte (1) durch eine quantitative Auswertung der Signalintensitäten im ¹H-NMR-Spektrum, (2) durch den Nachweis des bei der Cyclisierung gebildeten Ammoniumions sowie (3) durch die

massenspektroskopischen Daten ausgeschlossen werden.

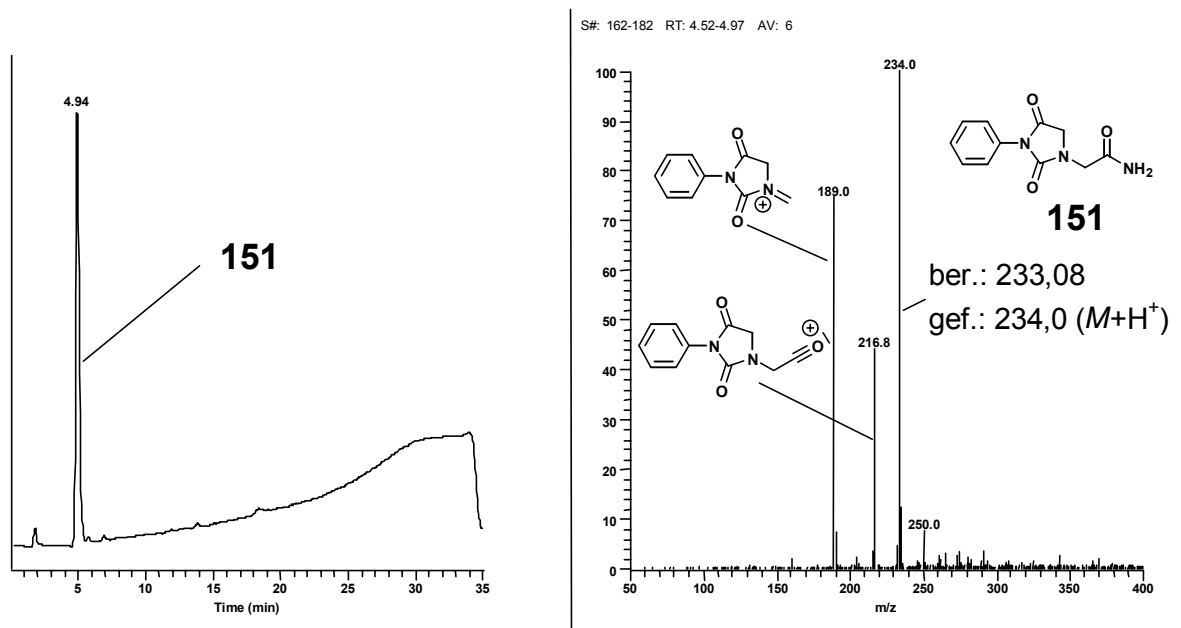


Abb. 30: HPLC-UV-Spur (220 nm, links) und ESI-Massenspektrum (rechts) des Rohproduktes einer Synthese des Hydantoins **151** an Rink-Linker-modifizierter Zellulose. Abspaltung und Cyclisierung erfolgen mit TFA (95% in H₂O) bei 60°C (20 min).

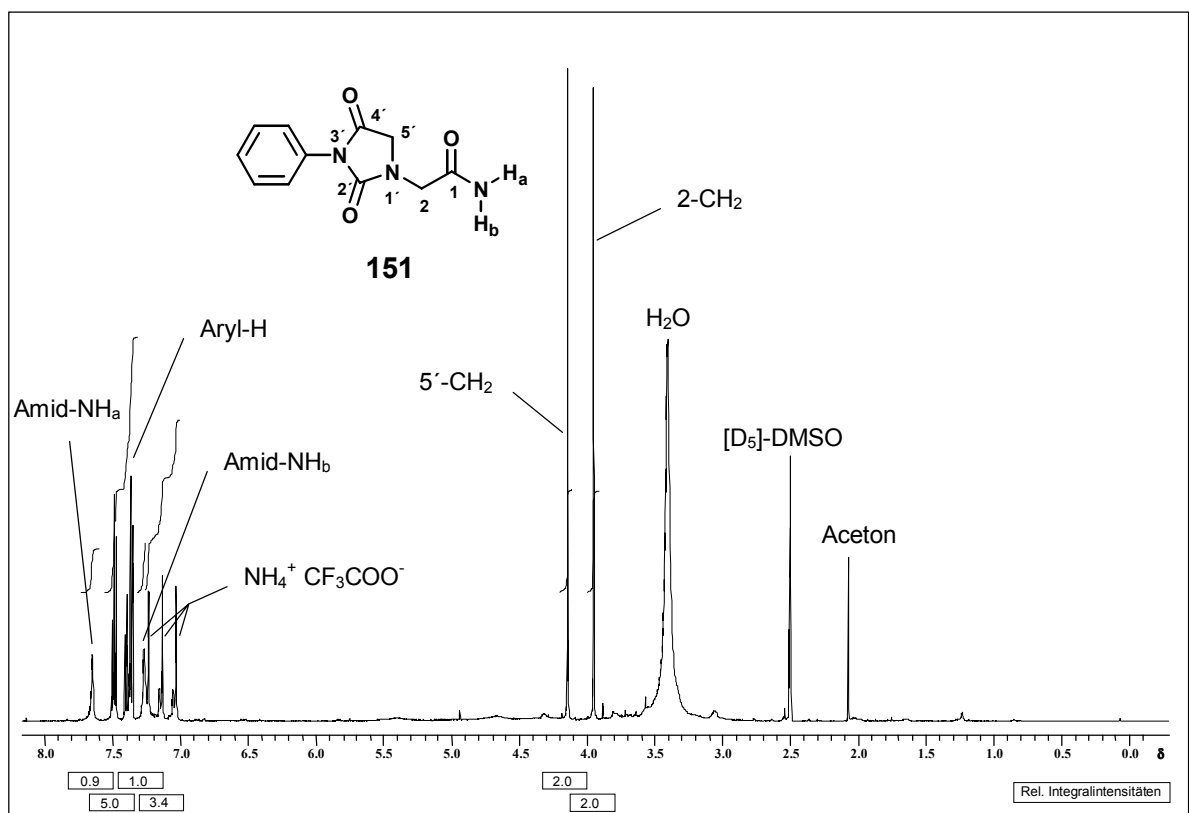
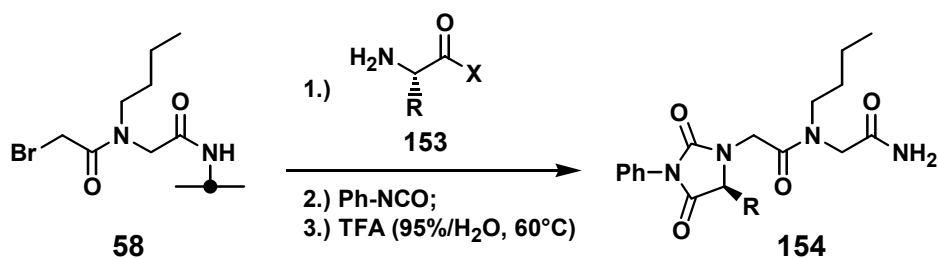


Abb. 31: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, [D₆]-DMSO) des Hydantoins **151** (Rohprodukt) nach Synthese an 25 cm² Rink-Linker-derivatisierter Zellulose. (Die Amid-Protonen-Zuordnung (H_a/H_b) ist nicht eindeutig.)

6.3 Synthese C-substituierter Hydantoine

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, daß sich Hydantoine an Zellulosemembranen in guten Ausbeuten synthetisieren lassen. Es war nun von Interesse, ob auch an der Methylengruppe substituierte Hydantoine durch SPOT-Synthese zugänglich sind. Die Einführung von Substituenten beschleunigt dabei die Cyclisierung aufgrund des Thorpe-Ingold Effekts, wie A.H. Koedjikov *et al.* zeigen konnten.^[187] Als Modellsystem wurden die Hydantoine **154** gewählt, bei denen das zur Einführung einer cyclisierbaren Seitenkette eingesetzte Glycinamid durch andere α -Aminosäurederivate ersetzt wurde. In diesem Zusammenhang sollte zusätzlich untersucht werden, ob neben Amiden auch Carbonsäuren, die in Form ihrer *tert*-Butylester eingebracht werden, zur Cyclisierung geeignet sind. Das an Rink-Linker-modifizierter Zellulose synthetisierte, bromacetylierte *N*-Butylglycin **58** wurde mit verschiedenen Aminosäurebausteinen **153** zum entsprechenden Dipeptoid umgesetzt. Durch Behandlung mit Phenylisocyanat und anschließender Abspaltung vom Träger unter cyclisierenden Bedingungen wurden die Hydantoine **154** erhalten (Tab. 23).

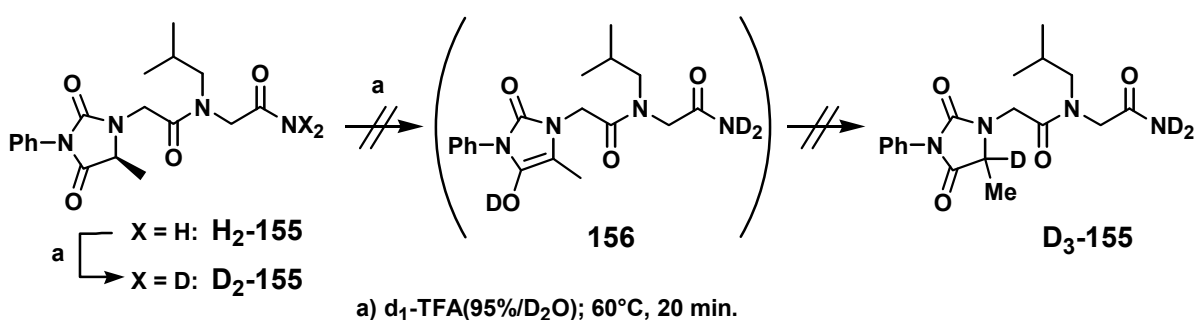
Tab. 23: Untersuchung zur Synthese von substituierten Hydantoinen **154**.



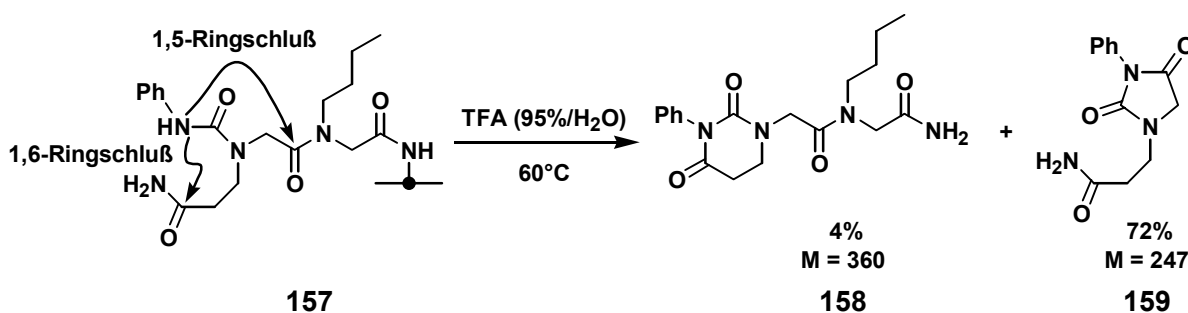
Nr.	H ₂ N-CH(R)-C(=O)-X (153)	Reinheit 154 [%]
1	R = H; X = <i>Ot</i> Bu (= H-Gly- <i>Ot</i> Bu)	79
2	R = Methyl; X = NH ₂ (= H-Ala-NH ₂)	84
3	R = Isobutyl; X = NH ₂ (= H-Leu-NH ₂)	76
4	R = <i>sec</i> -Butyl; X = <i>Ot</i> Bu (= H-Ile- <i>Ot</i> Bu)	54

Die Untersuchungen zeigten, daß zur Cyclisierung Alkyl-Seitenketten mit unterschiedlichem sterischem Anspruch toleriert wurden (R = Methyl, Isobutyl, *sec*-Butyl; Einträge 2-4; Tab. 23), wenn auch der α -verzweigte *sec*-Butylrest des Isoleucins nur zu einer mäßigen Produktreinheit führte (54%; Eintrag 4). Ferner waren die Cyclisierungsbedingungen auch geeignet, um eine Hydantoinbildung von *tert*-Butylestern zu bewirken – vermutlich nach Abspaltung der säurelabilen *tert*-Butylgruppe und Cyclisierung der resultierenden Carbonsäure unter Wasserabspaltung (Einträge 1 und 4).^[189] Die Synthese der Hydantoine erfolgte mit Carbonsäure-*tert*-butylestern und den entsprechenden Amiden mit vergleichbarer Reinheit [Eintrag 1 (79%) und Eintrag 6 in Tab. 22 (81%)]. In keinem Fall konnte ein offenkettiger Harnstoff nachgewiesen werden.

Da die Hydantoine **154** ($R \neq H$) ein Chiralitätszentrum aufweisen, galt es zu klären, ob unter den Bedingungen der Cyclisierung Racemisierung auftritt. Für die Schwefel-analogen Thiohydantoine ist bekannt, daß sie im basischen leicht, in Trifluoressigsäure bei 25°C jedoch nicht racemisieren.^[190] Um die hier angewandten, drastischeren Bedingungen zu untersuchen, wurde das Hydantoin **H₂-155** synthetisiert, isoliert und anschließend den Cyclisierungsbedingungen mit deuterierten Abspaltreagenzien ausgesetzt. Falls Racemisierung über ein möglicherweise gebildetes Enol **156** auftritt, sollte das Produkt durch Deuterierung am Hydantoinring sowie den unvermeidlichen H/D-Austausch der Amid-Gruppe eine um drei Einheiten erhöhte Masse aufweisen (**D₃-155**). Nach Analyse einer Lösung in D₂O/CD₃CN (7/3) mittels ESI-MS wurde jedoch nur das deuterierte Amid **D₂-155** beobachtet, wodurch Racemisierung am Hydantoin unter den angewandten Bedingungen im Rahmen der Meßgenauigkeit ausgeschlossen werden kann.



In Erweiterung der Versuche zur Hydantoinbildung sollte versucht werden, das Dihydropyrimidin-2,4-dion **158** durch Verwendung von β -Alaninamid anstelle von Glycinamid zu synthetisieren. Dazu wurde der Vorläufer **157** mittels SPOT-Synthese hergestellt. Überraschenderweise wurde das gewünschte Produkt **158** nach Anwendung der üblichen Cyclisierungsbedingungen nur in Spuren nachgewiesen (4% Reinheit). Stattdessen wurde als Hauptprodukt eine Verbindung mit der Masse $M = 247$ g/mol in 72% Reinheit detektiert, bei der es sich um das Hydantoin **159** handelt. Die 1,5-Cyclisierung des N,N -Dialkylamids, die bei den obengenannten Versuchen nicht beobachtet wurde, erfolgt offenbar schneller, als der 1,6-Ringschluß.



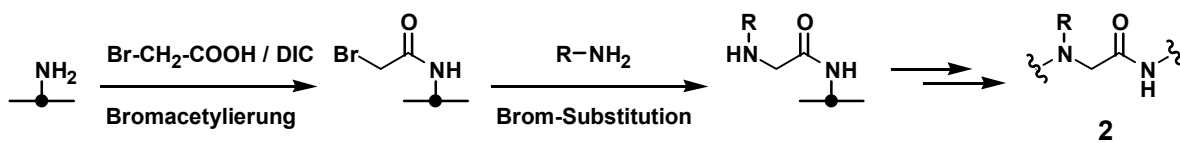
Dihydropyrimidin-2,4-dione sind also auf einem der Hydantoinsynthese analogen Weg nicht zugänglich. Es zeigte sich jedoch, daß unter den Cyclisierungsbedingungen auch gewöhnliche Isocyanate in der Lage, ein Peptoid-Rückgrat zu spalten. A. Boeijen *et al.* beschrieben 1998 den Abbau von Peptoiden in einer dem Edman-Abbau von Peptiden analogen Reaktion zu Thiohydantoinen.^[191] Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen für die Peptoide (im Gegensatz zu Peptiden) auch die Sequenzierung mit gewöhnlichen Isocyanaten für möglich erscheinen.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die SPOT-Synthese an Zellulosemembranen ist eine hocheffiziente Methode zur parallelen Synthese von Peptiden. Die wichtigste Anwendung der so synthetisierten Verbindungen ist das direkte Festphasen-Screening. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, das Anwendungsgebiet der SPOT-Methode von Peptiden auf verschiedene Peptidmimetika auszudehnen und auf diese Weise bioaktive Substanzen zu identifizieren. Die Ergebnisse der schrittweisen Vorgehensweise sind im folgenden zusammengefaßt:

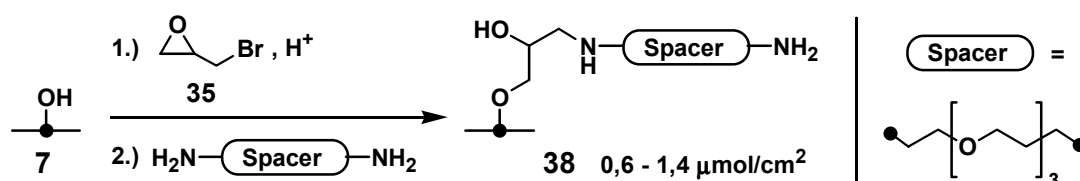
(1) Peptoid-Synthese an Zellulosemembranen

Die Ähnlichkeit der Oligo-*N*-alkylglycine **2** (Peptoide) zu Peptiden sowie die Vereinbarkeit ihrer Synthese mit den Bedingungen der SPOT-Technik ließen sie als besonders geeignete Kandidaten für eine Erweiterung der SPOT-Synthese von Peptiden auf Peptidmimetika erscheinen. Ihre Synthese konnte systematisch von Synthescharzen auf Zellulose übertragen werden. Die Peptoide wurden dabei nach der Sub-Monomer-Methode synthetisiert, bei der die *N*-Alkylglycin-Monomere zweistufig durch Bromacetylierung und nachfolgende Bromsubstitution durch ein primäres Amin aufgebaut wurden (Schema 28).



Schema 28: Peptoidsynthese nach der Sub-Monomer-Methode nach R.N. Zuckermann *et al.*^[12]

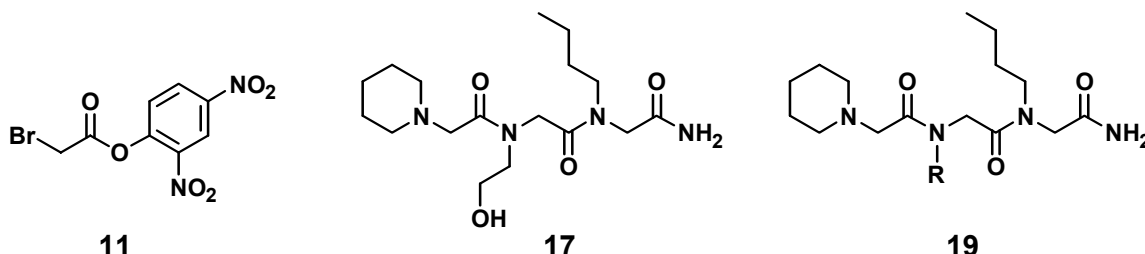
Als Grundlage wurde zunächst die neue, esterfrei aminoderivatisierte Zellulosemembran **38** mit Derivatisierungsgraden zwischen 0.6 und 1.4 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ durch Alkylierung von Zellulose (**7**) mit dem Epoxid **35** und anschließender Einführung einer Spacer-Einheit zugänglich gemacht (Schema 29).



Schema 29: Synthese der esterfrei aminoderivatisierten Zellulosemembran **38**.

Es schloß sich die Optimierung der Peptoid-Synthesebedingungen an. Die Kernaufgabe war dabei die Entwicklung einer *N/O*-selektiven Bromacetylierungsmethode. Die SPOT-Synthese an Zellulose verlangt durch die Anwesenheit freier Hydroxyfunktionalitäten der Membran sowie durch den Kontakt der Reagenzien mit Luftfeuchtigkeit ein Reagenz, welches eine effiziente und selektive *N*-Acylierung in Anwesenheit von *O*-Nukleophilen zuläßt. Durch Untersuchung von sechs Aktivestern der Bromessigsäure konnte gezeigt werden, daß der kristalline Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) im Hinblick auf

Ausbeute und *N/O*-Selektivität optimale Eigenschaften besitzt. Das Hydroxy-Tripeptoid **17** wurde so in einer sechsstufigen Synthese mit einer Gesamt-Ausbeute von 81% und einer HPLC-Reinheit von 90% erhalten. Eine Veresterung der Seitenketten-Hydroxyfunktion konnte mit einer *N/O*-Selektivität von 93:7 weitgehend unterdrückt werden. Unter den Bedingungen der SPOT-Synthese ist der 2,4-Dinitrophenylester **11** sogar dem üblicherweise zur Peptoidsynthese verwendeten, *in situ* erzeugten Bromessigsäureanhydrid überlegen.



Im Rahmen der Optimierung der Bromsubstitutionsbedingungen konnte gezeigt werden, daß neben NMP und DMSO interessanterweise auch das bei der Synthese an fester Phase wenig gebräuchliche Wasser als Lösungsmittel geeignet ist. Wie bei der Synthese am Harz ist es dabei unvermeidlich, die Amine in hohem Überschuß sowie in hohen Konzentrationen anzuwenden. In vier Meßreihen wurden 46 Amine ($R-NH_2$) auf ihre Anwendbarkeit bei der Synthese der Tripeptide **19** untersucht. Aus den Ergebnissen konnten Gesetzmäßigkeiten abgeleitet werden, die eine Abschätzung der Verwendbarkeit von Aminen für die Peptoidsynthese im Hinblick auf Flüchtigkeit, sterischen Anspruch, Nukleophilie des Stickstoffatoms sowie vorhandene funktionelle Seitengruppen ermöglichen.

(2) Synthese und Screening von Peptoid-Bibliotheken

Unter den optimierten Synthesebedingungen wurden zwei Bibliotheken mit jeweils 8000 Tri- bzw. Hexapeptoiden synthetisiert. Die Trimeren-Bibliothek beinhaltete dabei den gesamten Sequenzraum basierend auf 20 Bausteinen ($20 \times 20 \times 20$), während die Verbindungen der Hexameren-Bibliothek aus einem wesentlich größeren, auf 40 Bausteinen basierenden Sequenzraum statistisch ausgewählt wurden. Um zu überprüfen, ob sich die Bibliotheken zur Auffindung von Protein-Liganden eignen, wurden sie auf Bindung zum monoklonalen Antikörper Tab-2 untersucht. Es konnten in beiden Fällen bindende Oligomere identifiziert werden. Die höchsten Affinitäten wurden für das Trimer **98** ($K_D = 87 \mu M$) sowie das Hexamer **109** ($K_D = 2.7 \mu M$) bestimmt (Abb. 32), wobei die Messung der Dissoziationskonstanten nach Resynthese der Verbindungen am Harz und anschließender Quantifizierung der Affinität mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz erfolgte. Mit der hier angewendeten *de novo*-Methode konnten somit Peptide identifiziert werden, die sich vom Peptid-Epitop des Antikörpers [VVSHFND-NH₂] deutlich unterscheiden.

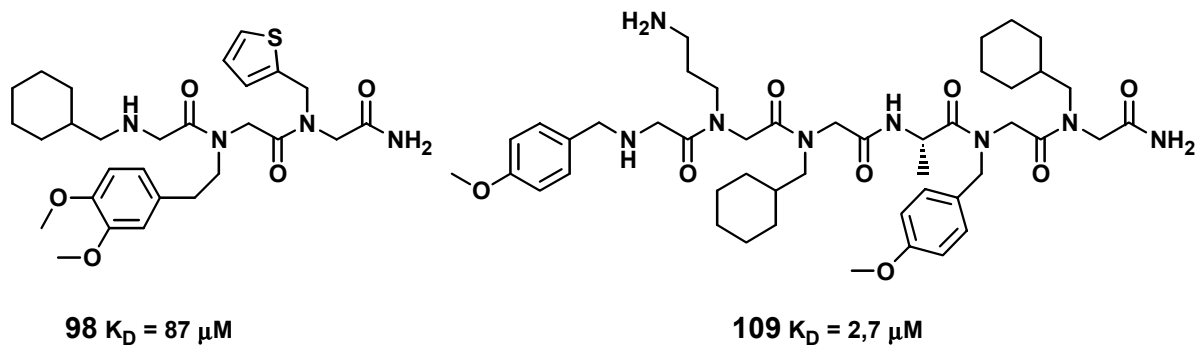
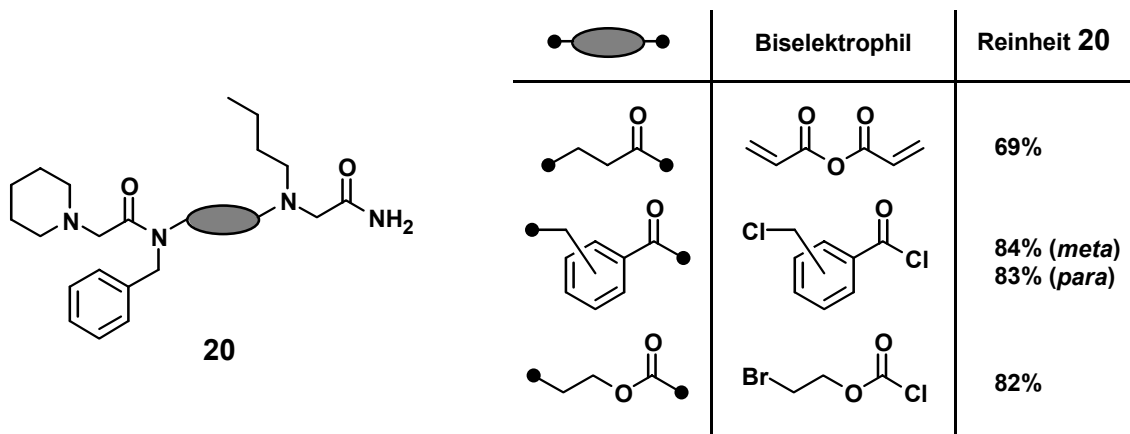


Abb. 32: Strukturen und Dissoziationskonstanten der aktivsten Verbindungen aus dem Screening einer Tripeptoid- sowie einer Hexapeptoid Bibliothek auf Bindung zum Antikörper Tab-2.

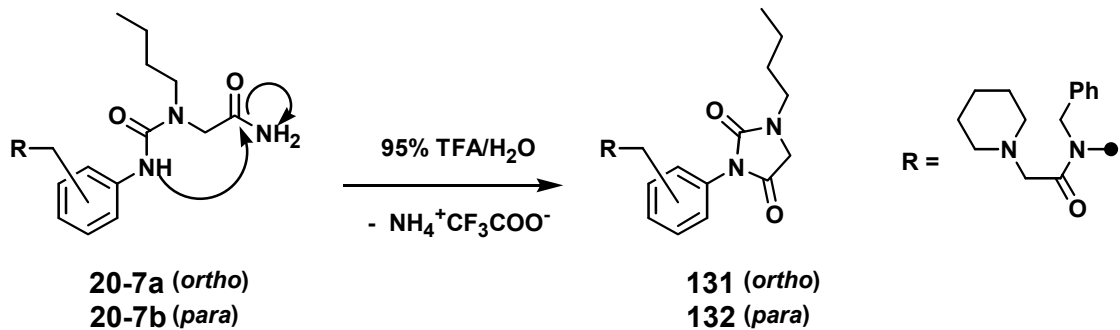
(3) Rückgratmodifizierte Peptide

Mit dem Ziel, Rückgratmodifikationen in Peptide einzufügen, wurden neun Biselektrophile im Rahmen eines „chemischen Screenings“ zur Synthese des Trimers **20** verwendet. Es unterscheidet sich vom entsprechenden Tripeptoid durch Verwendung eines neuen Rückgrat-Bausteins anstelle von Bromessigsäure in der mittleren Position. Die Untersuchung ergab, daß vier der Bausteine zur Synthese geeignet sind. Es wurde damit die Einführung von β -Peptid-, *m*- und *p*-Aminomethylbenzoesäure- sowie Carbamat-Einheiten in Peptide in Reinheiten zwischen 69 und 84% (HPLC) möglich (Schema 30). Ein Schlüsselschritt war die Vorbehandlung der SPOTs mit der unflüchtigen Base *N*-Benzylimidazol, um die bei der Acylierung freiwerdende Säure abzufangen. Die verglichen mit einer Vorabmischung verringerte Kontaktzeit der aktivierten Säuren mit der tertiären Base verhinderte Nebenreaktionen wie z.B. eine vorzeitige Hydrolyse.



Schema 30: Mögliche Rückgratmodifikationen bei der Synthese des Trimers **20**.

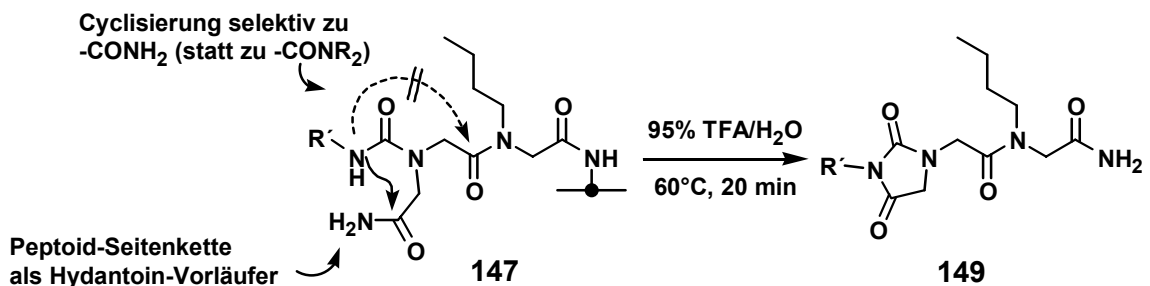
Beim Versuch, in analoger Weise auch Harnstoffe wie **20-7a** oder **20-7b** zugänglich zu machen, wurden zwar gute Acylierungsausbeuten erzielt, es wurde jedoch unter den Bedingungen der Abspaltung vom Rink-Linker (95% TFA/H₂O) in erheblichem Ausmaß eine Cyclisierung zu den Hydantoinen **131** bzw. **132** beobachtet.



Diese interessante Reaktion wurde näher untersucht, um die SPOT-Methode auf die Synthese von Hydantoinen als heterocyclische Struktur zu erweitern.

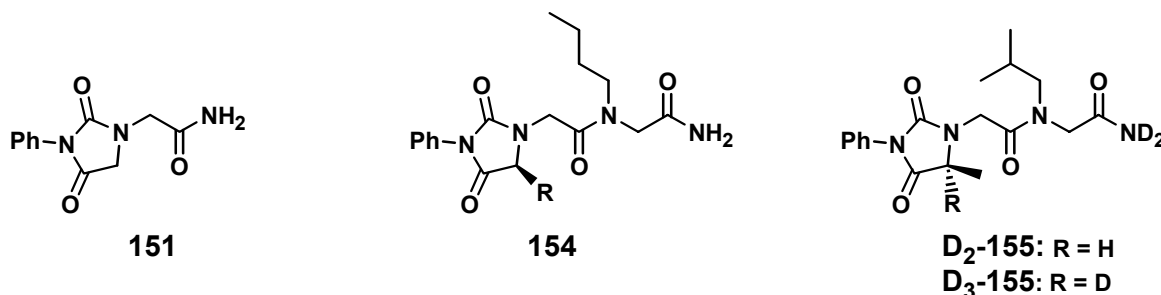
(4) Synthese von Hydantoinen an Zellulosemembranen

Die Bildung von Hydantoinen in einer Cyclisierungsreaktion, bei der Ammoniak aus einem Amid freigesetzt wird, wurde an fester Phase noch nicht genutzt, während dieser Reaktionstyp in Lösung bereits intensiv untersucht wurde.^[161,185] Es war bekannt, daß die Cyclisierung deutlich schneller mit unsubstituierten Amiden (-CONH₂) als mit substituierten (-CONR₂) verläuft. Um das Oligomerenkonzept mit der Hydantoinchemie zu verbinden wurden daher Harnstoffe **147** als Cyclisierungsvorläufer gewählt, die die Amidgruppe (-CONH₂) in Form einer Peptoid-Seitenkette tragen (Schema 31). Die Optimierung der Cyclisierungsbedingungen ergab eine vollständige Reaktion zum Hydantoin **149** bei einer Behandlung des Vorläufers mit TFA (95% in H₂O) bei 60°C nach 10 bis 20 Minuten je nach Substituent R' am Harnstoff.



Schema 31: Hydantoin-synthese durch Cyclisierung *N*-terminal carbamoylierter Dipeptide **147** (R' = Ph, *n*-Butyl).

Zu Bestätigung der Hydantoin-Struktur wurde die Verbindung **151** an einer Zellulosemembran von ausreichender Größe synthetisiert (25 cm²), um genügend Substanz für eine NMR-spektroskopische Untersuchung zu erhalten. Mit der erfolgreichen Analyse der Verbindung konnte erstmals das NMR-Spektrum einer Substanz aufgenommen werden, die mittels SPOT-Synthese hergestellt wurde (vergl. Abb. 31, Seite 108).



Die Untersuchungen von Hydantoinen wurden durch die Synthese C-substituierter Hydantoine **154** abgerundet. Es zeigte sich, daß Substitutionen mit einer Reihe von Resten (R) möglich sind, die durch Verwendung von α -Aminosäureamiden bzw. -*tert*-butylestern enantiomerenrein eingebracht werden können. Daß die Verbindungen unter den Cyclisierungsbedingungen nicht racemisieren, konnte abschließend durch Anwendung von deuterierten Cyclisierungsreagenzien auf das Hydantoin **D₂-155** gezeigt werden: das bei Racemisierung auftretende ringdeutierte Hydantoin **D₃-155** wurde nicht beobachtet.

Ausblick

Durch das Festphasen-Screening zellulosegebundener Peptoide auf Bindung zum Antikörper mAk Tab-2 konnte gezeigt werden, daß sich die SPOT-Synthese eignet, neben Peptiden^[50] auch biologisch aktive Nicht-Peptide *de novo* zu identifizieren. Basierend auf diesen Ergebnissen können die gefundenen (Leit-)Strukturen einer Optimierung durch weitere, nunmehr wissenschaftsbasierte, Peptoid-Bibliotheken unterworfen werden, was zu wesentlich höheren Affinitäten führen sollte. Interessant wäre auch eine vergleichende Analyse der Aktivkonformationen der als bindend identifizierten Oligomere mit dem Peptidpitop des Antikörpers. Zwar ist der direkte strukturelle Vergleich aufgrund der konformationellen Flexibilität von Peptiden und Peptoiden erschwert, mit Verfahren wie der Kristallstrukturanalyse von Kristallen des Antikörpers mit gebundenem Liganden oder *Molecular Modelling*-Methoden könnten die Aktivkonformationen jedoch zugänglich gemacht werden. In einer Erweiterung der durchgeführten Bindungsstudien können die vorhandenen Bibliotheken ferner zum Screening mit weiteren Proteinen eingesetzt werden, um andere Leitstrukturen aus der gleichen Bibliothek zu identifizieren.

Durch die Untersuchungen, die auf der erfolgreichen SPOT-Synthese von Peptoiden aufbauen, konnten zusätzlich zu Seitenkettenvariationen auch Rückgratmodifikationen bis hin zu Peptoid-Hydantoin-Hybridverbindungen zugänglich gemacht werden. Mit entsprechenden Bibliotheken sind interessante Ergebnisse in Bindungsstudien zu erwarten. Die modulare Chemie ermöglicht darüberhinaus eine Vermischung der verschiedenen SPOT-Synthesemethoden, einschließlich der Peptidchemie. Im Sinne eines Transformationsprozesses ist damit eine sukzessive Veränderung eines bioaktiven Peptids über ein Peptoid hin zu einer heterocyclischen Struktur denkbar, was von großem Interesse für pharmazeutische Fragestellungen wäre.^[52,192]

8 Allgemeine Experimentelle Bedingungen

Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen Advanced ChemTech (Bamberg, Deutschland), Aldrich (Steinheim, Deutschland), Bachem (Heidelberg, Deutschland), J.T. Baker (Phillipsburg, USA), Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Lancaster (Mühlheim/Main, Deutschland), Merck Eurolab (Darmstadt, Deutschland), Neosystem (Straßburg, Frankreich), Novabiochem (Bad Soden, Deutschland) oder Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das TentaGel-S-RAM-Harz wurde bei der Firma RAPP Polymere (Tübingen, Deutschland) und das Rink-Amid MBHA-Harz bei der Firma Novabiochem (Bad Soden, Deutschland) bezogen.

Zur SPOT-Synthese wurden Whatman 50 Membranen (Whatman Maidstone, UK) verwendet, die auf die benötigte Größe zurechtgeschnitten wurden.

Folgende Substanzen wurden nach literaturbeschriebenen Verfahren hergestellt:

4-Hydroxyphenylmethylamin: Synthese aus 4-Hydroxybenzonnitril nach A.G. Johnston *et al.*^[193]

Mono-Boc-geschützte α,ω -Diamine: Synthese aus den entsprechenden Diaminen nach A.P. Krapcho *et al.*^[147] oder von Fluka.

Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden in der angegebenen Qualität ohne weitere Reinigung eingesetzt:

Acetonitril (Gradient grade, J.T. Baker); Dichlormethan (zur Synthese, Merck Eurolab); Diethylether (zur Synthese, Merck Eurolab); *N,N*-Dimethylformamid (LAB, Merck Eurolab); Dioxan (zur Synthese, Aldrich); Methanol (zur Synthese, Merck Eurolab).

Wasser wurde unter Verwendung einer Vollentsalzungsanlage (Milli-Q Plus, Millipore) entmineralisiert.

Die Lösungsmittel für Reagenzien, die zur SPOT-Synthese verwendet wurden, wurden über Molsieb gelagert: *N*-Methylpyrrolidon und Dimethylsulfoxid (beide: Fluka).

Chromatographie und Physikalische Daten

Dünnschichtchromatographische Kontrolle (DC-Kontrolle) und R_f -Wert-Bestimmung erfolgten auf mit Kieselgel beschichteten Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm, Merck Eurolab). Die Detektion erfolgte durch Beobachtung der Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sowie der Färbungen nach Eintauchen in Ninhydrinlösung (0.3% in

n-Butanol mit 3% Essigsäure) oder Molybdätophosphorsäurelösung (5% in Ethanol) und Heißluftbehandlung.

Säulenchromatographie (SC) wurde an Kieselgel (Kieselgel 60, 0.063 - 0.200 mm Merck Eurolab) durchgeführt.

(RP-)HPLC (präparativ) erfolgte mit einem System der Firma Merck/Hitachi (Quaternäre Pumpe L-6250, Variabler UV-Detektor L-7400, Interface D-7000, Software: HPLC Systemmanager D-7000 für NT 4.0) unter Verwendung einer Säule der Firma Merck Eurolab (LiChrospher 100, RP18, 10 x 250 mm) bei einem Lösungsmittelfluß von 6.0 ml/min; Die Laufmittel-Gradienten wurden aus einem analytischen Probe-Chromatogramm abgeleitet. Das verwendete Lösungsmittelsystem setzte sich aus den Komponenten **A** (H₂O/0.1 Vol-% TFA) und **B** (CH₃CN/0.1 Vol-% TFA) zusammen.

(RP-)HPLC-MS-Analysen wurden durch Chromatographie unter Verwendung eines Hewlett Packard Serie 1100-Systems (Entgaser G1322A, Quaternäre Pumpe G1311A, Automatischer Probengeber G1313A, Thermostatiertes Säulenfach G 1316A, Variabler UV-Detektor G1314A) und gekoppelter ESI-MS (Finnigan LCQ Ion-Trap-Massenspektrometer) durchgeführt. Dazu wurde einer Steuersoftware der Firma Finnigan verwendet (Navigator Ver 1.1 sp1). Als Stoßgas in der Ionenfalle diente Helium. Die Trennung erfolgte an RP-18-Säulenmaterial (Vydac 218 TP5215, 2.1 x 150 mm, 5 µm, C18, 300 A mit Vorsäule) bei 30°C und einem Fluß von 0.3 ml/min unter Anwendung eines linearen Gradienten für alle Chromatogramme (5-95% **B** innerhalb von 25 min, wobei **A**: 0.05% TFA in Wasser und **B**: 0.05% TFA in CH₃CN). Die UV-Detektion erfolgte bei $\lambda = 220$ nm. Retentionszeiten (RT) sind im Dezimalsystem angegeben (z.B. 1.9 min = 1 min 54 sec) und beziehen sich auf die Detektion im Massenspektrometer. Die Totzeit zwischen Injektion und UV-Detektion (HPLC) betrug 1.65 min, zwischen UV-Detektion und Massen-Detektion 0.21 min. Innerhalb eines Laufes erfolgte die Massenanalyse mittels einer Abfolge verschiedener Spektren-Typen: (a) Standard-Spektren in den Massen-Bereichen 50-600 und 150-2000, (b) MS²-Spektren der beiden intensivsten Ionen im Bereich 50-600 mit einer Kollisions-Energie von 24% und (c) *Collision-Induced Dissociation*- (CID-)Spektren im Bereich 50-600 bei 35% Kollisions-Energie. Für Produkte mit einer Masse $600 < M < 1000$ wurde im Bereich 50-1000 anstelle von 150-600 gearbeitet. Die Zuordnung der Reaktionsprodukte zu den Signalen des UV-Detektors der HPLC wurde durch Anwendung von Massenfiltern für die gesuchte(n) Masse(n) durchgeführt. Die theoretischen Massen sind mit den exakten Massen der Hauptisotope berechnet. Die angegebenen Werte beschreiben die beobachtete Masse m/z , wobei im Massen-Bereich $m/z < 1000$ gewöhnlich das $M+H^+$ bzw. (selten) $M+Na^+$ -Ion die intensivsten Signale ergeben (keine Hochladungen wie z.B. $M+2 H^+$). Die Beschreibung der Massenspektren wurde auf Signale mit einer Intensität $> 15\%$ sowie auf charakteristische Signale $> 5\%$ beschränkt (die Signalintensität in % ist in Klammern angegeben). Die Werte wurden auf 10%-Schritte gerundet. Die Genauigkeit des Massenspektrometers beträgt ca. $m/z \pm 0.2$.

Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät 9200 der Firma Elektrothermal gemessen.

FT-IR-Spektren wurden mit einem Gerät der Firma Bruker (IFS 66) aufgenommen. Die Peakmaxima sind in Wellenzahlen ($\tilde{\nu}$) in cm^{-1} angegeben.

UV-Absorptionen wurden mit dem Gerät Ultrospec 3000 der Firma Pharmacia Biotech gemessen.

Kernspinresonanz- (NMR-)Spektren wurden an den Geräten Varian Unity-plus 300 und Unity-plus 500 aufgenommen. Als interner Standard diente in ^1H -NMR-Spektren Tetramethylsilan ($\delta_{\text{H}} = 0.00$ ppm) oder Signale der Restprotonen aus CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.24$ ppm) oder $[\text{D}_6]$ -DMSO ($\delta_{\text{H}} = 2.50$ ppm). Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden breitbandenkoppelt und, wenn nicht anders angegeben, mit APT aufgenommen und mittels internem Standard referenziert (CDCl_3 : $\delta_{\text{C}} = 77.0$ ppm, $[\text{D}_6]$ -DMSO: $\delta_{\text{C}} = 39.4$ ppm). Zugeordnete Signale sind im Einklang mit dem gemessenen Signal-Vorzeichen (*prim/tert-C* oder *sek/quart-C*). In ^{19}F -NMR-Spektren diente CFCl_3 ($\delta_{\text{F}} = 0$ ppm) als interner Standard. Alle Verschiebungen (δ) sind in ppm, alle Kopplungskonstanten (J) in Hz angegeben. Bei den Kopplungen handelt es sich, wenn nicht anders angegeben, um H,H -Kopplungen. Alle Spektren wurden bei 25°C aufgenommen.

ESI-Massenspektroskopie: siehe unter (RP-)HPLC-MS.

Elementaranalysen wurden am Institut für Chemie der Humboldt-Universität Berlin am Analyseautomat CHNS-933 der Firma LECO bestimmt. Die Brom-Bestimmung erfolgte durch Aufschluß der Verbindung nach Schöniger und Titration der freigesetzten Halogenidionen mit $0.01\text{ N Hg}(\text{ClO}_4)_2$ unter Verwendung von Diphenylcarbazon als Indikator nach Dirscherl und Erne.

SPOT-Synthese

Die automatische SPOT-Synthese erfolgte mit dem Gerät Autospot Robot AMS 222 (Abimed, Langenfeld, Deutschland) unter Anwendung der Steuersoftware Autospot XL Ver. 2.02. Die benötigten Steuerdateien, in denen Ort und Sequenzen der SPOTs festgelegt wurden, wurden mit den Programmen LISA und DIGEN (beide: Jerini Bio Tools GmbH, Berlin, Deutschland) angefertigt. Die Waschschrte erfolgten in Edelstahlschalen (Merck Eurolab), die auf einem Wipptisch (Labortechnik Fröbel, Lindau/Bodensee, Deutschland) bewegt wurden. Für Reaktionen bei erhöhter Temperatur wurde die Membran in einer Edelstahlschale auf einer regelbaren Heizmatte (Merck Eurolab) erwärmt oder in einer mit einem Glasdeckel verschlossenen Glasschale in einem Haushaltsmikrowellenofen bei 810 W Mikrowellenleistung behandelt. Einzelne SPOTs wurden mit einem Büro-Locher ausgestanzt und zur Weiterbehandlung in eine Mikrotiterplatte oder 2.0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Thermomixer 5437, Zentrifuge 5475C und Vakuumzentrifuge 5301 der Firma Eppendorf wurden zur Behandlung von Zellulosespots in Eppendorf-Reaktoren verwendet. Zur Beschleunigung des Lösungsvorganges von Reagenzien für die SPOT-Synthese wurde ein Ultraschallbad verwendet (Sonomatic 300 PC). Zur Spaltung des Photo-Linkers **48** wurde UV-Licht verwendet, welches mit dem Gerät Vilber Lourmat TFX 20 LC (7 mW/cm^2 bei $320\text{-}390\text{ nm}$, Bestrahlungsfläche: $20 \times 20\text{ cm}$) oder Beltron UV-

Trockner 50/II [340 mW/cm² bei $\lambda > 310$ nm (Borsilikat-Filter)] erzeugt wurde. Bei den angegebenen UV-Energiedichten handelt es sich um Herstellerangaben.

Bindungsstudien

Die monoklonalen Antikörper Tab-2 und TE-33 wurden von W. Höhne (Institut für Biochemie, Charité, Humboldt-Universität, Berlin) bzw. T. Scherf (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt.

Die Bestimmung von Bindung an zellulosegebundene Peptoid-Bibliotheken erfolgte mit dem LumiImager™ der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland), bei der auch die Reagenzien *Blocking Reagent* und *Luminescence Substrate Solution A* und *B* erworben wurden. Die verwendete TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) war 10 mM und auf pH = 8.0 eingestellt. Der anti-Maus IgG Nachweis-Antikörper wurde von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Die Bestimmung von Dissoziationskonstanten mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz wurde mit einem System der Firma Biacore AB (Uppsala, Schweden) durchgeführt [Gerät: Biacore X, Software: Biacore X Control Software 2.1, BIAevaluation 3.0.1, Sensor Chip: CM5, Puffer: HBS-EP [Zusammensetzung: HEPES (0.01 M, pH = 7.4); NaCl (0.15 M), EDTA (3 mM), Polysorbat 20 (0.005%, v/v)], Immobilisierung: Kit zur Aminkopplung, Regenerierung: Glycin/HCl-Puffer (10 mM, pH = 2.0)].

9 Durchführung

9.1 Synthesen in Lösung

9.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: *Synthese von Bromessigsäure-nitrophenylestern aus Bromessigsäurebromid und Nitrophenolen*

In CH₂Cl₂ (80 ml) werden 54.3 mmol eines Nitrophenols, welches zuvor für 4 Stunden bei 0.1 mbar getrocknet wurde, gelöst und mit 5.71 ml (70.6 mmol, 1.3 Äq.) wasserfreiem Pyridin versetzt. Bei 0°C werden innerhalb von 15 Minuten 5.20 ml (59.7 mmol, 1.1 Äq.) Bromessigsäurebromid in CH₂Cl₂ (25 ml) zugetropft. Man erwärmt auf 25°C und gibt nach 1 Stunde H₂O (30 ml) zu. Nach Trennen der Phasen wird die organische Phase mit einer 10%igen wäßrigen Citronensäure-Lösung (30 ml) ausgeschüttelt. Die CH₂Cl₂-Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration *i. vac.* abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird bei 0.1 mbar von restlichem Lösungsmittel befreit und durch Kristallisation aus Diethylether gereinigt. Die Lagerung sollte lichtgeschützt erfolgen.

AAV 2: *Synthese von Bromessigsäureestern aus Bromessigsäure (53) unter Verwendung von DCC*

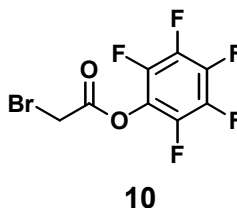
Zu einer Lösung von 1.39 g (10 mmol) Bromessigsäure (**53**) und eines Alkohols (10 mmol) in CH₂Cl₂ (50 ml) wird unter heftigem Rühren festes DCC (10 mmol) innerhalb von 3 Minuten in 3 Portionen gegeben. Man läßt 60 Minuten reagieren, filtriert vom Niederschlag ab und entfernt das Lösungsmittel *i. vac.* zunächst am Rotationsverdampfer und nachfolgend bei 0.1 mbar. Der erhaltene Ester wird aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert bzw. durch Gefriertrocknung aus einer Lösung in Dioxan erhalten.

AAV 3: *Synthese von ω-Tritylthioalkylaminen modifiziert nach F.I. Carroll et al.^[150]*

Methanol (50 ml) wird unter Argon mit 2.81 ml einer methanolischen Lösung von Natriummethylat (5.4 M, 15.2 mmol, 2.1 Äq.) versetzt. Bei 0°C gibt man zuerst 2.00 g (7.24 mmol, 1.0 Äq) Triphenylmethanthiol (**82**) und nach 5 Minuten 7.24 mmol (1.0 Äq) eines ω-Aminoalkylbromidhydrobromids zu, erwärmt auf 25°C (30 min) und erhitzt anschließend zum Sieden (3 h). Nach Abkühlen der Reaktionsmischung wird das Lösungsmittel *i. vac.* entfernt, das Rohprodukt mit ges. NaCl-Lsg., K₂CO₃ (5% in H₂O) und Ethylacetat (je 30 ml) versetzt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer *i. vac.* entfernt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie gereinigt (40 g Kieselgel, Laufmittel CH₂Cl₂ und im Anschluß CH₂Cl₂/Methanol 9:1).

9.1.2 Spezielle Synthesen

9.1.2.1 Bromessigsäure-pentafluorphenylester



Zu einer Lösung von 1.89 ml (21.7 mmol) Bromessigsäurebromid in CH₂Cl₂ (30 ml) wurde bei 0°C eine Lösung von 4.00 g (21.7 mmol, 1.0 Äq.) Pentafluorphenol und 3.79 ml (21.7 mmol, 1.0 Äq.) DIEA in CH₂Cl₂ (30 ml) innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Man erwärmte auf 25°C und ließ 1 Stunde reagieren. Anschließend schüttelte man mit Wasser (2 x 30 ml) aus. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration *i. vac.* abdestilliert. Das erhaltene Öl wurde bei 0.1 mbar von restlichem Lösungsmittel befreit und man erhielt 6.10 g (20.0 mmol, 92%) Bromessigsäurepentafluorphenylester (**10**) als farbloses Öl. Das Produkt wurde bei 4°C über Molsieb gelagert.

IR (Film): 2969 m (CH₂), 2672 m, 2464 m, 1810/1790 br (C=O), 1655 s, 1520 br (Ar-C=C), 1473 s, 1425 s, 1403 s, 1241 br, 1222 br, 1145 s, 1095 br, 1000 br, 599 s.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.15 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (75.45 MHz, CDCl₃): δ = 23.2 (CH₂), 124.2-125.0 (m, Ar-C-O), 135.8-143.2 (m, Ar-C-F, Signale durch (¹³C, ¹⁹F)-Kopplungen aufgespalten), 163.7 (C=O).

¹⁹F-NMR [284 MHz, CDCl₃, verunreinigt mit < 3 Mol% Pentafluorphenol: δ = -168.86 (tt, ³J = 22, ⁴J = 6.0, 1F, *p*-F), -164.32 – -163.89 (m, 4F, *o*- und *m*-F)*]: δ = -162.16 (dd, ³J = 22, ³J = 18, 2F, *m*-F), -157.25 (t, ³J = 22, *p*-F), -152.93 (d, ³J = 18, *o*-F).

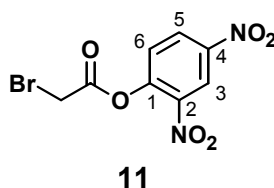
*: Die Signale von Pentafluorphenol entsprechen den in der Literatur genannten.^[194]

Elementaranalyse: C₈H₂O₂BrF₅ (305.00).

ber.: C: 31.50%, H: 0.66%, Br: 26.20%;

gef.: C: 31.36%, H: 0.77%, Br: 25.93%.

9.1.2.2 Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester



Nach AAV 1 wurden 10.0 g (54.3 mmol) 2,4-Dinitrophenol umgesetzt. Nach Kristallisation aus Diethylether (200 ml) bei -26°C erhielt man 13.0 g (42.6 mmol, 78% bez. auf 2,4-Dinitrophenol) Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) als hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 108-109°C.

IR (KBr): 3112 m (Ar-C-H), 3071 m, 2957 m (-CH₂-), 1783 m (C=O), 1608 m (Ar-C=C), 1538 br, 1344 br (-NO₂), 1219 s, 1097 br, 919 s, 836 s, 733 m.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.19 (s, 2H, -CH₂-), 7.56 (d, ³J = 8.9, 1H, Ar-H₆), 8.91 (dd, ³J = 8.9, ⁴J = 2.7, 1H, Ar-H₅), 8.98 (d, ⁴J = 2.7, 1H, Ar-H₃).

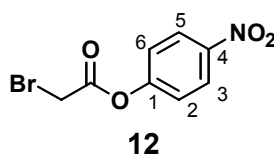
¹³C-NMR (75.45 MHz, CDCl₃): δ = 24.3 (CH₂), 121.8, 126.4, 129.3 (Ar-C-H), 141.2, 145.5, 147.8 (Ar-C-O), 164.2 (C=O).

Elementaranalyse: C₈H₅N₂O₆Br (305.04).

ber.: C: 31.50%, H: 1.65%, N: 9.18%, Br: 26.19%;

gef.: C: 31.43%, H: 1.65%, N: 9.27%, Br: 26.32%.

9.1.2.3 Bromessigsäure-4-nitrophenylester



Nach AAV 1 wurden 6.00 g (43.0 mmol) 4-Nitrophenol umgesetzt. Nach Kristallisation aus Diethylether (160 ml) bei 4°C erhielt man 6.80 g (26.1 mmol, 61% bez. auf 4-Nitrophenol) Bromessigsäure-4-nitrophenylester (**12**) als farblose Kristalle.

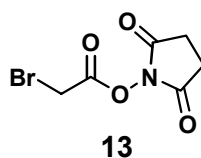
Schmp.: 81-84°C (Lit.: 86-87°C^[134]).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.08 (s, 2H, CH₂), 7.34 (d, ³J = 9.0, 2H, Ar-H), 8.30 (d, ³J = 8.0, 2H, Ar-H).

¹³C-NMR (75.45 MHz, CDCl₃): δ = 24.9 (CH₂), 122.0, 125.3 (Ar-C-H), 149.0, 154.8 (Ar-C-O), 164.8 (C=O).

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[134]

9.1.2.4 Bromessigsäure-N-succinimidylester



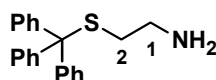
Nach AAV 2 wurden 1.22 g (10.6 mmol) HONSu umgesetzt. Man erhielt 2.61 g Bromessigsäure-N-succinimidylester (**13**) als weißen Feststoff (verunreinigt mit 7% Dicyclohexylharnstoff nach ¹H-NMR, 10.6 mmol, 100%). Das Produkt wurde nicht weiter gereinigt.

Schmp.: 108-110°C (Lit.: 110°C^[135]).

¹H-NMR [300 MHz, CDCl₃, verunreinigt mit 7 Mol% Dicyclohexylharnstoff: δ = 1.10-1.95 (m, 20H, Cyclohexyl-CH₂), 3.33-3.48 (m, 2H, Cyclohexyl-CH)]: δ = 2.87 (br-s, 4H, CH₂-CH₂), 4.11 (s, 2H, Br-CH₂).

¹³C-NMR (75.45 MHz, CDCl₃): δ = 21.1 (Br-CH₂), 25.5 (CH₂-CH₂), 162.9 (Ester-C=O), 168.4 (Amid-C=O).

9.1.2.5 2-Tritylthioethylamin (vergl. Tab. 13, Eintrag 3f)



85

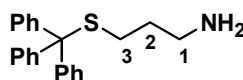
Nach AAV 3 wurden 1.48 g (7.24 mmol) 2-Aminoethylbromidhydrobromid (**83**) umgesetzt. Man erhielt nach Säulenchromatographie [SC: 40 g Kieselgel, Laufmittel CH₂Cl₂ und im Anschluß CH₂Cl₂/Methanol 9:1] und Gefriertrocknung einer Lösung des gereinigten Produktes in Dioxan (25 ml) 1.97 g (6.17 mmol, 85%) 2-Tritylthioethylamin (**85**) als farblosen Feststoff.

R_f (CH₂Cl₂/Methanol 9:1) = 0.21.

Schmp.: 85-88°C (Lit.^[150]: 85-92°C).

¹H-NMR (300 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 2.16 (br-t, ³J = 7.2, 2H, 2-CH₂), 2.42 (br-t, ³J = 7.2, 2H, 1-CH₂), 7.20-7.40 (m, 15H, Ar-H). Die Spektraldaten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[150]

9.1.2.6 3-Tritylthiopropylamin (vergl. Tab. 13, Eintrag 3g)



86

Nach AAV 3 wurden 4.75 g (21.7 mmol) 3-Aminopropylbromidhydrobromid (**84**) umgesetzt. Man erhielt nach Säulenchromatographie [SC: 120 g Kieselgel, Laufmittel CH₂Cl₂ und im Anschluß CH₂Cl₂/Methanol 9:1] 7.06 g (21.2 mmol, 97%) 3-Tritylthiopropylamin (**86**) als hellgelben, amorphen Feststoff. Das mit Methanol verunreinigte Produkt (5% nach ¹H-NMR) wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

R_f (CH₂Cl₂/Methanol 9:1) = 0.27.

¹H-NMR [300 MHz, CDCl₃, verunreinigt mit 56 Mol% Methanol: δ = 3.35 (s, 8H, CH₂): δ = 1.38 (br-s, 2H, NH₂), 1.44 (br-pent., ³J = 7.2, 2H, 2-CH₂), 2.11 (br-t, ³J = 7.2, 2H, 3-CH₂), 2.54 (br-t, ³J = 7.2, 2H, 1-CH₂), 7.09-7.38 (m, 15H, Ar-H).

9.1.3 Untersuchungen zur *N/O*-Selektivität von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester in Lösung mittels $^1\text{H-NMR}$

Zur Untersuchung der *N/O*-Selektivität von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) gegenüber Diethylamin (**66**) und Methanol (**68**) wurden folgende Lösungen in Deuteriochloroform angefertigt: (A) 30 mM Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**); (B) 60 mM Diethylamin; (C) 120 mM Methanol; (D) 400 mM Methanol und (E) 30 mM Triethylamin. Alle Reagenzien wurden dabei in 2.0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße eingewogen, um eine genaue Einstellung der Konzentration zu ermöglichen. In einem 1.5 ml Reaktionsgefäß wurden die Substanzen jeweils gemäß Tab. 24 gemischt. Dabei wurde die Bromessigsäure-Lösung (A) als letztes zugegeben und sofort danach durchmischt. Die Lösungen wurden nach den in Tab. 8 (Seite 49) angegebenen Zeiten $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch vermessen. Anhand der Integrale der Methylensignale der beteiligten Substanzen wurden die Produktverhältnisse bestimmt, sowie auf die genauen Verhältnisse der Edukte geschlossen (vergl. Tab. 8).

Tab. 24: Ansätze für die NMR-spektroskopische Bestimmung der *N/O*-Selektivität der Umsetzung von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) mit Diethylamin (**66**) und Methanol (**68**) in einem Konkurrenzexperiment [Die Buchstaben entsprechen den Lösungen wie oben im Text beschrieben. Die Nummer entspricht dem Versuchseintrag in Tab. 8 (Seite 49). Angegebene Werte in ml. Die Zugabe von (A) erfolgte als letztes; F = Deuteriochloroform].

Nr.	A	B	C	D	E	F
1	0.5	0.25	-	-	-	0.25
2	0.5	-	0.25	-	-	0.25
3/4	0.5	-	0.25	-	0.25	-
5/6	0.5	0.25	0.125	-	-	0.125
7	0.5	0.25	-	0.25	-	-

Beobachtete Reaktions-Edukte:

Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**): vergl. 9.1.2.2.

Methanol (**68**): $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.42$ (s, 3H, CH_3).

Triethylamin: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.23$ (t, $^3J = 7.3$, 9H, CH_3), 3.11 (q, $^3J = 7.3$, 6H, CH_2).

Beobachtete Reaktionsprodukte:

2-Brom-*N,N*-diethylacetamid (**67**): $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.07$ (t, $^3J = 7.2$, 3H, CH_3), 1.19 (t, $^3J = 7.2$, 3H, CH_3), 3.32 (q, $^3J = 7.2$, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.78 (s, 2H, Br-CH_2).

Bromessigsäuremethylester (**69**): $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.74$ (s, 2H, CH_3), 3.79 (s, 2H, CH_2).

2,4-Dinitrophenol (**55**): $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.27$ (d, $^3J = 9.3$, 1H, 6-Ar-H), 8.39 (dd, $^3J = 9.3$, $^4J = 2.7$, 1H, 5-Ar-H), 9.00 (d, $^4J = 2.7$, 1H, 3-Ar-H).

Bromessigsäure: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.88$ (s, 2H, CH_2).

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aller beteiligten Substanzen mit Ausnahme von 2-Brom-*N,N*-diethylacetamid (**67**) wurden durch getrennte Analyse authentischer Proben bestätigt.

9.2 Synthesen an Syntheseharzen

9.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift

AAV 4: *Synthese von Peptoiden an Syntheseharzen nach G.M. Figliozzi et al.* ^[104]

100 mg Fmoc-Rinkamid-Harz (0.50 mmol/g) werden in einen Kunststoffreaktor mit Fritte (10 ml) eingewogen und mit 2.0 ml DMF versetzt. Nach Filtration wird die Fmoc-Gruppe durch Behandlung mit Piperidin (2.0 ml, 20% in DMF, 1 x 1 min, 1 x 15 min) abgespalten. Man wäscht das Harz mit DMF (6 x 2.0 ml).

Acylierung: Man gibt 850 μ l Bromessigsäure (0.6 M in DMF, 10 Äq., 1 x 30 min) und 200 μ l DIC (3.2 M in DMF, 13 Äq.) zum Harz. Nach 30 Minuten wird die Lösung entfernt und der Acylierungsvorgang einmal wiederholt. Das Harz wird mit DMF (2 x 2 ml) und DMSO gewaschen (1 x 2 ml).

Bromsubstitution: Die Bromsubstitution erfolgt mit 1.0 ml einer Lösung eines primären Amins in DMSO (1-2 M; 1 x 2 h). Das Harz wird mit DMSO (2 x 2 ml) und DMF gewaschen (1 x 2 ml).

Die Acylierungs- und Bromsubstitutionsschritte werden wiederholt, bis die volle Sequenz aufgebaut ist. Es erfolgt dann ein zusätzlicher Waschschrift mit CH_2Cl_2 (2 x 2 ml). Anschließend wird das Harz getrocknet. Zu Abspaltung des Peptoids vom Harz und gleichzeitiger Entfernung von Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz mit TFA (95% in H_2O , 5.0 ml) versetzt. Nach 20 Minuten wird die Lösung in einen Kolben überführt und das Harz mit TFA (95% in H_2O , 1.0 ml) gewaschen. Es wird H_2O (6 ml) zugesetzt und die Lösungsmittel durch Gefrieretrocknung entfernt. Das Produkt wird zweimal in 10 ml Essigsäure oder Acetonitril/ H_2O (1:1) aufgenommen und gefriergetrocknet. Man erhält das Produkt als Salz der Trifluoressigsäure (alle basischen Gruppen sind von je einem Molekül TFA protoniert) als weißes Pulver.

AAV 5: *Synthese von Peptoiden an Syntheseharzen modifiziert nach G.M. Figliozzi et al.* ^[104]

400 mg Tentagel-S-RAM-Harz (0.30 mmol/g) werden in eine Kunststoffspritze mit Fritte (10 ml) eingewogen und mit 4.0 ml Piperidin (20% in DMF) versetzt. Nach 40 Minuten wird abfiltriert und die tatsächliche Derivatisierung aus der freigesetzten Menge DBF-Piperidin-Addukt mittels Messung der UV-Absorption bestimmt ($\epsilon_{301} = 8100$ ^[121]). Man wäscht das Harz mit DMF (30 ml).

Acylierung: Je nach Baustein entscheidet sich, ob ein Cyclus aus Bromacetylierung und Bromsubstitution bzw. Acylierung und Fmoc-Abspaltung nach der Sub-Monomer- (a) oder der Monomer-Methode (b) durchgeführt wird.

(a): Sub-Monomer-Methode: Man acyliert mit 1.5 ml einer Lösung von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) in DMF (0.3 M, 3.75 Äq., 1 x 30 min).

(b): Monomer-Methode: Man acyliert mit 1.5 ml einer Lösung eines Fmoc-geschützten *N*-Alkylglycins in DMF (0.6 M), das 30 Minuten vor der Zugabe zum Harz mit DIC (0.55 Äq. bezogen auf Aminosäure) aktiviert wurde (3.75 Äq. Anhydrid bezogen auf die Harzbeladung, 1 x 30 min).

Das Harz wird mit DMF gewaschen (30 ml).

Bromsubstitution bzw. Fmoc-Abspaltung:

(a): Sub-Monomer-Methode: Die Bromsubstitution erfolgt mit 1.5 ml einer Lösung eines primärenamins in DMF (nach Möglichkeit 5 M, anderenfalls in möglichst hoher Konzentration; es sollten nicht unter 12 Äq. verwendet werden; 1 x 45 min). Sehr polare Amine können in wässriger Lösung unter Zusatz von 0.05% Tween[®] 20 eingesetzt werden, die mit 4.8 M wässriger NaOH auf pH = 9 eingestellt wurde. In diesem Fall muß das Harz vor und nach Amin-Zugabe mit H₂O gewaschen werden (je 30 ml).

(b): Monomer-Methode: Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wird das Harz mit 2.0 ml Piperidin (20% in DMF, 1 x 20 min) versetzt.

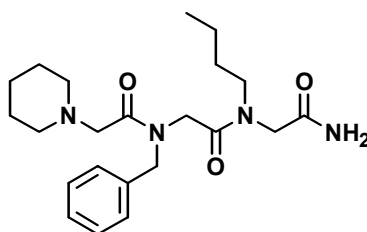
Das Harz wird mit DMF (20 ml), Piperidin (20% in DMF, 20 ml) und DMF (40 ml) gewaschen.

Die Acylierungsschritte werden wiederholt, bis die volle Sequenz aufgebaut ist. Es erfolgt dann zur Entfernung schwerlöslicher Rückstände eine umfangreiche, zusätzliche Waschprozedur: Piperidin (20% in DMF, 20 ml), DMF (30 ml), H₂O (30 ml), DMF (40 ml), Methanol (40 ml), CH₂Cl₂ (40 ml) und Et₂O (40 ml). Anschließend wird das Harz getrocknet. Zu Abspaltung des Peptoids vom Harz und gleichzeitiger Entfernung von Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz mit TFA (95% in H₂O, 6.0 ml) versetzt. Nach 30 Minuten wird die Lösung in einen Kolben überführt und das Harz mit Acetonitril (3 x 5 ml) gewaschen. Das Lösungsmittel der vereinten organischen Phasen wird bei 0.1 mbar entfernt (ohne den Kolben zu bewegen, ca. 3 h). Der Rückstand wird in 5 ml Acetonitril gelöst bzw. suspendiert und mit 50 ml H₂O versetzt. Nach Gefriertrocknung erhält man das Produkt als Salz der Trifluoressigsäure (alle basischen Gruppen sind von je einem Molekül TFA protoniert) als weißes Pulver.

Das Rohprodukt wird mittels HPLC-MS analysiert und ggf. mittels präp. HPLC gereinigt.

9.2.2 Spezielle Synthesen

9.2.2.1 N-Benzyl-N-[(butyl-carbamoylmethyl-carbamoyl)-methyl]-2-piperidin-1-yl-acetamid

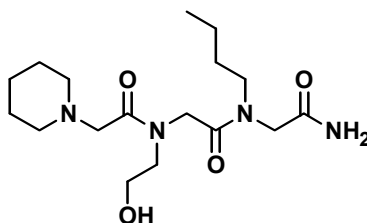


16

Die Synthese von **16** erfolgte nach AAV 4 an Rinkamid-MBHA-Harz (Nova-Biochem, 0.49 mmol/g, 100 mg). Abweichend wurde Bromessigsäure (30 Äq.) mit DCC (15 Äq.) und 2,6-Dimethylpyridin (75 Äq.) voraktiviert (10 min) und vor der Zugabe vom Niederschlag abzentrifugiert. Die Amine (*n*-Butylamin, Benzylamin und Piperidin) wurden als 5 M Lösungen in DMF eingesetzt (100 Äq.). Man erhielt 30.2 mg Rohprodukt (Reinheit: 83% nach HPLC). Nach Reinigung durch präparative HPLC erhielt man 14.2 mg der Titelverbindung als HPLC-einheitliches Produkt als Salz der Trifluoressigsäure (56%).

HPLC-MS: RT = 10.9; ber. ($M+H^+$): 403.27; gef.: 403.2 (100), 273.2 (10), 98.1 (40); (vergl. Abb. 16, Seite 40).

9.2.2.2 N-[(Butyl-carbamoylmethyl-carbamoyl)-methyl]-N-(2-hydroxyethyl)-2-piperidin-1-yl-acetamid

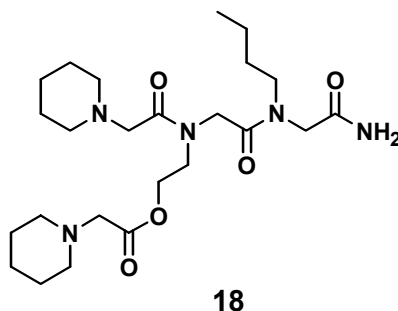


17

Die Synthese von **17** erfolgte nach AAV 4 an TG-S-RAM-Harz (Rapp-Polymere, 0.23 mmol/g, 190 mg). Die ersten beiden Acylierungen wurden abweichend mit Bromessigsäure (20 Äq.), DIC (10 Äq.) und 2,6-Dimethylpyridin (10 Äq.) in *einem* Kopplungszyklus durchgeführt. Die dritte Acylierung erfolgte mit Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**) (1.5 Äq., 1 x 20 min). Die Amine (*n*-Butylamin, Ethanolamin und Piperidin) wurden als 5 M Lösungen in DMF eingesetzt (100 Äq.). Man erhielt 16.9 mg Rohprodukt (Reinheit: 89% nach HPLC). Nach Reinigung durch präparative HPLC erhielt man 14.6 mg der Titelverbindung als HPLC-einheitliches Produkt als Salz der Trifluoressigsäure (36%).

HPLC-MS: RT = 6.2; ber. ($M+H^+$): 357.25; gef.: 357.1 (100), 227.2 (10), 98.1 (60); (vergl. Abb. 18, Seite 48).

9.2.2.3 Piperidin-1-yl-essigsäure-2-[[[(butyl-carbamoylmethyl-carbamoyl)-methyl]-(2-piperidin-1-yl-acetyl)-amino]-ethylester



Die Synthese von **18** erfolgte nach AAV 4 an TG-S-RAM-Harz (Rapp-Polymere, 0.23 mmol/g, 190 mg). Die ersten beiden Acylierungen wurden abweichend mit Bromessigsäure (20 Äq.), DIC (10 Äq.) und 2,6-Dimethylpyridin (10 Äq.) in einem Kopplungszyklus durchgeführt. Die dritte Acylierung erfolgte mit 40 Äq. 2,6-Dimethylpyridin in CH₂Cl₂ (1 x 20 min). Die Amine (*n*-Butylamin, Ethanolamin und Piperidin) wurden als 5 M Lösungen in DMF eingesetzt (100 Äq.). Man erhielt 32.2 mg Rohprodukt (Reinheit: 96% nach HPLC). Nach Reinigung durch präparative HPLC erhielt man 23.0 mg der Titelverbindung als HPLC-einheitliches Produkt als doppeltes Salz der Trifluoressigsäure (37%).

HPLC-MS: RT = 7.7; ber. ($M+H^+$): 482.34; gef.: 482.2 (100), 339.2 (50), 98.1 (20); (vergl. Abb. 18, Seite 48).

9.2.2.4 Synthesen von Tripeptoiden für Bindungsstudien in Lösung (97 - 100)

Die Tripeptide **97** (03-09-08), **98** (03-11-09), **99** (03-20-11) und **100** (05-16-12) wurden nach AAV 5 synthetisiert. Abweichend wurden **97**, **98** und **100** an MBHA-Harz (270 mg, 0.41 mmol/g, Nova-Biochem) und **99** an Tentagel-S-RAM-Harz (420 mg, 0.26 mmol/g) synthetisiert. Anstelle von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester erfolgte die Acylierung mit einer Lösung von Bromessigsäure in DMF (0.6 M), das 30 Minuten vor der Zugabe zum Harz mit DIC (0.55 Äq. bezogen auf Bromessigsäure) aktiviert wurde (3.75 Äq. Anhydrid bezogen auf die Harzbeladung, 1 x 30 min). Kurz vor der Zugabe zum Harz wurde 2,6-Dimethylpyridin (5.0 Äq. bezogen auf die Harzbeladung) zugegeben. Es wurden die folgenden Aminlösungen verwendet:

B-03: Cyclohexylmethylamin (5 M); **B-05:** Ethanolamin (5 M); **B-08:** Tryptamin (1.5 M); **B-09:** 2-Aminomethylthiophen (5 M); **B-11:** Homoveratrylamin (5 M); **B-12:** Napht-1-ylmethylamin (3.5 M); **B-16:** Fmoc-Sar-OH (Monomer-Methode); **B-20:** β-Alaninamid (2.5 M in H₂O aus dem Hydrochlorid mit 0.9 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20).

Analytische Daten der Rohprodukte und der durch präparative HPLC gereinigten Substanzen:

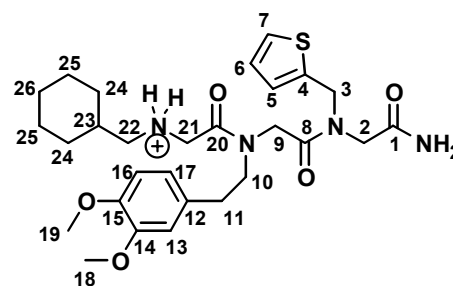
97: 16.8 mg (= 24%, M (TFA-Salz) = 637.71).

HPLC-MS: Reinheit: 89%; RT = 14.0; ber. ($M+H^+$): 524.27; gef.: 524.2 (100), 371.1 (10), 307.1 (10).

98: 66.4 mg (= 92%, M (TFA-Salz) = 658.73).

HPLC-MS: Reinheit: 87%; RT = 13.2; ber. ($M+H^+$): 545.28; gef.: 545.2 (100), 392.1 (10), 375.2 (10), 250.1 (30), 222.3 (10).

$^1\text{H-NMR}^*$ [500 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO] δ = 0.81-0.98 und 1.07-1.27 und 1.56-1.76 (jeweils m, zusammen 11H, 23-H, 24-H₂, 25-H₂, 26-H₂), 2.51-2.58 und



98 + H⁺

2.63-2.73 und 2.74-2.80 (jeweils m, zusammen 4H, 11-H₂, 22-H₂), 3.71, 3.72, 3.74, 3.75 (jeweils s, zusammen 6H, 18-H₃, 19-H₃), [3.75-3.87 (m) und 3.97, 3.99, 4.20, 4.28, 4.31, 4.46, 4.48, 4.60, 4.62, 4.69, 4.77, 4.79, 4.80 (jeweils s, zusammen 10H, 2-H₂, 3-H₂, 9-H₂, 10-H₂, 21-H₂)], 6.67-7.98 (m, 8H, 5-H, 6-H, 7-H, 13-H, 16-H, 17-H, CONH₂), 8.66, 8.74 (jeweils br-s, 2H, NH₂⁺); (vergl. Abb. 33, Seite 179).

$^{13}\text{C-NMR}^*$ [126 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO, Standard-Messung (kein APT)]: δ = 24.87, 24.94, 25.50, 29.82, 29.87, 32.46, 32.73, 34.13 (C-11, C-23, C-24, C-25, C-26), 44.66, 45.01, 46.19, 47.00, 47.15, 48.15, 48.38, 48.89, 49.09, 49.20, 52.95 (C-2, C-3, C-9, C-10, C-21, C-22), 55.44, 55.48, 55.50 (C-18, C-19), 111.90, 112.47, 112.91 (C-13, C-16), 120.47, 120.93, 125.84, 126.00, 126.10, 126.25, 126.35, 126.58, 126.60, 127.09, 127.15, 127.22, 127.30, 127.41, 127.68, 128.17, 130.79, 131.09, 131.16, 134.24, 139.36, 139.56, 139.74, 147.30, 147.52, 148.64, 148.75, 157.71, 157.96 (C-4, C-5, C-6, C-7, C-12, C-14, C-15, C-17), 165.27, 166.19, 167.32, 167.82, 167.98, 168.60, 169.32, 169.54 (C-1, C-8, C-20); (vergl. Abb. 34, Seite 179).

* Die Auswertung der NMR-Spektren wurde durch das Vorliegen von bis zu vier Isomeren (theoretischer Wert) erschwert, die auf die *cis/trans*-Isomerie der *N*-Alkylamid-Bindung an C-8 und C-20 zurückzuführen sind.

99: 38.8 mg (= 56%, M (TFA-Salz) = 633.66).

HPLC-MS: Reinheit: 76%; RT = 10.4; ber. ($M+H^+$): 520.32; gef.: 520.3 (100), 367.2 (20).

100: 51.2 mg (= 93%, M (TFA-Salz) = 500.47).

HPLC-MS: Reinheit: 89%; RT = 9.6; ber. ($M+H^+$): 387.21; gef.: 387.1 (100), 286.1 (30), 215.1 (10), 173.1 (10), 141.2 (50), 100.1 (10).

Die Verbindungen **97-100** wurden ohne weiter Reinigung in den Bindungsstudien eingesetzt.

9.2.2.5 Synthesen von Hexapeptoiden (**104**, **105**, **108**, **109**, **110** und **111**) sowie den Diketopiperazinen **103** und **107** für Bindungsstudien in Lösung.

Die Hexapeptoide **104**, **105**, **108**, **109**, **110** und **111** wurden nach AAV 5 mit der beschriebenen Ansatzgröße an Tentagel-S-RAM-Harz (400 mg; 0.23 mmol/g) synthetisiert. Die Reagenzienüberschüsse waren durch die gemessene niedrigere Harzbelegung etwas größer. Die Diketopiperazine **103** und **107** entstanden als Nebenprodukte bei der Synthese von **104** bzw. **108**.

104 (SPOT Nr.: **2456**) **03-03-06-22-06-03**

105 (SPOT Nr.: **3292**) **29-44-03-06-30-43**

108 (SPOT Nr.: **6247**) **32-22-39-03-13-43**

109 (SPOT Nr.: **636**) **39-26-03-31-39-03**

110 (SPOT Nr.: **7862**) **15-37-29-22-40-39**

111 (SPOT Nr.: **2078**) **33-31-26-38-18-39**

Es wurden die folgenden Aminlösungen verwendet:

B-03: Cyclohexylmethylamin (5 M); **B-06**: Fmoc-Gly-OH (Monomer-Methode); **B-07**: *rac*-3-Amino-1,2-propandiol (3 M); **B-13**: Isobutylamin (5 M); **B-15**: Histamin (1.5 M); **B-18**: *N*-Boc-1,4-diaminobutan (3 M); **B-22**: Glycin-*tert*-butylester (3.0 M in H₂O aus dem Acetat mit 0.9 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); **B-26**: *N*-Boc-1,3-diaminopropan (3 M); **B-27**: *rac*-2-Amino-1-propanol (3 M); **B-29**: 2-Methoxyethylamin (5 M); **B-30**: 2-Aminothiazol (1.5 M); **B-31**: Fmoc-L-Ala-OH (Monomer-Methode); **B-32**: Hydroxylamin (50% in H₂O + 0.05% Tween[®] 20); **B-33**: Fmoc-L-Pro-OH (Monomer-Methode); **B-37**: *rac*-Fmoc-Pip-OH (Monomer-Methode); **B-38**: *rac-s*-Butylamin (5 M); **B-39**: 4-Methoxybenzylamin (5 M); **B-40**: *n*-Butylamin (5 M); **B-43**: 2-Chlorbenzylamin (5 M); **B-44**: 4-Phenoxyanilin (2 M in NMP).

Analytische Daten der Rohprodukte und der durch präparative HPLC gereinigten Substanzen:

104 + 103: 50 mg (66% (bez. auf **104**); M (**104**, TFA-Salz) = 819.91; M (**103**) = 381.43).

HPLC-MS: 104: Reinheit: 22%; RT = 15.0; ber. ($M+H^+$): 706.45; gef.: 706.3 (100), 553.3 (10); **103**: Reinheit: 73%; RT = 8.8; ber. ($M+H^+$): 382.21; gef.: 381.9 (80%), 365.0 (100), 211.9 (10), 171.1 (10), 154.9 (30).

Beide Substanzen wurden mittels präp. HPLC getrennt und gereinigt: **104**: 7.4 mg (Gesamtausbeute 10%; Reinheit: 98%); **103**: 15.0 mg (Gesamtausbeute 43%; Reinheit: 91%).

105: 60 mg (65%; M (TFA-Salz) = 1003.48).

HPLC-MS: Reinheit: 17%; RT = 17.0; ber. ($M+H^+$): 891.35 + 889.35; gef.: 891.2 (50%), 889.2 (100).

Da das Hexapeptoid neben mindestens fünf anderen Substanzen bei RT = 8.9, 10.9, 13.4, 14.2 und 18.4 vorlag, wurde keine weitere Reinigung vorgenommen.

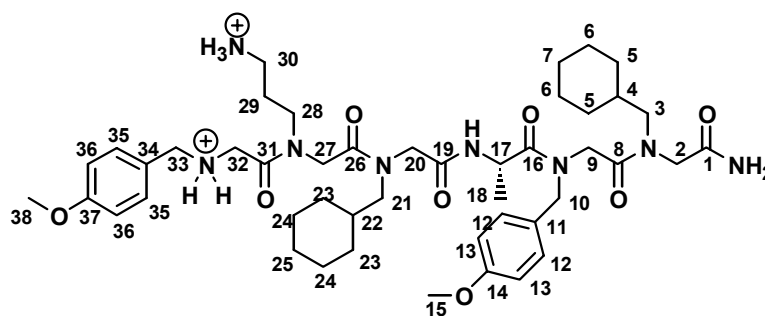
108 + 107: 85 mg (= 98% (bez. auf **108**); M (**108**, TFA-Salz) = 944.39; M (**107**) = 812.35).

HPLC-MS: **108:** Nicht gefunden. Offenbar hatte vollständige Cyclisierung zu **107** stattgefunden; **107:** Reinheit: 77%; RT = 16.8; ber. ($M+H^+$): 814.38 + 812.38; gef.: 814.0 (50%), 812.0 (100), 795.1 (10), 614.1 (20), 501.1 (40), 465.2 (40), 432.1 (10), 312.1 (10), 121.2 (20).

Das Diketopiperazin **107** wurde mittels präp. HPLC gereinigt: **107:** 22 mg (Gesamtausbeute 29%; Reinheit: 89%). Da die Substanz sehr unpolar ist, ließ sie sich auch mit reinem Acetonitril nur schwer vom Trennmedium eluieren. Dies führte somit zu einem Verlußt an Ausbeute.

109: 98 mg (= 98%;
M (doppeltes TFA-Salz) =
1091,14).

HPLC-MS: Reinheit: 93%;
RT = 15.5; ber. ($M+H^+$):
863.54; gef.: 863.4 (100),
686.4 (10).



109 + 2 H⁺

Trotz der hohen Reinheit des

Produktes erfolgte eine Reinigung mittels präp. HPLC: **109:** 54 mg (Gesamtausbeute 54%; Reinheit: 98%).

¹H-NMR* [500 MHz, [D₆]-DMSO] δ = 0.80-1.90 (m, 27H, 4-H, 5-H₂, 6-H₂, 7-H₂, 18-H₃, 22-H, 23-H₂, 24-H₂, 25-H₂, 29-H₂), 2.70-5.00 (m, 23H, 2-H₂, 3-H₂, 9-H₂, 10-H₂, 17-H, 20-H₂, 21-H₂, 27-H₂, 28-H₂, 30-H₂, 32-H₂, 33-H₂), überlagert von 3.68, 3.69, 3.70, 3.71, 3.715, 3.716, 3.72, 3.74, 3.75, 3.76, 3.76, 3.77 (jeweils s, 6H, 15-H₃, 38-H₃), 6.80-7.56 (m, 14H, 12-H, 13-H, 30-NH₃⁺, 35-H, 36-H, 1-CONH₂, 19-CONH), 9,13 (br-s, 2H, NH₂⁺); (vergl. Abb. 35, Seite 180).

Eine Auswertung des **¹³C-NMR-Spektrums*** [126 MHz, [D₆]-DMSO, Standard-Messung (kein APT)] war aufgrund der zahlreichen Isomeren nicht möglich. Die beobachteten Signale waren häufig verbreitert, vermutlich durch die Überlagerung eng nebeneinander liegender Signale. Einige charakteristische Signale traten deutlicher hervor und konnten daher zugeordnet werden: δ = 25.4, 26.0, 30.1 (C-5, C-6, C-7, C-23, C-24, C-25), 55.0, 55.1 (C-15, C-38) 113.0, 128.6, 129.1, 131.7 (C-12, C-13, C-35, C-36).

* Die Auswertung der NMR-Spektren wurde durch das Vorliegen von bis zu 16 Isomeren (theoretischer Wert) erschwert, die auf die *cis/trans*-Isomerie der *N*-Alkylamid-Bindungen an C-8, C-16, C-26 und C-31 zurückzuführen sind.

110: 91 mg (= 96%; M (doppeltes TFA-Salz) = 1027.96).

HPLC-MS: Reinheit: 90%; RT = 9.82; ber. ($M+H^+$): 800.43; gef.: 800.2 (100), 649.3 (10), 538.1 (20), 263.1 (10).

Zur Reinigung wurden 60 mg des Rohproduktes mittels präp. HPLC gereinigt: **110:** 22 mg (Gesamtausbeute 35% extrapoliert auf das gesamte Rohprodukt; Reinheit: 97%).

111: 90 mg (= 92%; M (dreifaches TFA-Salz) = 1059.97).

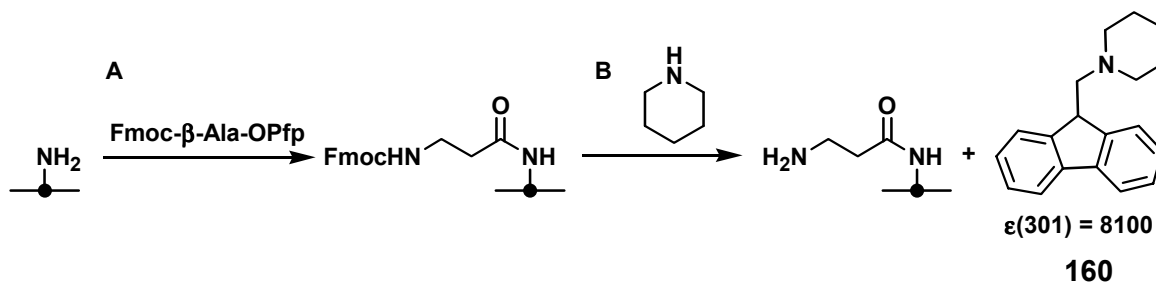
HPLC-MS: Reinheit: 76%; RT = 8.2; ber. ($M+H^+$): 718.46; gef.: 718.3 (100), 550.3 (10), 436.2 (10), 369.2 (10), 283.2 (10).

Des Rohprodukt wurde mittels präp. HPLC gereinigt: **111:** 31 mg (Gesamtausbeute 33%; Reinheit: 98%).

9.3 Synthesen an Zellulosemembranen

9.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 6: Bestimmung des Derivatisierungsgrades von aminoderivatisierten Zellulosemembranen modifiziert nach J. Eichler et al.^[121]



Der Derivatisierungsgrad läßt sich zuverlässig durch Messung der UV-Absorption des Dibenzofulven-Piperidin Adduktes **160** nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe einer membrangebundenen Aminosäure bestimmen.

Methode A: Quantifizierung freier Aminofunktionen

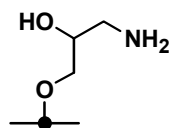
Ein SPOT (0.23 cm²) wird ausgestanzt und in einem 2.0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 50 µl Fmoc-βAla-OPfp (0.6 M in DMF) versetzt. Nach 30 Minuten wird die Lösung entfernt und der SPOT mit DMF gewaschen (5 x 1.0 ml). In einem weiteren 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wird der SPOT mit 1.00 ml Piperidin (20% in DMF) versetzt. Nach 20 Minuten wird die UV-Absorption der unverdünnten Lösung bei λ = 301 nm bestimmt [Vergleichszelle: Stammlösung Piperidin (20% in DMF)]. Aus der Extinktion (E) wird der Derivatisierungsgrad nach der unten dargestellten Formel berechnet ($\epsilon_{301} = 8100^{[121]}$). Bei hohen Derivatisierungsgraden (Extinktion > 1.5) muß die Meßlösung verdünnt werden.

$$\text{Derivatisierungsgrad } [\mu\text{mol}/\text{cm}^2] = \frac{E \cdot V [\text{ml}] \cdot 1000}{8100 \cdot F [\text{cm}^2]} \cdot \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}$$

mit E = Extinktion bei 301 nm; V = Reagenzvolumen, mit dem der SPOT versetzt wurde; F = Fläche des SPOTs (typischerweise 0.23 cm²).

Methode B: Quantifizierung einer membrangebundenen Fmoc-Aminosäure

Ein SPOT (0.23 cm²) wird ausgestanzt und in einem 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1.00 ml Piperidin (20% in DMF) versetzt. Zur Quantifizierung wird wie unter Methode A beschrieben verfahren.

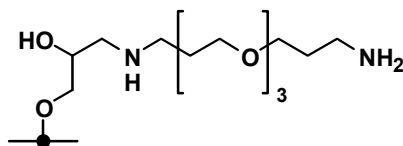
AAV 7: 3-Amino-2-hydroxypropyl-zellulose

9

In einer Instrumentenschale aus Edelstahl versetzt man eine Zellulosemembran (19 x 28 cm) für 5 Minuten mit einer Lösung von Perchlorsäure (1.0 ml einer 60%igen Lösung in H₂O) in Methanol (50 ml), dekantiert die Lösung, wäscht zweimal mit Methanol, dekantiert erneut und läßt die Membran bei geöffneter Schalenabdeckung trocknen.

In eine leere Instrumentenschale gibt man nacheinander Epibromhydrin (**35**; 20.0 ml), eine Lösung von Perchlorsäure (2.0 ml einer 60%igen Lösung in H₂O) in Dioxan (18.0 ml, ergibt 6.0 M Lösung; 8 Mol% Perchlorsäure) und die vorbereitete Membran und verschließt das Gefäß. Nach 24 Stunden bei 25°C gibt man Methanol (100 ml) zu. Nach 30 Minuten dekantiert man, wäscht mit Methanol (50 ml) und inkubiert die Membran 24 Stunden mit einer ges. Lösung von Ammoniak in Methanol (100 ml). Man wäscht nacheinander mit Methanol (50 ml), H₂O (50 ml), 0.5 M NaOH in H₂O (50 ml), H₂O (5 x 50 ml) und Methanol (3 x 50 ml) und läßt die Membran trocknen.

Der Derivatisierungsgrad wird nach AAV 6-A bestimmt. Er beträgt 50 - 500 nmol/cm².

AAV 8: 3-[3-{2-[2-(3-Aminopropoxy)-ethoxy]-ethoxy}-propylamino]-2-hydroxypropyl-zellulose

38

A.) Hochbeladungsprotokoll (600 - 1400 nmol/cm²)

In einer Instrumentenschale aus Edelstahl versetzt man eine Zellulosemembran (19 x 28 cm) für 5 Minuten mit einer Lösung von Perchlorsäure (1.0 ml einer 60%igen Lösung in H₂O) in Methanol (50 ml), dekantiert die Lösung, wäscht zweimal mit Methanol, dekantiert erneut und läßt die Membran bei geöffneter Schalenabdeckung trocknen.

In eine leere Instrumentenschale gibt man nacheinander Epibromhydrin (**35**; 4.0 ml), eine Lösung von Perchlorsäure (0.40 ml einer 60%igen Lösung in H₂O) in Dioxan (35.6 ml, ergibt 1.2 M Lösung; 8 Mol% Perchlorsäure) und die vorbereitete Membran und verschließt das Gefäß. Nach 3 Stunden bei 25°C gibt man Methanol (100 ml) zu. Nach 30 Minuten dekantiert man und wäscht mit Methanol (2 x 50 ml). Die an der Luft getrocknete Membran gibt man in eine Instrumentenschale, die auf 80°C erwärmtes 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**; 40 ml) enthält. Nach 1 Stunde bei dieser Temperatur dekantiert man und inkubiert anschließend bei 25°C nacheinander mit MeOH (2 x 50 ml, 5 min), NaOMe (5 M

in MeOH, 2 h), MeOH (50 ml, 5 min) H₂O (4 x 100 ml, 5 min), MeOH (3 x 50 ml, 5 min) und läßt die Membran trocknen.

Der Derivatisierungsgrad wird nach AAV 6-A bestimmt. Er beträgt 600 - 1400 nmol/cm².

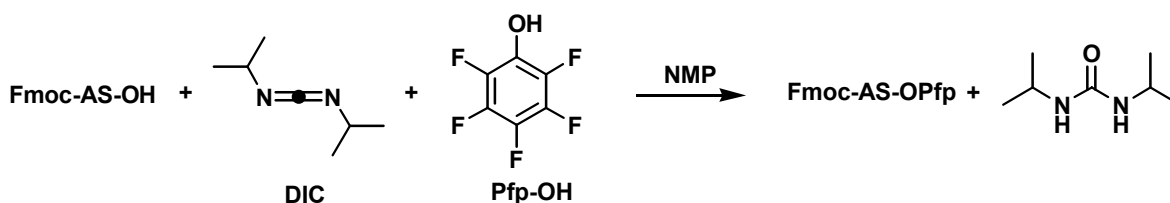
B.) Niedrigbeladungsprotokoll (100 - 400 nmol/cm²)

Die Präparation erfolgt wie bei A.) mit den folgenden Unterschieden:

1. Man läßt die Epibromhydrin-Lösung 1 Stunde einwirken.
2. Man wendet das Diamin **37** als Lösung in DMF (20%) bei 25°C an.

Die Derivatisierung beträgt 100 - 400 nmol/cm².

AAV 9: Fmoc-Aminosäurepentafluorphenylester durch in situ Aktivierung von Fmoc-Aminosäuren

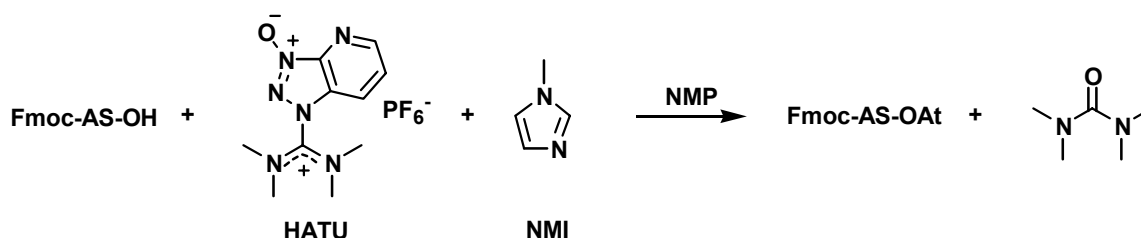


AS = Aminosäure

Beschreibung am Beispiel der Aktivierung des Rink-Linkers **47** (0.2 M in NMP):

N-Fmoc-4-[Amino-(2,4-dimethoxyphenyl)-methyl]-phenoxyessigsäure („Fmoc-Rink-Linker-OH“, 0.1 mmol) wird mit 0.50 ml einer 0.2 M Lösung von Pentafluorphenol in NMP (0.50 ml) versetzt. Man gibt DIC zu (0.1 mmol) und läßt 30 Minuten reagieren. Die erhaltene 0.2 M Lösung kann nach Abtrennen von ggf. gebildetem Niederschlag mittels Zentrifugation zur SPOT-Synthese eingesetzt werden.

AAV 10: Fmoc-Aminosäure-7-azabenzotriazol-1-ylester durch in situ Aktivierung von Fmoc-Aminosäuren



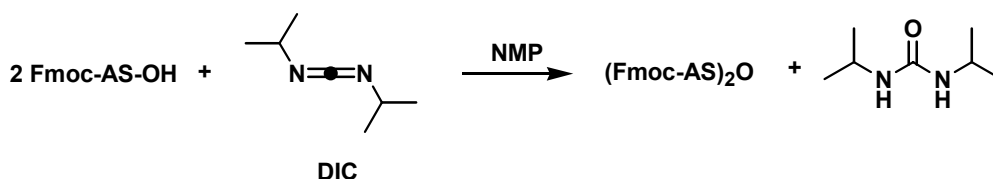
AS = Aminosäure

Beschreibung am Beispiel der Aktivierung des Photo-Linkers **48** (0.5 M in NMP):

N-Fmoc-4-[4'-(1''-Aminoethyl)-2'-methoxy-5'-nitrophenoxy]-buttersäure („Fmoc-Photo-Linker-OH“, 0.25 mmol) und HATU (0.25 mmol) werden in 0.50 ml NMP gelöst und mit NMI (0.25 mmol) versetzt. Die Suspension wird im Wasserbad mit Ultraschall behandelt

(5 min) bis eine homogene Lösung entstanden ist. Sie kann danach zur SPOT-Synthese eingesetzt werden.

AAV 11: Fmoc-Aminosäureanhydride durch in situ Aktivierung von Fmoc-Aminosäuren



AS = Aminosäure

Beschreibung am Beispiel der Aktivierung von Fmoc-*N*-Methylglycin (Fmoc-Sarcosin, 0.5 M in NMP):

Fmoc-Sarcosin (0.3 mmol) wird in 0.50 ml NMP gelöst und mit DIC (0.15 mmol) versetzt. Nach 30 Minuten wird ggf. gebildeter Niederschlag mittels Zentrifugation abgetrennt. Die erhaltene 0.3 M Lösung sollte innerhalb von 2 Stunden zur SPOT-Synthese eingesetzt werden.

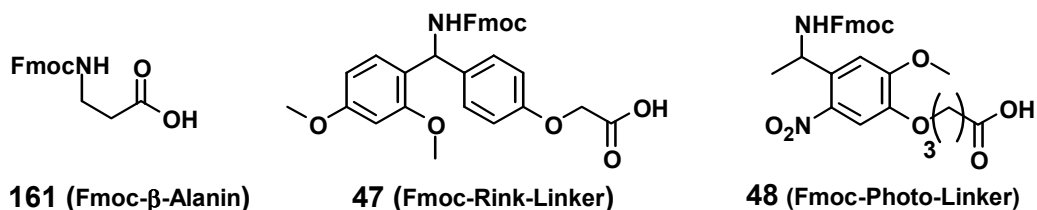
AAV 12: Manuelle SPOT-Synthese von Peptoiden

Die SPOT-Synthese von Peptoiden folgt den Grundzügen der Peptoidsynthese nach G.M. Figliozzi *et al.*^[104] (vergl. AAV 4 und AAV 5) nach einem für die SPOT-Synthese modifizierten Protokoll (zu den Methoden der SPOT-Synthese vergl. Lit.^[39,57-60]). Die Synthese ist in sequenziell zu bearbeitende Schritte gegliedert. Die Membran wird stets in einer Edelstahl-Instrumentenschale behandelt. Die Waschschrte werden unter Bewegung des Lösungsmittels auf einem Wipptisch durchgeführt. Beim Abgießen des Lösungsmittels wird die Membran mit einer Pinzette vorsichtig angehoben, um unter der Membran befindliches Lösungsmittel ablaufen zu lassen (Ausnahme: Waschschrte mit wäßrigen Lösungen). Die Synthese kann zwischen den Schritten – vorzugsweise nach der Einführung des Aminbausteines – unterbrochen werden. Dazu wird die getrocknete Membran in Kunststoffolie eingeschweißt und bei -26°C gelagert. Die verwendeten Amine können in Stammlösungen (3 ml Gefäße) bei 4°C mindestens 12 Monate unzersetzt gelagert werden.

Bei Synthesen am Photo-Linker müssen besondere Vorkehrungen getroffen werden, um eine vorzeitige Abspaltung zu verhindern: Bei allen Operationen, bei denen die Membran der Einwirkung von Licht ausgesetzt ist, wird Tageslicht durch Raumabdunklung ausgeschlossen. Desgleichen wird die Raumbeleuchtung im Umkreis von ca. 4 m ausgeschaltet, so daß die Membran nur indirekt beleuchtet wird.

A.) Einführung eines Linkers und Definition der SPOTs.

Zur Peptoid-Synthese werden drei verschiedene Linker verwendet:



Zunächst wird eine Lösung des gewünschte Linkers in aktivierter Form bereitgestellt:

161: 0.3 M Lösung von Fmoc-β-Ala-OPfp in NMP;

47: 0.2 M in NMP nach AAV 9;

48: 0.5 M in NMP nach AAV 10.

Die aktivierte Linker-Lösung wird an einer esterfrei aminoderivatisierten Zellulosemembran **38** (AAV 8, Hoch- bzw. Niedrigbeladungsprotokoll in Abhängigkeit vom gewünschten Derivatisierungsgrad) durch Pipettieren aufgetragen (Doppelkopplung, 2 x 15 min; eine Markierung der Positionen kann mit einem Bleistift erfolgen). Dabei wird hier und in allen folgenden Schritten stets das gleiche Volumen (2.0 µl) angewendet. In einem erweiterten Waschschritt werden freie Aminogruppen durch Acetylierung blockiert (DMF, 2 x 2 min; DMF/Ac₂O/DIEA [70:10:20 (v/v), 2 x 15 min], die Membran gewaschen (DMF, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und anschließend an der Luft getrocknet. Anhand von drei SPOTs, die nur zu diesem Zweck vorgesehen wurden, wird der Derivatisierungsgrad nach AAV 6-B bestimmt. Die Membran wird den Bedingungen einer Fmoc-Abspaltung unterzogen (Piperidin (20% in DMF), 2 x 10 min), gewaschen (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet.

B.) Peptidsynthese 1:

Sub-Monomersschritt 1: Bromacetylierung

Alle SPOTs werden durch Pipettieren einer Lösung von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**, 1 M in NMP, Doppelkopplung, 2 x 15 min) bromacetyliert. Die Membran wird gewaschen (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet.

C.) Peptidsynthese 2:

Sub-Monomersschritt 2: Bromsubstitution

In Abhängigkeit von der gewünschten Peptoid-Sequenz werden verschiedene Amin-Lösungen auf die SPOTs pipettiert (Konzentrationen je nach Amin: Feststoffe: 5 M in NMP oder H₂O bzw., falls diese Konzentration nicht erreicht werden kann, verdünnen einer gesättigten Lösung mit etwas Lösungsmittel (10%), um eine Kristallisation bei der Anwendung zu verhindern – die Konzentration sollte jedoch nicht geringer als 0.8 M sein; wässrigen Lösungen wird 0.05% Tween[®] 20 zugesetzt; Flüssigkeiten: 50 Vol-% in NMP;

jeweils Dreifachkopplung, 3 x 15 min). Die Membran wird gewaschen (DMF, 4 x 2 min; MeOH, 1 x 2 min; 0.5 M wäßrige NaOH, 1 x 1 min; H₂O, 5 x 2 min; bei pH > 8, weitere Waschschritte mit H₂O; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet.

D.) Wiederholung der Schritte B.) und C.) bis die endgültige Oligomerenlänge erreicht ist.

E.) Seitenkettenschutzgruppen-Abspaltung und Abspaltung von der Zellulose in Abhängigkeit vom verwendeten Linker.

161 und **48**: Zur Seitenkettenschutzgruppen-Abspaltung wird die Membran mit TFA behandelt [TFA/H₂O/TIPS [95/3/2 (v/v)] unter Phenol-Zusatz (1 g/100ml), 2 x 15 min; TFA/CH₂Cl₂/H₂O/TIPS [50/45/3/2 (v/v)] unter Phenol-Zusatz (1 g/100ml), 1 x 2 h]. Die verwendete Instrumentenschale wird dabei nicht geschüttelt. Im Anschluß wird die Membran gewaschen (CH₂Cl₂, 2 x 5 min; DMF, 1 x 2 min; Et₃N (2 Vol-% in DMF), 1 x 2 min; DMF, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet. Membranen mit dem Linker **161** sind nun bereit für Festphasen-Bindungsstudien. Vom Photo-Linker **48** werden die Substanzen durch Belichtung der trockenen Membran mit UV-Licht (Vilber Lourmat TFX 20 LC, Einstellung 365 nm, 100%, 60 min je Seite) abgespalten. Die SPOTs werden ausgestanzt und können in einem geeigneten Lösungsmittel abgelöst zu Assays in Lösung eingesetzt oder analysiert (HPLC, HPLC-MS) werden. Die Abspaltung ist nur bei Derivatisierungsgraden < 150 nmol/cm² vollständig. Bei höheren Derivatisierungsgraden verhindert die UV-Absorption des Photolyseproduktes die vollständige Spaltung.

47: Die SPOTs werden ausgestanzt, in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit TFA (95% in H₂O, 70 µl) versetzt. Nach 20 Minuten wird das Lösungsmittel bei 45°C in einer Vakuumzentrifuge entfernt. Die hellroten SPOTs werden direkt im Anschluß mit Acetonitril (30 Vol-% in H₂O, 50 µl) versetzt und analysiert (HPLC, HPLC-MS). Bei Vorhandensein einer Trityl-Schutzgruppe wird der TFA-Lösung TIPS (5 Vol-%) zugesetzt.

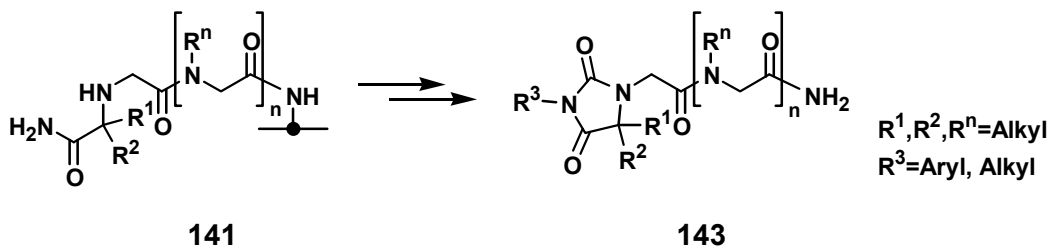
Bemerkung zur Qualitätskontrolle: Es hat sich bewährt, auf jeder Membran das Modell-Tripeptoid **16** am Rink-Linker zu synthetisieren. Die Qualität der Synthese läßt sich nach Analyse des abgespaltenen Tripeptoids mittels HPLC und quantitativer Auswertung der UV-Absorption bestimmen (vergl. Abb. 15, Seite 37).

Bemerkung zur Peptoid-Synthese nach der Monomer-Methode: Die Peptoid-Synthese nach der Monomer-Methode ist neben der Sub-Monomer-Synthese auf derselben Membran möglich (vergl. Schema 15, Seite 59). Dazu wird anstelle von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester eine aktivierte Lösung eines Fmoc-*N*-Alkylglycins pipettiert^[110] (Aktivierung nach AAV 11. Ein Niederschlag von Harnstoff wird ggf. durch Zentrifugation an den Gefäßboden fixiert). Anstelle eines Amins wird im nächsten Sub-Monomerschnitt DBU (4 Vol-% in NMP) angewendet.

AAV 13: Halbautomatische SPOT-Synthese von Peptoiden

Die halbautomatische SPOT-Synthese von Peptoiden verläuft analog der manuellen Synthese (AAV 12). Unterschiede werden im folgenden aufgelistet:

- Die Pipettierschritte werden unter Verwendung eines Pipettierroboters (Autospot Robot AMS 222) durchgeführt. Die Steuerdateien, in denen Ort und Sequenzen der SPOTs festgelegt ist, wurden mit dem Programm LISA erzeugt, welches speziell an die Synthese nach der Submonomer-Methode angepasst wurde. In einer Synthese können gleichzeitig 40 Sub-Monomer *und* 40 Monomer-Bausteine verwendet werden.
- Um die Repositionierung der Membran nach den Waschschritten zu ermöglichen werden freie Aminogruppen nach Schritt A) (SPOT-Definition) durch zusätzliches Waschen mit einer 0.01%igen Lösung von Bromphenolblau in MeOH angefärbt und ausgewählte SPOTs (z.B. Ecken der Membran) mit Bleistift markiert.
- Es ist dafür zu sorgen, daß in Schritt A) (SPOT-Definition) ein um 20% geringeres Pipettiervolumen als in den übrigen Schritten gewählt wird, um Fehlsequenzen am Rand des SPOTs vermeiden.
- Zur parallelen Synthese von „kleinen“ SPOTs für Festphasen-Bindungsstudien und „großen“ SPOTs für analytische Zwecke auf einer Membran unter Verwendung von *einer* Synthese-Steuerdatei hat es sich bewährt, an der Stelle der „großen“ SPOTs mehrere identische Sequenzen zu definieren. Das führt zur Mehrfachpipettierung kleiner Volumina an derselben Stelle und damit zu größeren SPOTs.
- Zur Dokumentation der Synthese hat sich die Aufnahme von Lichtbildern mit einer Digitalkamera nach den Schritten A) und C) bewährt.
- Niederschläge aus Diisopropylharnstoff, die bei der Aktivierung von Aminosäuren (Linker, Monomere) auftreten, werden zusätzlich zur Zentrifugation durch Filtration (Spritzenfilter aus PTFE, 0.45 µm) abgetrennt, um einen Verschluß der Nadeln zu vermeiden.
- Die Vorratsgefäße für Aminlösungen werden erst direkt vor der Synthese geöffnet, um eine Verflüchtigung von Lösungsmittel und Reagenzien zu vermindern.
- Alle Reagenzien müssen vor jedem Synthesecyclus frisch bereitgestellt werden, da die Gefäße während der Synthese geöffnet sind und flüchtige Bestandteile langsam verdampfen. Es hat sich bewährt, die Reagenzien für jeden Schritt vor Beginn der gesamten Synthese in entsprechende Gefäße abzufüllen und bei 4°C zu lagern. Vor den einzelnen Cyclen wird der benötigte Satz an Reagenzien entnommen. Monomere werden unter Beachtung der Voraktivierungszeit erst kurz vor der Synthese aktiviert.

AAV 14: Manuelle SPOT-Synthese von Hydantoinen vom Typ 143

Die SPOT-Synthese von Hydantoinen vom Typ **143** unter sauerkatalysierter Cyclisierung basiert der Modifizierung eines membrangebundenen Peptoids **141**, das *N*-terminal einen Baustein mit einer Seitenkette trägt, wie sie sich durch ein α -Aminosäureamid einführen läßt. Die Synthese dieses Bausteins erfolgt gemäß AAV 12, wobei alle dort erwähnten Linkersysteme möglich sind.

A.) Einführung des Isocyanats (R^1 -NCO)

Zur Vorbereitung der Acylierung mit einem Alky- oder Arylisocyanat wird die Membran mit Benzylimidazol behandelt (3 M in DMF, einfache Pipettierung). Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird das Isocyanat gekoppelt (1 M in NMP, Doppelkopplung, 2 x 15 min). Die Membran wird gewaschen (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet.

B.) Fortsetzung der Synthese

Bei Verwendung bifunktioneller Isocyanate wie **119** oder **120** kann die Oligomeren-Synthese in Abhängigkeit von der Art des Isocyanats fortgesetzt werden.

C.) Cyclisierung zusammen mit der Seitenkettenschutzgruppen-Abspaltung in Abhängigkeit vom verwendeten Linker

161 und **48**: Zur Cyclisierung und Seitenkettenschutzgruppen-Abspaltung wird die Membran bei 60°C mit TFA behandelt (95% in H₂O, 1 x 20 min). Dazu wird die Membran mit der Lösung in einer Instrumentenschale auf einer elektrischen Heizmatte erwärmt. Man läßt die Lösung abkühlen, wäscht die Membran [CH₂Cl₂, 2 x 5 min; DMF, 1 x 2 min; Et₃N (2 Vol-% in DMF), 1 x 2 min; DMF, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min] und läßt an der Luft trocknen. Membranen mit dem Linker **161** sind nun bereit für Festphasen-Bindungsstudien. Vom Photo-Linker **48** werden die Substanzen durch Belichtung der trockenen Membran mit UV-Licht (Vilber Lourmat TFX 20 LC, Einstellung 365 nm, 100%, 60 min je Seite) abgespalten. Die SPOTs werden ausgestanzt und können in einem geeigneten Lösungsmittel abgelöst zu Assays in Lösung eingesetzt oder analysiert (HPLC, HPLC-MS) werden. Die Abspaltung ist nur bei Derivatisierungsgraden < 150 nmol/cm² vollständig. Bei höheren Derivatisierungsgraden verhindert die UV-Absorption des Photolyseproduktes die vollständige Spaltung.

47: Die SPOTs werden ausgestanzt, in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit TFA (95% in H₂O, 70 µl) versetzt. Nach 20 Minuten bei 60°C wird das Lösungsmittel bei 45°C in einer Vakuumzentrifuge entfernt. Die hellroten SPOTs werden direkt im Anschluß mit Acetonitril (30 Vol-% in H₂O, 50 µl) versetzt und analysiert (HPLC, HPLC-MS).

Bemerkung:

Anstelle von α -Aminosäureamiden können auch α -Aminosäure-*tert*-butylester in der vorangegangenen Peptidsynthese eingesetzt werden (vergl. Tab. 23, Seite 109).

9.3.2 Spezielle Synthesen

9.3.2.1 Optimierung der Membranderivatisierung (Abschnitt 3.1)

Gravimetrische Beobachtung der Aminoderivatisierung einer Membran 9 (vergl. Seite 24):

Nach AAV 7 wurde eine Zellulosemembran (5 x 15 cm) derivatisiert (0.13-facher Ansatz). Vor und nach der Alkylierung mit Epibromhydrin sowie nach der Behandlung mit Ammoniak wurde die Membran bei 0.1 mbar für 1 Stunde getrocknet und direkt im Anschluß gewogen. Es wurden folgende Auswaagen und Massendifferenzen bestimmt:

	Auswaage [mg]	Differenz zur underivatisierten Membran [mg]	berechnete Derivatisierung* [µmol/cm ²]
Vor der Alkylierung	707.0	≡ 0	≡ 0
Nach der Alkylierung	722.3	15.3	1.49
Nach der Behandlung mit Ammoniak	716.5	9.5	1.39

*: Unter der Annahme eines Reaktionsverlaufes wie in Schema 8-A, Seite 24.
[$\Delta M(36/Zellulose)=137.0$ g/mol; $\Delta M(9/Zellulose)=91.1$ g/mol].

Der nach AAV 6-A bestimmte Derivatisierungsgrad betrug 122 nmol/cm².

Zu Abb. 10, Seite 26:

Um den Einfluß der Epoxidkonzentration und der Reaktionszeit auf den Derivatisierungsgrad bei der Generierung von aminofunktionalisierten Membranen **38** zu bestimmen, wurden sechs Zellulosemembranen (7 x 10 cm) nach AAV 8 (Hochbeladungsprotokoll, jeweils 0.12-facher Ansatz) abweichend unter Anwendung der folgenden Bedingungen derivatisiert:

Membranen 1-3: 1.2 M Epibromhydrin, Alkylierungszeiten: 1 h (Membran 1), 3 h (Membran 2) und 20 h (Membran 3).

Membranen 4-6: 6.0 M Epibromhydrin, Alkylierungszeiten: 1 h (Membran 4), 3 h (Membran 5) und 20 h (Membran 6).

In allen Fällen wurde die Alkylierung wie in AAV 8 unter Katalyse von 8 Mol% Perchlorsäure bezogen auf die Epoxidkonzentration durchgeführt. Im Anschluß an die Alkylierung wurden die Membranen mit einer Lösung von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**, 2.3 M in DMF, 17 h, 25°C) behandelt. Es wurden folgende Derivatisierungsgrade bestimmt (graphische Auftragung vergl. Abb. 10, Seite 26):

Membran Nr.	1	2	3	4	5	6
Derivatisierungsgrad [$\mu\text{mol}/\text{cm}^2$]	0.63	1.10	2.12	1.77	2.09	2.17

Zu Abb. 11, Seite 27:

Um den Einfluß der Diaminkonzentration und der Reaktionszeit auf den Derivatisierungsgrad bei der Generierung von aminofunktionalisierten Membranen **38** zu bestimmen, wurden neun Zellulosemembranen (1 x 1 cm) nach AAV 8 (Hochbeladungsprotokoll, jeweils 0.002-facher Ansatz) abweichend unter Anwendung der folgenden Bedingungen derivatisiert:

Membranen 1-3: 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**): 0.45 M in DMF, 25°C, für 1 h (Membran 1), 3 h (Membran 2) und 18 h (Membran 3).

Membranen 4-6: 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**): 0.90 M in DMF, 25°C, für 1 h (Membran 4), 3 h (Membran 5) und 18 h (Membran 6).

Membranen 7-9: 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**): 2.3 M in DMF, 25°C, für 1 h (Membran 7), 3 h (Membran 8) und 18 h (Membran 9).

Es wurden folgende Derivatisierungsgrade bestimmt (graphische Auftragung vergl. Abb. 11, Seite 27):

Membran Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Derivatisierungsgrad [$\mu\text{mol}/\text{cm}^2$]	0.17	0.32	0.97	0.22	0.39	1.20	0.27	0.52	1.36

Zu Tab. 5, Seite 27:

Um den Einfluß der Temperatur und der Reaktionszeit auf den Derivatisierungsgrad bei der Generierung von aminofunktionalisierten Membranen **38** zu bestimmen, wurden sechs Zellulosemembranen (1 x 1 cm) nach AAV 8 (Hochbeladungsprotokoll, jeweils 0.002-facher Ansatz) abweichend unter Anwendung der folgenden Bedingungen derivatisiert:

In allen Fällen erfolgte die Alkylierung mit 2.4 M Epibromhydrin (1 h).

Membranen 1-3: 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**): 0.90 M in DMF, 80°C, für 1 h (Membran 1), 3 h (Membran 2) und 5 h (Membran 3).

Membranen 4-6: 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**): 0.90 M in DMF, Mikrowellenbestrahlung: 810 W Mikrowellenleistung, für 2 Minuten (Membran 4) und 4 Minuten (Membran 5).

Membran 6 (Vergleichswert): 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**): 0.90 M in DMF, 25°C, 44 h.

Es wurden die in Tab. 5, Seite 27 tabellierten Derivatisierungsgrade bestimmt .

Zu Abb. 12, Seite 28:

Um den Einfluß der Diaminkonzentration und der Reaktionszeit auf den Derivatisierungsgrad bei erhöhter Temperatur zu bestimmen, wurden sieben Zellulosemembranen (1 x 1 cm) nach AAV 8 (Hochbeladungsprotokoll, jeweils 0.002-facher Ansatz) abweichend unter Anwendung der folgenden Bedingungen derivatisiert:

In allen Fällen erfolgte die Alkylierung mit 2.4 M Epibromhydrin (3 h).

Membranen 1-3: 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**): 80°C, 0.90 M in DMF (Membran 1), 2.3 M in DMF (Membran 2) und 4.6 M (pur) (Membran 3), je 1 h.

Membranen 4-6: 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**): Mikrowellenbestrahlung: 810 W Mikrowellenleistung, 0.90 M in DMF (Membran 4), 2.3 M in DMF (Membran 5) und 4.6 M (pur) (Membran 6), je 3 min.

Membran 7 (Vergleichswert): 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (**37**): 2.3 M in DMF, 25°C, 44 h.

Es wurden folgende Derivatisierungsgrade bestimmt (graphische Auftragung vergl. Abb. 12, Seite 28):

Membran Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Derivatisierungsgrad [$\mu\text{mol}/\text{cm}^2$]	0.56	0.86	1.14	0.80	0.93	1.01	2.31

9.3.2.2 Optimierung der Kopplung des Rink-Linkers (Abschnitt 3.2.2)

Zu Abb. 14, Seite 32:

Um eine effiziente Aktivierungsmethode zur Kopplung des Rink-Linkers **47** an Zellulose zu untersuchen, wurden fünf verschiedene Acylierungslösungen auf 15 SPOTs einer nach AAV 8 (Niedrigbeladungsprotokoll) aminoderivatisierten Zellulosemembran **38** angewendet (jeweils Dreifachbestimmungen):

1) **47** (0.5 M), TBTU (0.5 M), DIEA (1 M); **2)** **47**, TBTU, DIEA (jeweils 0.5 M); **3)** **47**, DIC (jeweils 0.5 M); **4)** **47**, DIC, Pentafluorphenol (jeweils 0.5 M nach AAV 9); **5)** Kontrolle: Fmoc-Ala-OPfp (0.6 M).

Alle Substanzen wurden nach einer Voraktivierungszeit von 30 Minuten in NMP verwendet (3 x 15 min; je 2 μ l). Nach Waschen (DMF; 3 x 2 min) und Acetylieren (Ac_2O /DIEA/DMF 1/2/7; 30 min; DMF; 4 x 2 min; MeOH; 3 x 2 min) der Membran wurden die SPOTs ausgestanzt und die Derivatisierung nach AAV 6 - **B** bestimmt. Die gemessenen Werte wurden gemittelt und sind in Abb. 14, Seite 32 dargestellt.

9.3.2.3 Spaltung des Photo-Linkers **48** unter Verwendung hoher Lichtenergien (Abschnitt 3.2.2)

Das Tripeptoid **16** wurden an jeweils sechs SPOTs nach AAV 12 an zwei amino-derivatisierten Zellulosemembranen **38** mit unterschiedlichem Derivatisierungsgrad synthetisiert, nachdem diese mit dem Photo-Linker **48** versehen wurden (193 und 2086 nmol/cm²). Die Membranen wurden in lösungsmittelfreiem Zustand für unterschiedliche Zeiten mit dem Licht von zwei verschiedenen UV-Lichtquellen belichtet

Tab. 25: Abspaltungsausbeuten und Produktreinheiten bei der lösungsmittelfreien, trockenen Photolyse zweier Zellulosemembranen **38**, die das Tripeptoid **16** am Photo-Linker trugen.

Nr.	DG ¹⁾	Belichtungszeit (beidseitig)	UV- Lampe ²⁾	Ausbeute ³⁾ [%]	Reinheit ⁴⁾ [%]
1	193	2 x 60 min	A	56	82
2	193	2 x 1 min	B	57	91
3	193	2 x 2 min	B	57	91
4	193	2 x 3 min	B	62	94
5	193	2 x 5 min	B	58	93
6	193	2 x 10 min	B	49	91
7	2086	2 x 60 min	A	21	86
8	2086	2 x 1 min	B	17	94
9	2086	2 x 2 min	B	22	92
10	2086	2 x 3 min	B	23	91
11	2086	2 x 5 min	B	26	90
12	2086	2 x 10 min	B	30	86

¹⁾ DG = Derivatisierungsgrad [nmol/cm²] nach Quantifizierung der Fmoc-Gruppe des Photo-Linkers nach AAV 6-B; ²⁾ **A**: UV-Lampe Vilber Lourmat; **B**: UV-Lampe Beltron; ³⁾: Basierend auf einem Vergleich der erhaltenen Menge **16** (bestimmt durch quantitative Auswertung der UV-Absorption) mit dem Derivatisierungsgrad (DG); ⁴⁾ HPLC, 220 nm.

(Vilber Lourmat [7 mW/cm²] und Beltron [340 mW/cm²]). Anschließend wurde die Ausbeute und Reinheit des abgespaltenen Produktes mittels HPLC bestimmt (Tab. 25). Die Identität wurde durch MS sichergestellt und entsprach der am Harz synthetisierten Substanz.

9.3.2.4 Synthesen von Tripeptoiden (Abschnitt 3.3)

Im folgenden werden die experimentellen Daten der in Abschnitt 3.3 erläuterten Peptoid-synthesen beschrieben.

Optimierung des Acylierungsmittels

Tab. 6, Seite 41:

Das Tripeptoid **16** wurde mit den Aminen *n*-Butylamin, Benzylamin und Piperidin (jeweils 5 M in NMP) nach AAV 12 am Rink-Linker synthetisiert. Abweichend von der allgemeinen Arbeitsvorschrift wurden die Bromsubstitutionsschritte nicht durch Pipettieren der Reagenzien, sondern durch Inkubieren (Tränken) der gesamten Membran mit den jeweiligen Aminlösungen durchgeführt (1 x 30 min). Im zweiten Acylierungsschritt wurden die Acylierungsbedingungen gemäß Tab. 6 variiert. HPLC-MS-analytisch wurden jeweils 20% des Rohproduktes eines SPOTs (0.23 cm²) untersucht (Injektionsmenge: 10 µl). Folgende Produkte wurden beobachtet, identifiziert und quantitativ (UV-Absorption) ausgewertet:

16: Beobachtete Daten sind konsistent mit dem Syntheseprodukt der Synthese am Polystyrol-Harz (vergl. Abschnitt 9.2.2, Seite 130).

60: RT = 9.8; ber. ($M+H^+$): 278.19; gef.: 278.1 (100), 233.1 (80), 143.2 (30), 91.1 (20); (vergl. Abb. 17, Seite 42).

61: RT = 4.7; ber. ($M+H^+$): 256.20; gef.: 256.1 (30%), 197.2 (10), 98.1 (100); (vergl. Abb. 17, Seite 42).

Tab. 7, Seite 47:

Das Tripeptoid **17** wurde mit den Aminen *n*-Butylamin, Ethanolamin und Piperidin (jeweils 5 M in NMP) nach AAV 12 am Rink-Linker synthetisiert. Abweichend von der allgemeinen Arbeitsvorschrift wurden die Bromsubstitutionsschritte nicht durch Pipettieren der Reagenzien, sondern durch Inkubieren (Tränken) der gesamten Membran mit den jeweiligen Aminlösungen durchgeführt (1 x 30 min). Im zweiten Acylierungsschritt wurden die Acylierungsbedingungen gemäß Tab. 7 variiert. HPLC-MS-analytisch wurden jeweils 20% des Rohproduktes eines SPOTs (0.23 cm²) untersucht (Injektionsmenge: 10 µl). Die Reaktionsprodukte **17** und **18** wurden beobachtet, identifiziert und quantitativ (UV-Absorption) ausgewertet (Die Daten waren konsistent mit den Produkten der Synthese am Harz: vergl. Abschnitt 9.2.2.2, Seite 130 (**17**) und Abschnitt 9.2.2.3, Seite 131 (**18**)).

Optimierung des Lösungsmittels

Tab. 9, Seite 52:

Das Tripeptoid **16** wurde mit den Aminen *n*-Butylamin, Benzylamin und Piperidin (jeweils 5 M) nach AAV 12 am Rink-Linker synthetisiert. Abweichend von der allgemeinen Arbeitsvorschrift wurden alle Bromsubstitutionsschritte in den in Tab. 9 angegebenen Lösungsmitteln mit und ohne Zusatz von Iodid (0.05 M) durchgeführt. HPLC-MS-analytisch wurden jeweils 20% des Rohproduktes eines SPOTs (0.23 cm²) untersucht (Injektionsmenge: 10 µl). Die analytischen Daten waren konsistent mit dem Produkt der Synthese am Polystyrolharz: vergl. Abschnitt 9.2.2, Seite 130.

Optimierung der Amin-Konzentration

Abb. 20, Seite 53:

Das Tripeptoid **16** wurde mit den Aminen *n*-Butylamin, Benzylamin und Piperidin (in NMP) nach AAV 12 am Rink-Linker synthetisiert. Abweichend von der allgemeinen Arbeitsvorschrift wurden alle Bromsubstitutionsschritte mit den in Abb. 20 angegebenen Amin-Konzentrationen durchgeführt. HPLC-MS-analytisch wurden jeweils 20% des Rohproduktes eines SPOTs (0.23 cm²) untersucht (Injektionsmenge: 10 µl). Die analytischen Daten waren konsistent mit dem Syntheseprodukt der Synthese am Polystyrolharz: vergl. Abschnitt 9.2.2.

Untersuchung der Anwendbarkeit verschiedener Amine

Die Tripeptide **19** wurden mit den Aminen *n*-Butylamin (*C*-terminal) und Piperidin (*N*-terminal; jeweils 5 M in NMP) nach AAV 12 an Rink- oder Photo-Linker synthetisiert. In der mittleren Position wurden die in den jeweiligen Tabellen angegebenen Amine eingesetzt. HPLC-MS-analytisch wurden jeweils 20% des Rohproduktes eines SPOTs (0.23 cm²) untersucht (Injektionsmenge: 10 µl). Im folgenden sind die analytischen Daten der Tripeptide **19** sowie ggf. beobachteter Nebenprodukte aufgeführt (Die Nummern entsprechen den jeweiligen Tabelleneinträgen):

Tab. 10, Seite 58 (Aminflüchtigkeit):

Nr. 1: Amin: Ammoniak (+ 0.05% Tween[®] 20); RT = 6.6; ber. ($M+H^+$): 313.23; gef.: 313.3 (40%), 98.1 (40); verunreinigt mit einer unidentifizierten Substanz: 329.2 (100), 341.3 (30), 357.2 (30).

Nr. 2: Amin: Methylamin (+ 0.05% Tween[®] 20); RT = 6.7; ber. ($M+H^+$): 327.24; gef.: 327.2 (100), 197.0 (5%), 98.1 (20).

Nr. 3: Amin: Ethylamin (+ 0.05% Tween[®] 20); RT = 7.7; ber. ($M+H^+$): 341.26; gef.: 341.2 (100), 211.1 (10), 98.2 (30).

Nr. 4: Amin: Allylamin; RT = 8.4; ber. ($M+H^+$): 353.26; gef.: 375.2 (30, $M+Na^+$), 353.1 (50, $M+H^+$), 268.1 (10), 223.0 (10), 98.2 (100).

Nr. 5: Amin: Butylamin; RT = 10.0; ber. ($M+H^+$): 369.29; gef.: 369.2 (100), 239.1 (10), 98.2 (20).

Tab. 11, Seite 60 (sterische Faktoren):

Nr. 1: Amin: 3,3-Diphenylpropylamin; RT = 14.8; ber. ($M+H^+$): 507.34; gef.: 507.3 (100), 377.4 (10), 98.2 (10).

Nr. 2a: Amin: Benzylamin (entspricht Tripeptoid **16**. Daten konsistent mit dem Syntheseprodukt der Synthese am Polystyrolharz: vergl. Abschnitt 9.2.2, Seite 130).

Nr. 2b: Amin: 1-Naphthylmethylamin; RT = 12.9; ber. ($M+H^+$): 453.29; gef.: 453.2 (100), 323.1 (10), 141.2 (10), 98.2 (10).

Nr. 3: Amin: (+)-Dehydroabietylamin; RT = 19.5; ber. ($M+H^+$): 581.45; gef.: 581.5 (100); Dimer 72: RT = 18.2; ber. ($M+H^+$): 456.36; gef.: 456.4 (100), 131.2 (10).

Nr. 4: Amin: *rac*-1-Aminoindan; RT = 11.8; ber. ($M+H^+$): 429.29; gef.: 429.0 (100), 313.1 (60), 183.0 (10), 117.2 (10), 98.2 (10).

Nr. 5: Amin: Cyclohexylamin; RT = 10.8; ber. ($M+H^+$): 395.30; gef.: 395.3 (100), 265.2 (10), 98.2 (60); Dimer 72: RT = 8.8; ber. ($M+H^+$): 270.22; gef.: 270.2 (100), 171.1 (10), 131.1 (30), 112.2 (10).

Nr. 6: Amin: *rac*-2-Aminoproionaldehyd-dimethylacetal; RT = 7.3; ber. ($M+H^+$): 369.25; gef.: 369.1 (100), 258.1 (10), 98.2 (40); Dimer 72: RT = 3.0; ber. ($M+H^+$): 244.17; gef.: 244.0 (100), 227.0 (40), 131.0 (40).

Nr. 7: Amin: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan; RT = 4.9; ber. ($M+H^+$): 417.27; gef.: 439.1 (20, $M+Na^+$), 417.0 (20, $M+H^+$), 399.1 (40), 274.0 (100), 200.0 (20), 183.0 (20), 171.0 (20), 98.2 (30); Dimer 72: RT = 2.6; ber. ($M+H^+$): 292.19; gef.: 292.0 (100), 171.0 (10), 134.0 (50), 131.1 (40).

Nr. 8: Amin: 1-Adamantylamin; Dimer 72: RT = 10.8; ber. ($M+H^+$): 322.25; gef.: 322.3 (100), 164.2 (10), 135.2 (40), 98.2 (20); verunreinigt mit einer unbekanntenen Substanz gleicher RT: 395.2 (40).

Tab. 12, Seite 62 (Nukleophilie):

Dimer 71 (für alle Einträge): RT = 4.5-5.7; ber. ($M+H^+$): 256.20; gef.: 256.1 (30%), 98.1 (100).

Nr. 1: Amin: Hydroxylamin (+ 0.05% Tween[®] 20); RT = 6.3; ber. ($M+H^+$): 329.22; gef.: 329.2 (100), 98.1 (90).

Nr. 2a: Amin: Hydrazinoameisensäure-*tert*-butylester (vor dem Versuch frisch gelöst); RT = 6.1; ber. ($M+H^+$): 328.24; gef.: 350.1 (100, $M+Na^+$), 328.1 (100, $M+H^+$), 98.2 (70).

Nr. 2b: Amin: Hydrazinoameisensäuremethylester (+ 0.05% Tween[®] 20); RT = 7.6; ber. ($M+H^+$): 386.24; gef.: 408.0 (20, $M+Na^+$), 386.1 (100, $M+H^+$), 354.1 (10), 98.1 (40).

Nr. 3: Amin: 1-Aminopyrrolidin (aus dem Hydrochlorid mit 0.9 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); RT = 9.5; ber. ($M+H^+$): 382.28; gef.: 382.1 (100), 257.2 (70), 169.1 (20), 98.2 (20); verunreinigt mit einer unbekanntem Substanz gleicher RT: 447.1 (40), 425.0 (50); Dimer 72: RT = 4.5; ber. ($M+H^+$): 257.20; gef.: 257.1 (100), 240.2 (10), 171.1 (10), 85.2 (20).

Nr. 4a: Amin: 4-Aminophenol; RT = 8.9; ber. ($M+H^+$): 405.25; gef.: 427.2 (10, $M+Na^+$), 405.1 (100, $M+H^+$), 274.9 (10), 98.2 (30).

Nr. 4b: Amin: 3-Aminophenol; RT = 9.3; ber. ($M+H^+$): 405.25; gef.: 405.2 (100), 240.4 (10), 98.1 (50); Dimer 72 als Diketopiperazin 80: RT = 9.6; ber. ($M+H^+$): 263.14; gef.: 263.3 (100), 240.3 (40); verunreinigt mit einer unbekanntem Substanz gleicher RT: 420.3 (30), 398.4 (40), 98.2 (60).

Nr. 4c: Amin: 2-Aminophenol; RT = 10.3; ber. ($M+H^+$): 405.25; gef.: 427.2 (50, $M+Na^+$), 405.2 (100, $M+H^+$), 387.3 (20), 263.3 (20), 98.1 (50); Dimer 72: RT = 9.2; ber. ($M+H^+$): 280.17; gef.: 280.0 (100), 263.1 (30), 131.1 (40), 122.1 (80); Dimer 72 als Diketopiperazin 80: RT = 9.4; ber. ($M+H^+$): 263.14; gef.: 303.9 (20, $M+CH_3CN+H^+$), 263.3 (100, $M+H^+$), 240.3 (10), 122.2 (40); 4H-Benzo[1,4]oxazin-3-one 79: RT = 11.5; ber. ($M+H^+$): 320.16; gef.: 319.9 (30, $M+H^+$), 303.1 (100, $M+H^+-NH_3$), 190.0 (60), 162.1 (80), 134.2 (30).

Nr. 4d: Amin: *p*-Anisidin; RT = 10.3; ber. ($M+H^+$): 419.27; gef.: 441.3 (10, $M+Na^+$), 419.2 (100, $M+H^+$), 289.1 (10), 98.1 (50).

Nr. 4e: Amin: Anilin; RT = 9.8; ber. ($M+H^+$): 389.26; gef.: 411.2 (20, $M+Na^+$), 389.2 (60, $M+H^+$), 259.1 (10), 98.1 (100); Dimer 72 als Diketopiperazin 80: RT = 10.9; ber. ($M+H^+$): 247.15; gef.: 287.6 (50, $M+CH_3CN+H^+$), 247.2 (100, $M+H^+$), 106.1 (20).

Nr. 4f: Amin: 3-Fluoranilin; RT = 10.5; ber. ($M+H^+$): 407.25; gef.: 429.2 (10, $M+Na^+$), 407.1 (100, $M+H^+$), 369.4 (10), 247.3 (10), 98.2 (20); Dimer 72 als Diketopiperazin 80: RT = 11.8; ber. ($M+H^+$): 265.14; gef.: 305.5 (80, $M+CH_3CN+H^+$), 265.1 (100, $M+H^+$).

Nr. 5a: Amin: 2-Aminothiazol; RT = 8.3; ber. ($M+H^+$): 396.21; gef.: 396.2 (90%), 353.4 (10), 244.3 (10), 98.1 (100).

Nr. 5b: Amin: 2-Amino-1,3,4-thiadiazol; RT = 8.2; ber. ($M+H^+$): 397.20; gef.: 397.2 (70%), 98.1 (100).

Nr. 6: Amin: 2-Aminopyridin; RT = 7.8; ber. ($M+H^+$): 390.25; gef.: 390.2 (100), 343.2 (10), 307.2 (20), 265.2 (10), 135.2 (10), 98.2 (20), 79.1 (30); Dimer 72: RT = 5.6; ber. ($M+H^+$): 265.17; gef.: 265.1 (100), 135.1 (90), 107.2 (10).

Tab. 13, Seite 66 (Funktionelle Gruppen):

Nr. 1a: Amin: Glycin-*tert*-butylester (aus dem Acetat mit 0.9 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); RT = 6.5; ber. ($M+H^+$): 371.23; gef.: 371.2 (100), 98.2 (20).

Nr. 1b: Amin: β -Alanin-*tert*-butylester (aus dem Hydrochlorid mit 0.9 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); RT = 6.8; ber. ($M+H^+$): 385.25; gef.: 385.2 (100), 255.1 (10), 98.2 (20).

Nr. 1c: Amin: Glycinamid (aus dem Hydrochlorid mit 0.9 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); RT = 6.1; ber. ($M+H^+$): 370.25; gef.: 392.1 (20, $M+Na^+$), 370.1 (95, $M+H^+$), 353.0 (10), 239.9 (10), 98.1 (100).

Nr. 1d: Amin: β -Alaninamid (aus dem Hydrochlorid mit 0.9 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); RT = 6.1; ber. ($M+H^+$): 384.26; gef.: 384.2 (100), 254.2 (10), 98.2 (20).

Nr. 2: Amin: 1-(3-Aminopropyl)-2-pyrrolidinon; RT = 8.3; ber. ($M+H^+$): 438.31; gef.: 438.1 (100), 308.1 (10), 98.2 (30).

Nr. 3a: Amin: *N*-Boc-1.2-diaminoethan; RT = 4.8; ber. ($M+H^+$): 356.27; gef.: 378.2 (20, $M+Na^+$), 356.1 (100, $M+H^+$), 338.2 (30), 198.1 (10), 98.2 (60).

Nr. 3b: Amin: *N*-(2-Aminoethyl)acetamid; RT = 6.8; ber. ($M+H^+$): 398.28; gef.: 398.1 (100), 98.1 (70); verunreinigt mit einer unbekanntenen Substanz gleicher RT: 481.1 (30).

Nr. 3c: Amin: Agmantin (aus dem Sulfat mit 0.25 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); RT = 6.8; ber. ($M+H^+$): 426.32; gef.: 426.2 (100), 301.2 (10), 98.2 (10); Seitenkettenacyliertes Produkt: RT = 7.9; ber. ($M+H^+$): 551.41; gef.: 551.3 (30%), 509.3 (60), 426.2 (100), 379.3 (10), 98.2 (30).

Nr. 3d: Amin: 2-Aminoethylhydrogensulfat (mit 1.0 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); RT = 5.0; ber. ($M-H^+$): 435.19; gef. (Ionisierung im Anionenmodus): 435.2 (100), 385.0 (10), 113.0 (10), 69.1 (20).

Nr. 3e: Amin: 2-Aminoethyldihydrogenphosphat (mit 1.5 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); RT = 3.6; ber. ($M-H^+$): 435.20; gef. (Ionisierung im Anionenmodus): 435.1 (100), 384.9 (70), 291.0 (20), 113.0 (30), 69.1 (50).

Nr. 3f: Amin: 2-Tritylthioethylamin (Synthese vergl. Abschnitt 9.1.2.5); RT = 8.8; ber. ($M+H^+$): 373.23; gef.: 395.1 (40, $M+Na^+$), 373.0 (100, $M+H^+$), 355.1 (10), 288.1 (10), 98.2 (80); Disulfid: RT = 10.8; ber. ($M+H^+$): 743.43; gef.: 743.2 (100), 725.2 (30), 373.1 (70).

Nr. 3g: Amin: 3-Tritylthiopropylamin (Synthese vergl. Abschnitt 9.1.2.6); RT = 9.5; ber. ($M+H^+$): 387.25; gef.: 409.1 (10, $M+Na^+$), 387.1 (100, $M+H^+$), 302.0 (10), 257.0 (10), 98.1 (60); Disulfid: RT = 11.7; ber. ($M+H^+$): 771.46; gef.: 771.3 (70), 458.0 (100), 409.0 (20), 387.0 (20).

Nr. 4a: Amin: Ethanolamin (entspricht Tripeptoid **17**. Daten konsistent mit dem Syntheseprodukt der Synthese am Polystyrolharz: vergl. Abschnitt 9.2.2.2, Seite 130).

Nr. 4b: Amin: (*R*)-1-Amino-2-propanol; RT = 7.12; ber. ($M+H^+$): 371.27; gef.: 393.1 (10, $M+Na^+$), 371.1 (100, $M+H^+$), 241.1 (10), 98.2 (40).

Nr. 5: Amin: 4-Hydroxybenzylamin (Synthese aus 4-Hydroxybenzonnitril nach Lit.^[193]); RT = 9.1; ber. ($M+H^+$): 419.27; gef.: 419.1 (100), 313.0 (30), 183.0 (10), 98.2 (30).

Nr. 6: Amin: Aminoacetaldehyd-dimethylacetal; RT = 5.9; ber. ($M+H^+$): 355.24; gef.: 377.1 (50, $M+Na^+$), 355.1 (60, $M+H^+$), 98.2 (100); Aldol-Dimerisierungsprodukt: RT = 9.4; ber. ($M+H^+$): 709.47; gef.: 731.1 (20, $M+Na^+$), 709.1 (100, $M+H^+$), 691.3 (50), 355.1 (90), 240.1 (50), 98.2 (30).

Nr. 7: Amin: 3-Aminopropionitril; RT = 7.4; ber. ($M+H^+$): 366.25; gef.: 366.1 (100), 281.2 (10), 236.1 (10), 98.2 (40).

Nr. 8: Amin: Histamin; RT = 6.3; ber. ($M+H^+$): 407.28; gef.: 407.1 (100), 294.1 (20), 277.1 (10), 98.1 (60); verunreinigt mit einer unbekanntes Substanz gleicher RT: 465.1 (30); bicyclisches Nebenprodukt 87: RT = 4.4; ber. ($M+H^+$): 322.19; gef.: 322.1 (100), 192.0 (30), 164.0 (20).

Nr. 9: Amin: Tryptamin; RT = 11.8; ber. ($M+H^+$): 456.30; gef.: 456.2 (100), 326.2 (10), 282.3 (10), 98.2 (10).

Schema 16, Seite 64 (Versuch der Synthese von 81):

Mit den Aminen *n*-Butylamin (*C*-terminal, 5 M in NMP) und 4-Aminophenol (*N*-terminal, 1 M in NMP) wurde das entsprechende Dipeptoid 4-Hydroxyphenyl-**73** nach AAV 12 am Rink-Linker synthetisiert. Nach der Einführung des letzten Aminbausteins wurde die Synthese des des trimeren Peptomers **81** nach AAV 12 (Monomermethode) mit Fmoc-L-Pro-OH versucht. HPLC-MS-analytisch wurde 20% des Rohproduktes des SPOTs (0.23 cm²) untersucht (Injektionsmenge: 10 µl). Das gewünschte Produkt ließ sich massenspektrometrisch nachweisen, die Reinheit lag nach HPLC unter 1%:

RT = 8.6; ber. ($M+H^+$): 377.22; gef.: 377.0 (100), 358.1 (60); verunreinigt mit einer oder mehreren Substanzen gleicher RT: 500.2 (40); 478.2 (60).

Durch Verwendung von Piperidin als dritten Baustein nach AAV 12 wurde an der gleichen Membran das Tripeptoid 4-Hydroxyphenyl-**19** in einer Reinheit von 80% erhalten (vergl. Tab. 12, Eintrag 4a).

9.3.2.5 Synthesen von Peptoid-Bibliotheken (Abschnitt 4)

Im folgenden werden die experimentellen Daten der in Abschnitt 4 erläuterten Synthesen von Peptoid-Bibliotheken beschrieben.

Vorversuche

Tab. 15, Seite 74 (Vergleich der Produktreinheiten an „großen“ und „kleinen“ SPOTs):

[„Große“ SPOTs: SPOT-Durchmesser: ca. 9 mm, Analytierte Fläche: 0.23 cm² aus der SPOT-Mitte; „kleine“ SPOTs: SPOT-Durchmesser: ca. 1.2 mm, Analytierte Fläche: 10 SPOTs mit identischer Tripeptoidsequenz und einer SPOTfläche von 0.01 cm² / SPOT.]

Die Tripeptide **16**, **90** und **91** wurden mit den Aminen *n*-Butylamin bzw. Furfurylamin (1. Baustein), Benzylamin bzw. Histamin (2. Baustein) und Piperidin bzw. Diethylamin (3. Baustein, alle Amine in NMP) nach AAV 13 am Rink-Linker synthetisiert. Der

Derivatisierungsgrad wurde nach AAV 6-B mit 750 nmol/cm^2 bestimmt. HPLC-MS-analytisch wurden a.) bei „großen“ SPOTs: 20% des Rohproduktes eines SPOTs b.) bei „kleinen“ SPOTs: 17% der vereinten Rohprodukte von 10 SPOTs untersucht (Injektionsmenge: je $10 \mu\text{l}$).

16: Die analytischen Daten waren konsistent mit dem Syntheseprodukt der Synthese am Polystyrolharz: vergl. Abschnitt 9.2.2, Seite 130.

90: Die analytischen Daten entsprechen dem Produkt **Nr. 8** aus Tab. 13 (vergl. Seite 153).

91: RT = 10.2; ber. ($M+H^+$): 415.24; gef.: 437.1 (20, $M+Na^+$), 415.1 (100, $M+H^+$), 261.0 (10), 86.1 (60).

Synthese der Peptoid-Bibliothek aus 8000 Tripeptoiden 96

Eine esterfrei aminoderivatisierte Zellulosemembran **9** (AAV 7, $19 \times 28 \text{ cm}$, 500 nmol/cm^2) wurde mit einer Lösung aus Fmoc-Gly-OH, TBTU und DIEA (je 15.0 mmol) in 50 ml DMF versetzt. Nach 30 Minuten wurde die Membran nacheinander mit den folgenden Lösungen behandelt: DMF ($3 \times 50 \text{ ml}$, je 5 min), Piperidin (20% in DMF, 50 ml , $1 \times 20 \text{ min}$), DMF ($5 \times 50 \text{ ml}$, je 5 min) und Methanol ($2 \times 50 \text{ ml}$, je 5 min). Man ließ die Membran trocknen und wiederholte die Acylierung mit Glycin zweimal. Vor der Abspaltung der Fmoc-Gruppe des dritten Glycinbausteins mit Piperidin wurden drei SPOTs am Rand der Membran ausgestanzt und der Derivatisierungsgrad nach AAV 6-B bestimmt (401 nmol/cm^2). Die restliche Membran wurde wie in den vorangegangenen Schritten weiterbehandelt.

An dieser Membran **94** wurde eine Bibliothek aus allen 8000 Tripeptoiden, die durch Kombination von 20 Bausteinen möglich sind, nach AAV 13 synthetisiert. Zur SPOT-Definition wurde abweichend Fmoc-Gly-OPfp (0.3 M in DMSO) verwendet. Um die Synthesequalität zu überprüfen, wurde parallel zu jedem automatischen Pipettierschritt das Tripeptoid **16** an Rand der Membran aus den Aminen *n*-Butylamin, Benzylamin und Piperidin (jeweils 5 M in NMP) durch manuelle Synthese gemäß AAV 12 am Rink-Linker synthetisiert, der hier anstelle von Fmoc-Glycin zur SPOT-Definition verwendet wurde.

Die 20 Bausteine für die Synthese der Tripeptoid-Bibliothek sind im folgenden aufgezählt:

[Alle Bausteine wurden, wenn nicht anders angegeben, 50% (v/v) in NMP eingesetzt. Bei Bausteinen, die als Monomere gekennzeichnet sind, wurde zur Synthese des Bausteins eine Fmoc-Aminosäure eingesetzt. Diese wurde 0.6 M in NMP gelöst und mit 0.5 Äq. DIC aktiviert (Voraktivierungszeit: 30 min). Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit DBU (4% in NMP)]

B-01: Benzylamin; **B-02:** 2-Pyridin-2-yl-ethylamin; **B-03:** Cyclohexylmethylamin; **B-04:** *n*-Octylamin; **B-05:** Ethanolamin; **B-06:** Fmoc-Gly-OH (Monomer); **B-07:** *rac*-3-Amino-1,2-propandiol (30 Vol-% in NMP); **B-08:** Tryptamin (1.5 M in NMP); **B-09:** 2-Aminomethylthiophen; **B-10:** Tyramin (1.0 M in NMP); **B-11:** Homoveratrylamin; **B-12:** Napht-1-ylmethylamin (30 Vol-% in NMP); **B-13:** Isobutylamin; **B-14:** Hydrazinoameisensäure-*tert*-butylester (2.0 M in NMP); **B-15:** Histamin (1.5 M in NMP); **B-16:** Fmoc-Sar-OH

(Monomer); **B-17**: *N*-Aminoethylpyrrolidin; **B-18**: *N*-Boc-1,4-diaminobutan; **B-19**: β -Alanin-*tert*-butylester (3.0 M in H₂O aus dem Hydrochlorid mit 0.9 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); **B-20**: β -Alaninamid (5.0 M in H₂O aus dem Hydrochlorid mit 0.9 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20).

Analytische Daten der Kontrollverbindung:

16: Die analytischen Daten waren konsistent mit dem Syntheseprodukt der Synthese am Polystyrolharz: vergl. Abschnitt 9.2.2, Seite 130.

Synthese der Peptoid-Bibliothek aus 8000 Hexapeptoiden

Eine Bibliothek aus 8000 Hexapeptoiden, deren Sequenzen zufällig auf der Basis von 40 Bausteinen ausgewählt wurden (Programm LISA), wurde an einer aminoderivatisierten Zellulosemembran **38** [AAV 8, 19 x 28 cm, Niedrigbelastungsprotokoll (abweichend wurde das Diamin **37** 2 h angewendet), 501 nmol/cm²] nach AAV 13 synthetisiert. Dazu wurde Fmoc- β Ala-OPfp (0.3 M in DMSO) zur SPOT-Definition verwendet. Um die Synthesqualität zu überprüfen, wurden am Rand der Membran ein Tripeptoid sowie acht Hexapeptide synthetisiert (Sequenzen vergl. Tab. 18, Seite 85), indem man die Reagenzien an dieser Stelle 45-Mal pipettieren ließ, so daß SPOTs von ausreichender Größe für die Analyse entstanden. Letztere Verbindungen wurden am Rink-Linker synthetisiert, der hier anstelle von Fmoc- β -Alanin zur SPOT-Definition verwendet wurde. Zusätzlich wurden am Membranrand je zwei „große“ SPOTs mit Fmoc- β -Alanin bzw. Fmoc-Rink-Linker vorgesehen, die nach der SPOT-Definition ausgestanzt wurden, um den Derivatisierungsgrad nach AAV 6-B zu bestimmen (β -Alanin: 387 nmol/cm², Rink-Linker: 352 nmol/cm²). Als Ergänzung zur allgemeinen Synthesevorschrift wurden die Reagenziengefäße mit Aluminiumfolie verschlossen, um eine Verflüchtigung von Lösungsmitteln und Reagenzien zu minimieren. Eine Öffnung minimaler Größe wurde direkt vor Beginn des jeweiligen Synthesecyclus eingeführt.

Die 40 Bausteine für die Synthese der Hexapeptoid-Bibliothek sind im folgenden aufgezählt:

[Alle Bausteine wurden, wenn nicht anders angegeben, 50% (v/v) in NMP eingesetzt. Bei Bausteinen, die als Monomere gekennzeichnet sind, wurde zur Synthese des Bausteins eine Fmoc-Aminosäure eingesetzt. Diese wurde 0.6 M in NMP gelöst und mit 0.5 Äq. DIC aktiviert (Voraktivierungszeit: 30 min). Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit DBU (4% in NMP)]

Bausteine **B-01** - **B-20**: siehe Tripeptoid-Bibliothek.

B-21: Glycinamid (5.0 M in H₂O aus dem Hydrochlorid mit 0.9 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); **B-22**: Glycin-*tert*-butylester (2.5 M in H₂O aus dem Acetat mit 0.9 Äq. NaOH + 0.05% Tween[®] 20); **B-23**: 2-Amino-1,3-propandiol (3 M in NMP); **B-24**: *N*-Boc-1,2-diaminoethan; **B-25**: 3-Amino-1-propanol; **B-26**: *N*-Boc-1,3-diaminopropan; **B-27**: *rac*-2-Amino-1-propanol; **B-28**: Nicotinsäurehydrazid (0.75 M in NMP); **B-29**: 2-Methoxyethylamin; **B-30**: 2-Aminothiazol (1.5 M in NMP); **B-31**: Fmoc-L-Ala-OH (Monomer); **B-32**: Hydroxylamin (50% in H₂O + 0.05% Tween[®] 20); **B-33**: Fmoc-L-Pro-OH (Monomer); **B-34**:

rac-Tetrahydrofurfurylamin; **B-35**: 4-Aminophenol (1.0 M in NMP); **B-36**: *rac*-2-Amino-1-phenylethanol; **B-37**: *rac*-Fmoc-Pip-OH (Monomer); **B-38**: *rac*-*s*-Butylamin; **B-39**: 4-Methoxybenzylamin; **B-40**: *n*-Butylamin; **B-41**: Cyclohexylamin; **B-42**: *rac*-1-Phenylethylamin; **B-43**: 2-Chlorbenzylamin; **B-44**: 4-Phenoxyanilin (2 M in NMP); **B-45**: 3,3-Diphenyl-1-propylamin. (Pip = Pipecolinsäure).

Analytische Daten der Kontrollverbindungen (vergl. Tab. 18, Seite 85):

46-01-40 (16): Die analytischen Daten waren konsistent mit dem Syntheseprodukt der Synthese am Polystyrolharz: vergl. Abschnitt 9.2.2, Seite 130.

46-01-40-20-01-40: RT = 14.6; ber. ($M+H^+$): 791.48; gef.: 791.4 (100), 678.3 (10), 519.3 (10).

46-01-40-20-01-34: RT = 13.6; ber. ($M+H^+$): 819.48; gef.: 819.4 (100), 706.4 (10), 547.3 (10).

33-29-27-13-19-10: RT = 9.6; ber. ($M+H^+$): 764.42; gef.: 764.3 (100), 667.3 (10), 552.2 (20), 437.1 (10); verunreinigt mit einer unbekanntenen Substanz gleicher RT: 800.3 (20).

33-38-24-21-20-29: RT = 3.2; ber. ($M+H^+$): 685.40; gef.: 685.2 (100), 588.2 (10), 475.1 (10), 260.1 (40).

29-44-05-16-26-31: RT = 10.2; ber. ($M+H^+$): 715.38; gef.: 715.2 (100), 644.2 (20), 600.2 (10), 340.9 (10).

14-36-36-16-33-03: (4 Diastereomere mit 2 RT) RT-1 (12%) = 12.9; ber. ($M+H^+$): 765.43; gef.: 787.3 (30, $M+Na^+$), 765.2 (100, $M+H^+$), 747.2 (60), 717.3 (40), 516.2 (10), 339.2 (10), 268.1 (10); RT-2 (35%) = 14.0; ber. ($M+H^+$): 765.43; gef.: 765.2 (100), 693.3 (20), 516.2 (20).

15-45-27-30-08-44: RT = 17.2; ber. ($M+H^+$): 1100.48; gef.: 1122.3 (30, $M+Na^+$), 1100.3 (100, $M+H^+$), 733.1 (30), 609.2 (50), 339.2 (30).

23-25-22-03-28-13: RT = 10.1; ber. ($M+H^+$): 822.44; gef.: 822.3 (10), 765.3 (50), 749.3 (30), 707.3 (20), 673.3 (10), 577.3 (10), 464.4 (10), 442.2 (20), 366.1 (20), 284.1 (100).

9.3.2.6 Synthesen von rückgratmodifizierten Peptoiden (Abschnitt 5)

Vorversuche zur Auffindung einer geeigneten Base (vergl. Seite 95):

Das Trimer **20** wurden mit den Aminen *n*-Butylamin, Benzylamin und Piperidin (jeweils 5 M in NMP) nach AAV 12 am Rink-Linker synthetisiert. Abweichend von der allgemeinen Arbeitsvorschrift wurde im zweiten Acylierungsschritt anstelle von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester zunächst eine tertiäre Base und nach 15 Minuten eine Lösung von 3-Chlormethylbenzoylchlorid (**116**) gemäß Tab. 26 eingesetzt. HPLC-MS-analytisch wurden jeweils 20% des Rohproduktes eines SPOTs (0.23 cm²) untersucht (Injektionsmenge: 10 µl). Die Reihenheiten des Trimers **20** sowie des Dipeptoids **71** sind in Tab. 26 aufgeführt.

Tab. 26: Acylierungsbedingungen für den zweiten Acylierungsschritt bei der Synthese des Trimers **20**.

Nr.	Vorinkubation mit tertiärer Base ¹⁾	3-Chlormethylbenzoyl- chlorid (116) ²⁾	Reinheit 71 ³⁾ [%]	Reinheit 20 ³⁾ [%]
1	-	1 M in NMP + 1,2 Äq. DIEA ⁴⁾	23	58
2	<i>N</i> -Benzylimidazol (124) (3 M in DMF)	1 M in NMP	3	84
3	Tris(3,6-dioxaheptyl)amin (125) (pur $\hat{=}$ 3 M)	1 M in NMP	2	81
4	1,4-Diaza- bicyclo[2,2,2]octan (126) (1,5 M in DMF)	1 M in NMP	9	59

¹⁾ Einfach-Pipettierung; ²⁾ Zweifach-Pipettierung (2 x 15 min); ³⁾ HPLC, 220 nm; ⁴⁾ Eine rote Verfärbung der Lösung nach Basenzugabe deutete eine Zersetzung des Reagenzes an.

HPLC-MS:

Dimer **71**: vergl. Daten zu Tab. 12 in Abschnitt 9.3.2-„Untersuchung der Anwendbarkeit verschiedener Amine“.

Trimer **20**: RT = 12.5; ber. ($M+H^+$): 479.30; gef.: 479.2 (100), 98.2 (10); Nebenprodukt **130**: RT = 8.8; ber. ($M+H^+$): 332.24; gef.: 332.1 (100), 315.1 (10), 202.0 (10), 119.0 (10).

Tab. 21, Seite 97:

Die Trimeren **20** wurden mit den Aminen *n*-Butylamin, Benzylamin und Piperidin (jeweils 5 M in NMP) nach AAV 12 am Rink-Linker synthetisiert. Abweichend von der allgemeinen Arbeitsvorschrift wurden im zweiten Acylierungsschritt anstelle von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester die in Tab. 21 angegebenen Acylierungsmittel eingesetzt (1 M in NMP). Zusätzlich ging der Acylierung in den angegebenen Fällen eine Pipettierung von Benzylimidazol (3 M in DMF, 1 x 15 min, 2.5 μ l) voraus. HPLC-MS-analytisch wurden jeweils 20% des Rohproduktes eines SPOTs (0.23 cm²) untersucht (Injektionsmenge: 10 μ l). Im folgenden sind die analytischen Daten der Trimeren **20** sowie ggf. beobachteter Nebenprodukte aufgeführt (Die Nummern entsprechen den jeweiligen Tabelleneinträgen):

Dimer **71** (für alle Einträge): vergl. Daten zu Tab. 12 in Abschnitt 9.3.2-„Untersuchung der Anwendbarkeit verschiedener Amine“.

Nr. 1: Acylierungsmittel: Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**). Identisch mit Tripeptoid **16**: vergl. in Abschnitt 9.3.2-0 Optimierung des Acylierungsmittels.

Nr. 2: Acylierungsmittel: *rac*-2-Brompropionsäure (**113**). RT = 11.6; ber. ($M+H^+$): 417.29; gef.: 439.2 (40, $M+Na^+$), 417.1 (100, $M+H^+$), 287.0 (30), 98.2 (40); Dimer 123: RT = 9.1; ber. ($M+H^+$): 292.20; gef.: 292.0 (20%), 134.0 (100), 91.1 (90).

Nr. 3: Acylierungsmittel: 3-Brompropionsäure (**114**). RT = 11.4; ber. ($M+H^+$): 417.29; gef.: 439.2 (10, $M+Na^+$), 417.1 (100, $M+H^+$), 287.1 (10), 98.1 (30); Dimer 123: RT = 9.5; ber. ($M+H^+$): 292.20; gef.: 292.1 (100), 156.0 (40), 120.0 (40), 98.2 (70), 91.2 (70); Nebenprodukt 129: RT = 6.5; ber. ($M+H^+$): 270.22; gef.: 270.1 (10), 185.1 (10), 98.1 (100).

Nr. 4: Acylierungsmittel: Acrylsäure (**115**). RT = 11.3; ber. ($M+H^+$): 417.29; gef.: 439.2 (10, $M+Na^+$), 417.1 (100, $M+H^+$), 287.1 (10), 98.1 (30); Dimer 123: RT = 9.5; ber. ($M+H^+$): 292.20; gef.: 292.1 (80), 156.0 (30), 98.2 (100), 91.2 (70); Nebenprodukt 129: RT = 5.9; ber. ($M+H^+$): 270.22; gef.: 270.1 (10), 185.1 (10), 98.1 (100).

Nr. 5a: Acylierungsmittel: 3-Chlormethylbenzoylchlorid (**116**). vergl. „Vorversuche zur Auffindung einer geeigneten Base“, Seite 156.

Nr. 5b: Acylierungsmittel: 4-Chlormethylbenzoylchlorid (**117**). RT = 12.2; ber. ($M+H^+$): 479.30; gef.: 479.1 (100), 98.2 (10); Nebenprodukt 130: RT = 8.4; ber. ($M+H^+$): 332.24; gef.: 332.1 (100), 247.1 (10).

Nr. 6: Acylierungsmittel: 2-Bromethylchloroformiat (**118**). RT = 11.9; ber. ($M+H^+$): 433.28; gef.: 433.1 (100), 259.2 (10), 191.9 (10), 98.2 (10).

Nr. 7a: Acylierungsmittel: 2-Chlormethylphenylisocyanat (**119**). RT = 12.4; ber. ($M+H^+$): 494.32; gef.: 494.1 (100), 364.1 (10), 262.1 (10), 98.1 (10); Hydantoin 131: RT = 14.2; ber. ($M+H^+$): 477.29; gef.: 477.2 (100), 245.2 (10), 98.2 (10); Dimer 123 (Harnstoff, 6%): RT = 11.6; ber. ($M+H^+$): 369.23; gef.: 369.0 (20), 262.0 (100), 245.1 (60), 239.0 (30), 132.0 (40); Dimer 123 (cyclisiert zum Hydantoin, 1%): RT = 13.1; ber. ($M+H^+$): 352.20; gef.: 352.0 (100), 245.1 (60), 132.2 (10).

Nr. 7b: Acylierungsmittel: 4-Chlormethylphenylisocyanat (**120**). RT = 12.9; ber. ($M+H^+$): 494.32; gef.: 494.1 (100), 262.1 (10); Hydantoin 132 RT = 14.6; ber. ($M+H^+$): 477.29; gef.: 477.1 (100), 245.2 (10), 98.2 (10); Dimer 123 (cyclisiert zum Hydantoin, 1%): RT = 12.4; ber. ($M+H^+$): 352.20; gef.: 352.0 (100), 245.1 (50); Das Chromatogramm ist von einem breiten Signal im Bereich RT = 11-22 überlagert, das vermutlich von verunreinigtem Isocyanat verursacht wurde (Aspekt der Isocyanat-Lösung: gelb).

Nr. 8: Acylierungsmittel: 2-Bromethylisocyanat (**121**). RT = 11.1; ber. ($M+H^+$): 432.30; gef.: 454.2 (30, $M+Na^+$), 432.2 (100, $M+H^+$), 302.1 (50), 201.1 (50), 183.1 (70), 98.2 (100%) (Anmerkung: das hier beschriebene Produkt wurde nur mittels Massendetektion nachgewiesen. Die Substanzmenge war zu gering, um eine messbare UV-Absorption zu zeigen.); Hydantoin 133: RT = 12.7; ber. ($M+H^+$): 415.27; gef.: 437.2 (60, $M+Na^+$), 415.2 (80, $M+H^+$), 183.2 (10), 98.2 (100); 4,5-Dihydrooxazol 135: RT = 3.2; ber. ($M+H^+$): 200.14; gef.: 200.1 (100), 183.1 (70), 155.0 (50), 113.1 (60), 99.1 (60).

9.3.2.7 Synthesen von Hydantoinen (Abschnitt 6)

Tab. 22, Seite 106 (Optimierung der Cyclisierungsbedingungen):

Die Hydantoine **149** wurden gemäß AAV 12 und AAV 14 synthetisiert. Nach AAV 12 wurde das zugrunde liegende membrangebundene Dipeptoid mit *n*-Butylamin (in NMP) und Glycinamid (in H₂O; beide Amine 5 M) an Rink- oder Photo-Linker synthetisiert. Abweichend von der allgemeinen Arbeitsvorschrift wurden die Bromsubstitutionschritte nicht durch Pipettieren der Reagenzien, sondern durch Inkubieren (Tränken) der gesamten Membran mit den jeweiligen Aminlösungen durchgeführt (1 x 30 min). Direkt nach Pipettieren des letzten Aminbausteins und Waschen der Membran erfolgte die Fortsetzung der Synthese gemäß AAV 14. Das Isocyanat wurde dazu gemäß Tab. 22 gewählt. Es wurden unterschiedliche Abspalt- und Cyclisierungsbedingungen gemäß Tab. 22 angewendet. HPLC-MS-analytisch wurden jeweils 20% des Rohproduktes eines SPOTs (0.23 cm²) untersucht (Injektionsmenge: 10 µl). Im folgenden sind die analytischen Daten der Reaktionsprodukte aufgeführt:

148a (R = Phenyl): RT = 9.9; ber. ($M+H^+$): 364.20; gef.: 363.8 (60), 347.0 (50), 330.0 (20), 245.0 (100), 200.0 (70), 183.0 (60), 131.0 (30), 86.1 (10).

148b (R = *n*-Butyl): RT = 9.5; ber. ($M+H^+$): 344.23; gef.: 366.1 (10, $M+Na^+$), 343.9 (20, $M+H^+$), 326.9 (30), 257.0 (10), 245.0 (100), 200.0 (60), 183.0 (50), 131.1 (20), 86.1 (10);

149a (R = Phenyl): RT = 10.6; ber. ($M+H^+$): 347.17; gef.: 346.7 (40), 329.9 (100), 216.8 (30), 189.0 (20).

149b (R = *n*-Butyl): RT = 11.3; ber. ($M+H^+$): 327.21; gef.: 349.1 (20, $M+Na^+$), 326.9 (20, $M+H^+$), 309.9 (100), 290.1 (10), 196.8 (20), 169.1 (20).

Tab. 23, Seite 109 (Variation der Hydantoin-Substitutionen):

Die Hydantoine **154** wurden gemäß AAV 12 und AAV 14 synthetisiert. Nach AAV 12 wurde das zugrunde liegende membrangebundene Dipeptoid mit *n*-Butylamin (in NMP), und dem in Tab. 23 aufgeführten α -Aminosäure-Derivat (in H₂O) an Rink-Linker modifizierter Membran synthetisiert. Direkt nach Pipettieren der letzten Aminbausteins und Waschen der Membran erfolgte die Fortsetzung der Synthese gemäß AAV 14 unter Verwendung von Phenylisocyanat. HPLC-MS-analytisch wurden jeweils 20% des Rohproduktes eines SPOTs (0.23 cm²) untersucht (Injektionsmenge: 10 µl). Im folgenden sind die analytischen Daten der Reaktionsprodukte aufgeführt:

Nr. 1: α -Aminosäure-Derivat: Glycin-*tert*-butylester. Daten identisch mit **149a** (R = Phenyl) vergl. „Optimierung der Cyclisierungsbedingungen“

Nr. 2: α -Aminosäure-Derivat: L-Alaninamid. RT = 11.7; ber. ($M+H^+$): 361.19; gef.: 360.8 (60), 343.9 (100), 290.0 (10), 230.8 (20), 203.0 (10); verunreinigt mit einer unbekanntem Substanz gleicher RT: 448.0 (20).

Nr. 3: α -Aminosäure-Derivat: L-Leucinamid. RT = 15.0; ber. ($M+H^+$): 403.24; gef.: 402.8 (50), 385.9 (100), 272.8 (30), 244.9 (20), 189.0 (10).

Nr. 4: α -Aminosäure-Derivat: L-Isoleucin-*tert*-butylester. RT = 15.1; ber. ($M+H^+$): 403.24; gef.: 402.8 (40), 385.9 (100), 272.8 (30), 245.0 (40), 189.1 (10).

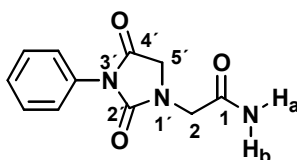
Versuch der Synthese von Dihydropyrimidin-2,4-dionen **158**:

Es wurde versucht, Dihydropyrimidin-2,4-dione **158** gemäß AAV 12 und AAV 14 zu synthetisieren. Nach AAV 12 wurde das zugrunde liegende membrangebundene Dipeptoid mit *n*-Butylamin (in NMP), und β -Alaninamid (in H_2O) an Rink-Linker modifizierter Membran synthetisiert. Direkt nach Pipettieren des letzten Aminbausteins und Waschen der Membran erfolgte die Fortsetzung der Synthese gemäß AAV 14 unter Verwendung von Phenylisocyanat. HPLC-MS-analytisch wurde 20% des Rohproduktes eines SPOTs (0.23 cm^2) untersucht (Injektionsmenge: $10\ \mu\text{l}$). Im folgenden sind die analytischen Daten der Reaktionsprodukte aufgeführt:

158: RT = 7.9; ber. ($M+H^+$): 361.19; gef.: 361.1 (100), 344.1 (30), 302.0 (10), 290.1 (20).

159: RT = 6.2; ber. ($M+H^+$): 248.11; gef.: 248.0 (30), 231.0 (100), 189.0 (90).

9.3.2.8 2-(2',4'-Dioxo-3'-phenylimidazolidin-1'-yl)acetamid



151

Eine Zellulosemembran **38** (835 nmol/cm^2 nach AAV 8, Hochbeladungsprotokoll) der Größe $5\text{ x }5\text{ cm}$ wurde einer zusätzlichen Waschprozedur unterzogen [TFA (95% in H_2O), $1\text{ x }20\text{ min}$; CH_2Cl_2 , $2\text{ x }2\text{ min}$; MeOH, $1\text{ x }2\text{ min}$; Et_3N (2 Vol-% in DMF), $2\text{ x }2\text{ min}$; H_2O , $2\text{ x }2\text{ min}$; MeOH, $2\text{ x }2\text{ min}$; Et_2O , $1\text{ x }2\text{ min}$]. Anschließend wurde die Membran mit einer nach AAV 9 aktivierten Lösung des Rink-Linkers **47** getränkt (0.50 ml , abweichend von AAV 9: 0.5 M in DMF). Nach 30 Minuten wurde die Membran gewaschen (DMF, $4\text{ x }2\text{ min}$) und freie Aminogruppen durch Acetylierung blockiert [DMF/ Ac_2O /DIEA 70:10:20 (v/v)], $2\text{ x }15\text{ min}$, DMF, $2\text{ x }2\text{ min}$; MeOH, $2\text{ x }2\text{ min}$; Et_2O , $1\text{ x }2\text{ min}$). Anhand von drei SPOTs wurde nach AAV 6-B ein Derivatisierungsgrad von 581 nmol/cm^2 bestimmt. Die Membran wurde den Bedingungen einer Fmoc-Abspaltung unterzogen (Piperidin (20% in DMF), $2\text{ x }10\text{ min}$), gewaschen (DMF, $5\text{ x }2\text{ min}$; MeOH, $2\text{ x }2\text{ min}$; Et_2O , $1\text{ x }2\text{ min}$) und an der Luft getrocknet. Es folgte eine Inkubation mit einer Lösung von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**, 0.50 ml , 1 M in NMP, $1\text{ x }15\text{ min}$) und nach Entfernen des Reagenzienüberschusses (DMF, $5\text{ x }2\text{ min}$; MeOH, $2\text{ x }2\text{ min}$; Et_2O , $1\text{ x }2\text{ min}$; Trocknen an der Luft) die Behandlung mit einer wässrigen Glycinamidlösung (0.50 ml , 5 M aus 2.5 mmol Glycinamid-Hydrochlorid in 0.50 ml 4.8 M wässr. NaOH, Zusatz von 0.05% Tween[®] 20, $1\text{ x }20\text{ min}$). Überschüsse wurden erneut entfernt (H_2O , $2\text{ x }2\text{ min}$; 0.5 M wässrige NaOH, $1\text{ x }1\text{ min}$; H_2O , $5\text{ x }2\text{ min}$; MeOH, $2\text{ x }2\text{ min}$; Et_2O , $1\text{ x }2\text{ min}$) und die Membran an der Luft getrocknet. Die letzte Acylierung erfolgte durch Tränken der Membran mit einer Phenylisocyanat-Lösung (0.50 ml , 1 M in NMP, Zusatz von

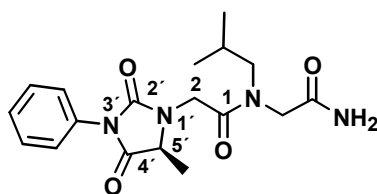
1.1 Äq. NMI, 1 x 20 min). Nach Waschen der Membran (DMF, 4 x 2 min; MeOH, 1 x 2 min; H₂O, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; CH₂Cl₂, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wurde sie getrocknet und in Streifen geschnitten (ca. 0.7 x 2.5 cm). Zur Abspaltung wurden die Membranstücke in ein 2.0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit TFA (95% in H₂O, 1.5 ml) bei 60°C inkubiert (20 min). Die Lösung wurde abpipettiert und die Membranstücke mit Acetonitril gewaschen (4 x 2 ml). Das Lösungsmittel der vereinten organischen Lösungen wurde *i. vac.* entfernt und der Rückstand in H₂O (15 ml) aufgenommen. Nach Entnahme einer Probe zur Analyse mittels HPLC-MS entfernte man das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung und erhielt das Hydantoin **151** als einen noch mit einzelnen Zellulosefasern verunreinigten farblosen Feststoff [7.1 mg (theoretische maximale Ausbeute: 3.4 mg)]. Das gesamte Rohprodukt wurde in [D₆]-DMSO gelöst, und der Überstand nach Zentrifugation (2 min, 14.000 U/min) NMR-spektroskopisch vermessen. Aus der Lösung wurden nach Entfernung des Lösungsmittels *i. vac.* und anschließender zweimaliger Gefriertrocknung aus 15 ml H₂O 3.3 mg der Titelverbindung als farbloser Feststoff gewonnen (97 %).

HPLC-MS: RT = 4.9; ber. ($M+H^+$): 234.09; gef.: 234.0 (80), 216.8 (40), 189.0 (100); (vergl. Abb. 30, Seite 108).

¹H-NMR [500 MHz, [D₆]-DMSO, überlagert von 85 Mol% NH₄⁺CF₃COO⁻: 7.13 (t, ¹J(H,N) = 51 Hz, 4H, NH₄⁺ und 7 Mol% Aceton: 2.07 (s, 6H)] δ = 3.95 (s, 2H, 2-H), 4.14 (s, 2H, 5'-H), 7.27 (br-s, 1H, CONH₂), 7.34-7.51 (m, 5H, Ar-H), 7.65 (br-s, 1H, CONH₂); (vergl. Abb. 31, Seite 108).

¹³C-NMR [126 MHz, [D₆]-DMSO, Standard-Spektrum (kein APT)] δ = 45.0 (C-5'), 50.7 (C-2), 126.5, 127.8, 128.8 und 132.2 (Ar-C), 155.8 (C-2'), 169.4 und 169.5 (C-1 und C-4').

9.3.2.9 (5'S)-N-Carbamoylmethyl-N-isobutyl-2-(5'-methyl-2',4'-dioxo-3'-phenylimidazolidin-1'-yl)-acetamid



H₃-155

Eine Zellulosemembran **38** (835 nmol/cm² nach AAV 8, Hochbeladungsprotokoll) der Größe 5 x 5 cm wurde einer zusätzlichen Waschprozedur unterzogen [TFA (95% in H₂O), 1 x 20 min; CH₂Cl₂, 2 x 2 min; MeOH, 1 x 2 min; Et₃N (2 Vol-% in DMF), 2 x 2 min; H₂O, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min]. Anschließend wurde die Membran mit einer nach AAV 9 aktivierten Lösung des Rink-Linkers **47** getränkt (0.50 ml, abweichend von AAV 9: 0.5 M in DMF). Nach 30 Minuten wurde die Membran gewaschen (DMF, 4 x 2 min) und freie Aminogruppen durch Acetylierung blockiert [DMF/Ac₂O/DIEA 70:10:20 (v/v)], 2 x 15 min, DMF, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min). Anhand von drei SPOTS wurde nach AAV 6-B ein Derivatisierungsgrad von 581 nmol/cm²

bestimmt. Die Membran wurde den Bedingungen einer Fmoc-Abspaltung unterzogen (Piperidin (20% in DMF), 2 x 10 min), gewaschen (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet. Es folgte eine Inkubation mit einer Lösung von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (**11**, 0.50 ml, 1 M in NMP, 1 x 15 min) und nach Entfernen des Reagenzienüberschusses (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min; Trocknen an der Luft) die Behandlung mit Isobutylamin (0.50 ml, 50% in NMP, 1 x 20 min). Nach Waschen der Membran (MeOH, 2 x 2 min; 0.5 M wäßrige NaOH, 1 x 1 min; H₂O, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wird die Prozedur aus Acylierung und Bromsubstitution wie oben wiederholt, allerdings in diesem Fall unter Verwendung einer wäßrigen L-Alaninamidlösung (0.50 ml, 5 M aus 2.5 mmol L-Alaninamid-Hydrochlorid in 0.50 ml 4.8 M wässr. NaOH, Zusatz von 0.05% Tween[®] 20, 1 x 20 min) zur Bromsubstitution. Überschüsse wurden erneut entfernt (H₂O, 2 x 2 min; 0.5 M wäßrige NaOH, 1 x 1 min; H₂O, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und die Membran an der Luft getrocknet. Die letzte Acylierung erfolgte durch Tränken der Membran mit einer Phenylisocyanat-Lösung (0.50 ml, 1 M in NMP, Zusatz von 1.1 Äq. NMI, 1 x 20 min). Nach Waschen der Membran (DMF, 4 x 2 min; MeOH, 1 x 2 min; H₂O, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; CH₂Cl₂, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wurde sie getrocknet und in Streifen geschnitten (ca. 0.7 x 2.5 cm). Zur Abspaltung wurden die Membranstücke in ein 2.0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit TFA (95% in H₂O, 1.5 ml) bei 60°C inkubiert (20 min). Die Lösung wurde abpipettiert und die Membranstücke mit Acetonitril gewaschen (4 x 2 ml). Das Lösungsmittel der vereinten organischen Lösungen wurde *i. vac.* entfernt und der Rückstand in H₂O (15 ml) aufgenommen. Nach Entnahme einer Probe zur Analyse mittels HPLC-MS entfernte man das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung und erhielt das Hydantoin H₃-**155** als einen noch mit einzelnen Zellulosefasern verunreinigten farblosen Feststoff [4.3 mg (theoretische maximale Ausbeute: 5.2 mg)]. Das gesamte Rohprodukt wurde in [D₆]-DMSO gelöst, und der Überstand nach Zentrifugation (2 min, 14.000 U/min) NMR-spektroskopisch vermessen. Zur Durchführung der Racemisierungsexperimente (vergl. nächster Abschnitt) wurde das Lösungsmittel *i. vac.* entfernt und der Rückstand im Anschluß zweimal aus 15 ml H₂O gefriergetrocknet.

HPLC-MS: RT = 11.4; ber. ($M+H^+$): 361.19; gef.: 360.8 (40), 343.9 (100), 230.8 (30), 203.0 (10). Das Isotopensignal bei 361.8 wies eine Intensität von 25% auf.

¹H-NMR* [500 MHz, [D₆]-DMSO, 25°C, überlagert von 61 Mol% NH₄⁺CF₃COO⁻ 7.13 (t, ¹J(H,N) = 51 Hz, 4H, NH₄⁺) und 36 Mol% Aceton: 2.08 (s, 6H)] δ = [0.81 (d, ³J = 7.2), 0.83 (d, ³J = 7.2), 0.909 (d, ³J = 7.2), 0.912 (d, ³J = 7.2) Summe der 4 Dupletts: 6H, Integralverhältnis 6:4 (0.81/0.83):(0.909/0.912), CH-(CH₃)₂], [1.38 (d, ³J = 7.2), 1.39 (d, ³J = 7.2) Summe der 2 Dupletts: 3H, 5'-CH₃], [1.81 (sept, ³J = 7.2), 1.91 (sept, ³J = 7.2) Summe der 2 Septetts: 1H, Integralverhältnis 6:4, CH-(CH₃)₂], 2.98 - 3.22 [m, 2H, CH₂-CH-(CH₃)₂], [4.20 (q, ³J = 7.2), 4.24 (q, ³J = 7.2) Summe der 2 Quartetts: 1H, 5'-H], überlagert von 3.72 - 4.53 [m, 5H, 2-H₂ und CH₂-CONH₂], 7.31 (br-s, 1H, CONH₂), 7.34-7.52 (m, 5H, Ar-H), 7.57 (br-s, 1H, CONH₂).

Bei der zusätzlichen Aufnahme von ¹H-NMR-Spektren bei 40°C und 70°C erhielt man identische Spektren, mit der Ausnahme, daß die Signale für NH₄⁺CF₃COO⁻ (7.13) und die

beiden Amid-Protonen (7.31 und 7.57) breiter wurden (6.90 - 7.30, 40°C) und schließlich zu einem sehr breiten Signal verschmolzen (6.70 - 7.28, 70°C). Eine Vereinigung der übrigen Signale der beiden Amid-Isomeren (beispielsweise der Septetts bei 1.81 und 1.91) wurde nicht beobachtet, bei 70°C trat lediglich eine Signal-Verbreiterung auf.

Durch die Aufnahme eines (*H,H*)-COSY-Spektrums konnten die Kopplungen der Signale 0.81 und 0.83 zum Signal bei 1.81 sowie der Signale bei 0.909 und 9.912 zum Signal bei 1.91 zugeordnet werden (Isopropylgruppe). Ferner wurde der Kopplungspartner der Signale bei 1.38 und 1.39 eindeutig den Signalen bei 4.20 und 4.24 zugeordnet (5'-CH₃ zu 5'-H-Kopplung). Weitere Zuordnungen waren durch die Komplexität des Spektrums aufgrund der vorliegenden Isomere nicht möglich.

¹³C-NMR* [126 MHz, [D₆]-DMSO, Standard-Messung (kein APT), Mischung von zwei *cis/trans*-Amid-Isomeren, überlagert von $\delta = 30.7$ (CH₃COCH₃): $\delta = 14.3$ und 14.6 (5'-CH₃), 19.6, 19.7, 19.9 und 20.0 (CH-(CH₃)₂), 26.4 und 26.8 (CH-(CH₃)₂), 42.2 und 42.3 (CH₂CONH₂), 48.6 und 49.6 (C-2), 54.2 und 54.5 (CH₂-CH-(CH₃)₂), 55.7 und 55.9 (C-5'), 126.4, 126.5, 127.8, 127.9, 128.8 (br), 132.0 und 132.1 (Ar-C), 155.6 und 155.8 (C-2'), 167.6 und 168.0 (C-1), 169.9, 170.0, 172.6 und 172.7 (C-4' und CONH₂).

* Die Auswertung der NMR-Spektren wurde durch das Vorliegen zweier Isomere erschwert, die auf die beiden Isomeren der *N*-Alkylamid-Bindung an C-1 zurückzuführen sind (Isomerenverhältnis 6:4 bei 25°C).

9.3.2.10 Untersuchung zur Racemisierung des Hydantoins **155** unter den Bedingungen der Cyclisierung

Das Hydantoin H₃-**155** (1.5 mg) wurde in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit [D₁]-TFA (95% in D₂O) versetzt. Man entfernte das Lösungsmittel durch Überleiten eines Stromes trockenen Stickstoffs und versetzte erneut mit [D₁]-TFA (95% in D₂O, 50 μ l). Die Lösung wurde auf 60°C erwärmt und nach 20 Minuten im Stickstoffstrom getrocknet. Man löste die Probe in [D₃]-Acetonitril (30% in D₂O) und analysierte mittels ESI-MS durch Direktinjektion.

ESI-MS (D₂-**155**): ber. ($M+Na^+$): 385.18; gef.: 385.1 (100), 344.1 (30), 230.9 (10), 203.1 (10). Das Isotopensignal bei 386.1 wies eine Intensität von 22% auf, was im Rahmen des Messfehlers der Isotopensignalintensität der Ausgangsverbindung (H₃-**155**) unter vergleichbaren Aufnahmebedingungen entspricht. Die Bedingungen der Direktinjektion bewirkten, daß hier nicht das deuterierte Produkt ($+D^+$), sondern das Natrium-Addukt als Hauptprodukt beobachtet wurde.

9.4 Bindungsstudien

9.4.1 Bestimmung der Bindung von mAk Tab-2 an Tri- und Hexapeptoid-Bibliotheken

Die zellulosegebundene Peptoid-Bibliothek wurde mit Methanol (1 x 5 min) und TBS (3 x 10 min) gewaschen. Zur Unterdrückung unspezifischer Bindung wurde mit Blockierungs-Lösung (aus 10 ml *Blocking Reagent* und 90 ml TBS, 1 h) inkubiert. Es schloß sich eine Inkubation mit mAk Tab-2 an (1 µg/ml in Blockierungs-Lösung, 100 ml, 2 h). Die Membran wurde mit TBS/0.05% Tween[®] 20 gewaschen (3 x 1 min). Gebundener Antikörper wurde durch Inkubation mit einem zweiten, Peroxidase-markierten anti-Maus IgG Antikörper nachgewiesen (1 µg/ml in Blockierungs-Lösung, 100 ml, 2 h). Nach Waschen mit TBS/0.05% Tween[®] 20 (6 x 4 min) wurde die enzymatische Aktivität unter Verwendung eines Chemolumineszenz-Substrats (*Luminescence Substrate Solution A* und *B*: 100:1, 40 ml, 1 min) mittels Chemolumineszenz am Gerät Lumilmager[™] nachgewiesen (Belichtungszeit 1-10 min je nach Signalintensität, so daß eine Aufnahme mit hohem Signal/Rausch Verhältnis zustandekommt).

9.4.2 Bestimmung von Dissoziationskonstanten mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz

Die Messung wurde nach Lit.^[154] durchgeführt. Der Fluß betrug für die Chipbeschichtung 5.0 µl/min, für die Messungen 15 µl/min (HBE-EP-Puffer, pH = 7.4).

Immobilisierung: An einem Goldchip mit Dextranbeschichtung wurden der Antikörper mAk Tab-2 [Flußzelle 2 (FC 2)] und in der Vergleichszelle der Antikörper mAk TE-33 [Flußzelle 1 (FC 1)] immobilisiert. Beide Flusszellen werden nacheinander nach dem gleichen Protokoll einzeln derivatisiert. (1) Aktivierung der Dextran-Carboxylfunktionalitäten: 7 min 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (0.2 M) und HONSu (0.05 M) in H₂O (Kit zur Aminkopplung). (2) Beschichten mit dem Antikörper: Inkubation mit einer Lösung des Antikörpers in Puffer (schrittweise in 30 sec-Schritten, bis eine Derivatisierung von etwa 5000-6000 RU erreicht ist). (3) Blocken der restlichen aktivierten Carboxylfunktionen: 7 min Ethanolamin Hydrochlorid (1 M in H₂O, pH = 8.5).

Bedingungen für mAk Tab-2: 2 min 24 sec, 50 µg/ml, NaOAc-Puffer (10 mM, pH = 5.0). Erreichte Beladung: 6083 RU.

Bedingungen für mAk TE-33: 15 min, 75 µg/ml, NaOAc-Puffer (10 mM, pH = 4.0). Erreichte Beladung: 5702 RU.

Meßbedingungen: Vor der Aufnahme jedes Meßpunktes wurde der Chip von gebundenen Proberesten durch Inkubation mit Glycin/HCl-Puffer (10 mM, pH = 2.0, 2 min) regeneriert. Jede Probe wurde in mindestens vier verschiedenen Konzentrationen in HBE-EP-Puffer (pH = 7.4) im Bereich 250 µM bis 2.0 mM angewendet und die spezifische Bindung durch Differenzbildung der Resonanzeinheiten beider Flußzellen bestimmt. Falls eine

Konzentrationsabhängigkeit der RU beobachtet wurde, wurden zusätzliche Werte durch Messungen bei Konzentrationen bis 0.20 μM aufgenommen (Die Messung der Bindung von VVSHFND-NH₂ (**112**) erfolgte im Bereich 16 nM - 4.0 μM). Die Inkubationszeit mit der Probelösung betrug jeweils 1 Minute, an die sich eine Relaxationszeit von 45 Sekunden anschloß (Im Falle von VVSHFND-NH₂: 3 min). Für alle Proben mit Ausnahme des Peptids VVSHFND-NH₂ wurde die RU im Gleichgewicht 45 Sekunden nach Injektion bestimmt (*Steady-State*-Bedingungen). Vollständige Regenerierung wurde durch Injektion von Glycin/HCl-Puffer (pH = 2.0, 30 μl) erreicht. Nach 130 Cyclen aus Injektion und Regenerierung war die Bindungskapazität des Chips noch vollständig erhalten. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm BIAevaluation durch Auftragung der RU gegen die Substratkonzentration und Berechnung der Dissoziationskonstante nach der *Steady-State*-Methode (Tab. 27). Die Genauigkeit der Werte wird durch χ^2 als statistisches Maß für den engsten Fit angegeben. Die gemessenen Werte halten den in der Literatur empfohlenen Bereich ($\chi^2 < 10$) in jedem Fall ein.^[154] Ferner wird der theoretisch maximal erwartete Resonanzwert von 40-100 RU je nach Molmasse der Peptide in keinem Experiment überschritten.

Tab. 27: Bestimmung der Bindungsaffinitäten durch Auswertung der RU unter *Steady-State*-Bedingungen.

Substanz	Meßparameter ¹⁾	K _D [μM]	χ^2
03-09-08	16-2000 μM ; 2.8-31.7 RU; 8 DP	282	0.80
03-11-09	7.8-1000 μM ; 3.9-25.2 RU; 8 DP	87.4	0.83
03-20-11	31-1000 μM ; 3.9-25.2 RU; 6 DP	225	0.25
05-16-12	6.3-2000 μM ; 1.2-4.6 RU; 4 DP	> 2000	-
104	63-2000 μM ; 3.2-18.0 RU; 6 DP	408	0.11
103	250-2000 μM ; 0.2-2.8 RU; 4 DP	> 2000	-
105²⁾	6.3-500 μM ; 2.6-14.2 RU; 5 DP	(163 ³⁾)	1.80
107	6.3-500 μM ; 0.4-3.1 RU; 5 DP	> 500	-
109	0.20-125 μM ; 3.9-38.2 RU; 10 DP	2.74	1.05
110	125-2000 μM ; 0.2-1.9 RU; 4 DP	> 2000	-
111	25-2000 μM ; 1.7-2.1 RU; 4 DP	> 2000	-

¹⁾: Konzentrationsbereich [μM]; RU-Bereich; Zahl der Datenpunkte (DP); ²⁾: Es wurde das Rohprodukt der Synthese eingesetzt (Mischung aus mindestens 6 Substanzen);

³⁾: Konzentrationsberechnung basiert auf der Molmasse von **105** [M = 889.5].

Die Dissoziationskonstante des Peptids VVSHFND-NH₂ (**112**) wurde durch die Auswertung des kinetischen Verlaufs der Assoziation und Dissoziation der Verbindungen auf der Basis von 1:1-Langmuir-Bindung ausgewertet (BIAevaluation^[154]). Genauso wurden die Daten der Messung der Verbindung **109**, die bereits unter *Steady-State*-Bedingungen berechnet wurden, kinetisch untersucht (Tab. 28).

Tab. 28: Bestimmung der Bindungsaffinitäten durch Auswertung des kinetischen Verlaufs der Assoziation und Dissoziation der Verbindungen.

Substanz	Meßparameter ¹⁾	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [µM]	χ^2
109	0.49-31 µM; 7 DP	$1.13 \cdot 10^4$	$1.55 \cdot 10^{-2}$	1.37	1.92
112	16-4000 nM; 9 DP	$1.10 \cdot 10^5$	$2.18 \cdot 10^{-3}$	0.020	1.16 ²⁾

¹⁾: Konzentrationsbereich [µM]; Zahl der Datenpunkte (DP); ²⁾: Doppelte Bestimmung.

Literaturverzeichnis

- [1] H.-D. Jakubke, **Peptide: Chemie und Biologie**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland 1996.
- [2] P.W. Latham, **Therapeutic Peptides Revisited**, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 755-757.
- [3] G.R. Marshall, **A Hierarchical Approach to Peptidomimetic Design**, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3547-3558.
- [4] A. Giannis, T. Kolter, **Peptidmimetika für Rezeptorliganden - Entdeckung, Entwicklung und medizinische Perspektiven**, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303-1326; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244-1267.
- [5] J. Gante, **Peptidomimetika - Massgeschneiderte Enzyminhibitoren**, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780-1802; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1699-1721.
- [6] M. Goodman, R. Seonggu, **Peptidomimetics for Drug Design** in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery: Principles and Practice* (Hrsg.: M.E. Wolff), John Wiley & Sons, Inc., New York, USA **1995**, 803-861.
- [7] M.J. Soth, J.S. Nowick, **Unnatural Oligomers and Unnatural Oligomer Libraries**, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 120-129.
- [8] C.Y. Cho, E.J. Moran, S.R. Cherry, J.C. Stephans, S.P.A. Fodor, C.L. Adams, A. Sundaram, J.W. Jacobs, P.G. Schultz, **An Unnatural Biopolymer**, *Science* **1993**, *261*, 1303-1305.
- [9] U. Nagai, K. Sato, R. Nakamura, R. Kato, **Bicyclic Turned Dipeptide (BTD) as a beta-Turn Mimetic - Its Design, Synthesis and Incorporation into Bioactive Peptides**, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3577-3592.
- [10] R. Hirschmann, K.C. Nicolaou, S. Pietranico, J. Salvino, E.M. Leahy, P.A. Sprengeler, G. Furst, A.B. Smith, **Nonpeptidal Peptidomimetics with a β -D-Glucose Scaffolding. A Partial Somatostatin Agonist Bearing a Close Structural Relationship to a Potent, Selective Substance P Antagonist**, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9217-9218.
- [11] R.J. Simon, R.S. Kania, R.N. Zuckermann, V.D. Huebner, D.A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C.K. Marlowe, D.C. Spellmeyer, R. Tan, A.D. Frankel, D.V. Santi, F.E. Cohen, P.A. Bartlett, **Peptoids: A Modular Approach to Drug Discovery**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9367-9371.
- [12] R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, S.B.H. Kent, W.H. Moos, **Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N-Substituted Glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis**, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646-10647.
- [13] U.K. Saha, R. Roy, **Glycosylated Peptoids as Prototypical HIV-1 Protease Inhibitors**, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7697-7700.
- [14] B. Goodson, A. Ehrhardt, S. Ng, J. Nuss, K. Johnson, M. Giedlin, R. Yamamoto, W.H. Moos, A. Krebber, M. Ladner, M.B. Giacoma, C. Vitt, J. Winter, **Characterization of Novel Antimicrobial Peptoids**, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1429-1434.
- [15] S. Ng, B. Goodson, A. Ehrhardt, W.H. Moos, M. Siani, J. Winter, **Combinatorial Discovery Process Yields Antimicrobial Peptoids**, *Bioorgan. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1781-1785.

- [16] J.A.W. Kruijtzter, L.J.F. Hofmeyer, W. Heerma, C. Versluis, R.M.J. Liskamp, **Solid Phase Synthesis of Peptoids using Fmoc-Protected N-Substituted Glycines: The Synthesis of (Retro)Peptoids of Leu-Enkephalin and Substance P**, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1570-1580.
- [17] S. Ostergaard, A. Holm, **Peptomers: A Versatile Approach for the Preparation of Diverse Combinatorial Peptidomimetic Bead Libraries**, *Mol. Divers.* **1997**, *3*, 17-27.
- [18] R.N. Zuckermann, E.J. Martin, D.C. Spellmeyer, G.B. Stauber, K.R. Shoemaker, J.M. Kerr, G.M. Figliozzi, D.A. Goff, M.A. Siani, R.J. Simon, S.C. Banville, E.G. Brown, L. Wang, L.S. Richter, W.H. Moos, **Discovery of Nanomolar Ligands for 7-Transmembrane G-Protein-Coupled Receptors from a Diverse N-(Substituted)glycine Peptoid Library**, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2678-2685.
- [19] J.A. Gibbons, A.A. Hancock, C.R. Vitt, S. Knepper, S.A. Buckner, M.E. Brune, I. Milicic, J.F. Kerwin, Jr., L.S. Richter, E.W. Taylor, K.L. Spear, R.N. Zuckermann, D.C. Spellmeyer, R.A. Braeckman, W.H. Moos, **Pharmacologic Characterization of CHIR 2279, an N-Substituted Glycine Peptoid with High-Affinity Binding for Alpha 1-Adrenoceptors**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *277*, 885-899.
- [20] G. Heizmann, P. Hildebrand, H. Tanner, S. Ketterer, A. Pansky, S. Froidevaux, C. Beglinger, A.N. Eberle, **A Combinatorial Peptoid Library for the Identification of Novel MSH and Grp/Bombesin Receptor Ligands**, *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **1999**, *19*, 449-466.
- [21] J.T. Nguyen, C.W. Turck, F.E. Cohen, R.N. Zuckermann, W.A. Lim, **Exploiting the Basis of Proline Recognition by SH3 and WW Domains: Design of N-Substituted Inhibitors**, *Science* **1998**, *282*, 2088-2092.
- [22] H. Yuasa, Y. Kamata, S. Kurono, H. Hashimoto, **Solid Phase Synthesis of Oligomannopeptoids that Mimic the Concanavalin A-Binding Trimannoside**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2139-2144.
- [23] S.M. Miller, R.J. Simon, S. Ng, R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, W.H. Moos, **Proteolytic Studies of Homologous Peptide and N-Substituted Glycine Peptoid Oligomers**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2657-2662.
- [24] Y.F. Wang, H. Lin, R. Tullman, C.F. Jewell, M.L. Weetall, F.L.S. Tse, **Absorption and Disposition of a Tripeptide and a Tetrapeptide in the Rat**, *Biopharm. Drug. Dispos.* **1999**, *20*, 69-75.
- [25] R.B. Merrifield, **Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide**, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [26] G.B. Fields, R.L. Noble, **Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids**, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [27] M.A. Gallop, R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P.A. Fodor, E.M. Gordon, **Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 1. Background and Peptide Combinatorial Libraries**, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233-1251.
- [28] E.M. Gordon, R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P.A. Fodor, M.A. Gallop, **Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies, and Future Directions**, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1385-1401.
- [29] G. Jung, A.G. Beck-Sickinger, **Methoden der multiplen Peptidsynthese und ihre Anwendungen**, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 375-391; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 367-383.
- [30] J.S. Früchtel, G. Jung, **Organische Chemie an fester Phase**, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 19-46; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 17-42.
- [31] F. Balkenhohl, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, **Kombinatorische Synthese niedermolekularer organischer Verbindungen**, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436-2488; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2288-2337.

- [32] K.S. Lam, M. Lebl, V. Krchnák, **The "One-Bead-One-Compound" Combinatorial Library Method**, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448.
- [33] M.C. Pirrung, **Spatially Addressable Combinatorial Libraries**, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 473-488.
- [34] A.R. Brown, P.H.H. Hermkens, H.C.J. Ottenheijm, D.C. Rees, **Solid Phase Synthesis**, *Synlett* **1998**, 817-827.
- [35] B.A. Bunin, **The Combinatorial Index**, Academic Press, San Diego, USA **1998**.
- [36] F.Z. Dörwald, **Organic Synthesis on Solid Phase**, Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2000**.
- [37] H.M. Geysen, R.H. Meloen, S.J. Barteling, **Use of Peptide Synthesis to Probe Viral Antigens for Epitopes to a Resolution of a Single Amino Acid**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998-4002.
- [38] R. Frank, **Simultaneous and Combinatorial Chemical Synthesis Techniques for the Generation and Screening of Molecular Diversity**, *J. Biotechnol.* **1995**, *41*, 259-272.
- [39] R. Frank, **SPOT-Synthesis: An Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support**, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217-9232.
- [40] S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, D. Solas, **Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis**, *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- [41] J. Schneider-Mergener, A. Kramer, U. Reineke, **Peptide Libraries Bound to Continuous Cellulose Membranes: Tools to Study Molecular Recognition** in *Combinatorial Libraries - Synthesis, Screening and Application Potential* (Hrsg.: R. Cortese), Walter de Gruyter, Berlin, Deutschland **1996**, 53-68.
- [42] A. Kramer, A. Schuster, U. Reineke, R. Malin, R. Volkmer-Engert, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, **Combinatorial Cellulose-Bound Peptide Libraries: Screening Tools for the Identification of Peptides that bind Ligands with Predifined Specificity**, *Methods (Comp. Meth. Enzymol.)* **1994**, *6*, 388-359.
- [43] J. Rademann, G. Jung, **Drug discovery - Integrating Combinatorial Synthesis and Bioassays**, *Science* **2000**, *287*, 1947-1948.
- [44] R. Frank, S. Hoffmann, M. Kiess, H. Lahmann, W. Tegge, C. Behn, H. Gausepohl, **Combinatorial Synthesis on Membrane Supports by the SPOT Technique: Imaging Peptide Sequence and Shape Space** in *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries* (Hrsg.: G. Jung), VCH, Weinheim, Deutschland **1996**, 363-386.
- [45] U. Reineke, A. Kramer, J. Schneider-Mergener, **Antigen Sequence- and Library-Based Mapping of Linear and Discontinuous Protein-Protein-Interaction Sites by SPOT Synthesis**, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **1999**, *243*, 23-36.
- [46] U. Reineke, A. Kramer, J. Schneider-Mergener, **Epitope Mapping with Synthetic Peptides Prepared by SPOT Synthesis** in *Antibody Engineering (Springer Lab Manual)* (Hrsg.: Kontermann, Dübel), Springer-Verlag, Frankfurt, Deutschland, *im Druck*.
- [47] H. Wenschuh, R. Volkmer-Engert, M. Schmidt, M. Schulz, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, **Coherent Membrane Supports for Microsynthesis of Bioactive Peptides**, *Biochemistry*, *im Druck*.
- [48] R. Volkmer-Engert, B. Hoffmann, J. Schneider-Mergener, **Stable Attachment of the HMB-Linker to Continuous Cellulose Membranes for Parallel Solid Phase SPOT Synthesis**, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1029-1032.
- [49] P.D. Hoeplich, B.C. Langton, J.-W. Zhang, J.P. Tam, **Identification of Immunodominant Regions of Transforming Groth Factor- α** , *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 19086-19091.

- [50] A. Kramer, E. Vakalopoulou, W.D. Schleuning, J. Schneider-Mergener, **A General Route to Fingerprint Analyses of Peptide-Antibody Interactions Using a Clustered Amino Acid Peptide Library: Comparison with a Phage Display Library**, *Mol. Immunol.* **1995**, *32*, 459-465.
- [51] R.M.J. Liskamp, **Neue Verbindungs-Bibliotheken: Pseudobiopolymere und Diversomere**, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 661-664; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 633-636.
- [52] A. Nefzi, C. Dooley, J.M. Ostresh, R.A. Houghten, **Combinatorial Chemistry: From Peptides and Peptidomimetics to Small Organic and Heterocyclic Compounds**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2273-2278.
- [53] L.A. Carpino, G.Y. Han, **The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group**, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [54] F. Albericio, L.A. Carpino, **Coupling Reagents and Activation**, *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 104-127.
- [55] R. Frank, R. Döring, **Simultaneous Multiple Peptide Synthesis Under Continuous Flow Conditions on Cellulose Paper Discs as Segmental Solid Supports**, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6031-6040.
- [56] J. Eichler, M. Beyermann, M. Bienert, **Application of Cellulose Paper as Support Material for Simultaneous Solid Phase Peptide Synthesis**, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1989**, *54*, 1746-1752.
- [57] R. Frank, H. Overwin, **SPOT Synthesis - Epitope Analysis with Arrays of Synthetic Peptides Prepared on Cellulose Membranes**, *Methods Mol. Biol.* **1996**, *66*, 149-169.
- [58] A. Kramer, J. Schneider-Mergener, **Synthesis and Screening of Peptide Libraries on Continuous Cellulose Membrane Supports**, *Methods Mol. Biol.* **1998**, *87*, 25-39.
- [59] A. Kramer, U. Reineke, L. Dong, B. Hoffmann, U. Hoffmüller, D. Winkler, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, **SPOT Synthesis - Observations and Optimizations**, *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 319-327.
- [60] H. Wenschuh, H. Gausepohl, L. Germeroth, M. Ulbricht, H. Matuschewski, A. Kramer, R. Volkmer-Engert, N. Heine, T. Ast, D. Scharn, J. Schneider-Mergener, **Positionally Addressable Parallel Synthesis on Membrane Supports** in *Combinatorial Chemistry: Practical Approach* (Hrsg.: H. Fenniri), Oxford University Press, Oxford, UK **2000**, Chapter 5.
- [61] D. Hudson, **Matrix Assisted Synthetic Transformations: A Mosaic of Diverse Contributions. II. The Pattern is Completed**, *J. Combi. Chem.* **1999**, *1*, 403-457.
- [62] B. Blankemeyer-Menge, M. Nimtz, R. Frank, **An Efficient Method for Anchoring Fmoc-Amino Acids to Hydroxyl-Functionalised Solid Supports**, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1701-1704.
- [63] I.W. James, **Linkers for Solid Phase Organic Synthesis**, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855-4946.
- [64] S. Hoffmann, R. Frank, **A New Safety-Catch Peptide-Resin Linkage for the Direct Release of Peptides into Aqueous Buffers**, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7763-7766.
- [65] G. Panke, R. Frank, **Improved Preparation of a Safety-Catch Linker for the Solid Phase Synthesis of Peptide Acids Finally Released into Aqueous Buffers**, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 17-18.
- [66] A.M. Bray, N.J. Maeji, A.J. Jhingran, R. Valerio, **Gas Phase Cleavage of Peptides from Solid Support with Ammonia Vapour. Application in Simultaneous Multiple Peptide Synthesis**, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6163-6166.
- [67] R. Frank, **Strategies and Techniques in Simultaneous Solid Phase Synthesis Based on the Segmentation of Membrane Type Supports**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 425-430.

- [68] H.M. Geysen, S.J. Rodda, T.J. Mason, G. Tribbick, P.G. Schoofs, **Strategies for Epitope Analysis Using Peptide Synthesis**, *J. Immunol. Methods* **1987**, *102*, 259-274.
- [69] R.-D. Stigler, F. Rüker, D. Katinger, G. Elliott, W. Höhne, P. Henklein, J.X. Ho, K. Keeling, D.C. Carter, E. Nugel, A. Kramer, T. Porstmann, J. Schneider-Mergener, **Interaction Between Fab Fragment Against gp41 of Human Immunodeficiency Virus 1 and its Peptide Epitope: Characterization Using a Peptide Epitope Library and Molecular Modeling**, *Protein Eng.* **1995**, *8*, 471-479.
- [70] L. Dong, J. Schneider-Mergener, A. Kramer, **A Novel Type of Amino Acid Property Matrix Based on Functional Studies of 68 Continuous Epitopes** in *Peptides 1998* (Hrsg.: S. Bajusz, F. Hudecz), Akadémiai Kiadó, Budapest, Ungarn **1999**, 530-531.
- [71] U. Reineke, J. Schneider-Mergener, R.W. Glaser, R.D. Stigler, M. Seifert, H.D. Volk, R. Sabat, **Evidence for Conformationally Different States of Interleukin-10: Binding of a Neutralizing Antibody Enhances Accessibility of a Hidden Epitope**, *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 242-248.
- [72] S. Rudiger, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, B. Bukau, **Substrate-Specificity of the DnaK Chaperone Determined by Screening Cellulose-Bound Peptide Libraries**, *EMBO J.* **1997**, *16*, 1501-1507.
- [73] N.T. Knoblauch, S. Rudiger, H.J. Schonfeld, A.J. Driessen, J. Schneider-Mergener, B. Bukau, **Substrate Specificity of the SecB Chaperone**, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 34219-34225.
- [74] G. Cestra, L. Castagnoli, L. Dente, O. Minenkova, A. Petrelli, N. Migone, U. Hoffmüller, J. Schneider-Mergener, G. Cesareni, **The SH3 Domains of Endophilin and Amphiphysin Bind to the Proline-Rich Region of Synaptojanin-1 at Distinct Sites that Display an Unconventional Binding-Specificity**, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32001-32007.
- [75] U. Hoffmüller, M. Russwurm, F. Kleinjung, J. Ashurst, H. Oschkinat, R. Volkmer-Engert, D. Koesling, J. Schneider-Mergener, **Interaktion einer PDZ-Proteindomäne mit einer synthetischen Bibliothek aller C-Termini humaner Proteine**, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2180-2184; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2000-2004.
- [76] U. Reineke, R. Sabat, A. Kramer, R.D. Stigler, M. Seifert, T. Michel, H.D. Volk, J. Schneider-Mergener, **Mapping Protein-Protein Contact Sites Using Cellulose-Bound Peptide Scans**, *Mol. Divers.* **1996**, *1*, 141-148.
- [77] M. Welschof, U. Reineke, C. Kleist, S. Kipriyanov, M. Little, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, G. Opelz, P. Terness, **The Antigen-Binding Domain of Non-Idiotypic Human Anti-F(ab')₂ Autoantibodies - Study of Their Interaction with IgG Hinge Region Epitopes**, *Hum. Immunol.* **1999**, *60*, 282-290.
- [78] U. Reineke, R. Sabat, R. Misselwitz, H. Welfle, H.D. Volk, J. Schneider-Mergener, **A Synthetic Mimic of a Discontinuous Binding-Site on Interleukin-10**, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 271-275.
- [79] O. Weiergraber, J. Schneider-Mergener, J. Grotzinger, A. Wollmer, A. Kuster, M. Exner, P.C. Heinrich, **Use of Immobilized Synthetic Peptides for the Identification of Contact Sites Between Human Interleukin-6 and Its Receptor**, *FEBS Lett.* **1996**, *379*, 122-126.
- [80] U. Reineke, R. Sabat, H.D. Volk, J. Schneider-Mergener, **Mapping of the Interleukin-10/Interleukin-10 Receptor Combining Site**, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 951-960.
- [81] C. Piossek, J. Schneider-Mergener, M. Schirner, E. Vakalopoulou, L. Germeroth, K.H. Thierauch, **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor II-Derived Peptides Inhibit VEGF**, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5612-5619.

- [82] S. Adam-Klages, D. Adam, K. Wiegmann, S. Struve, W. Kolanus, J. Schneider-Mergener, M. Kronke, **FAN, a Novel WD-Repeat Protein, Couples the p55 TNF-Receptor to Neutral Sphingomyelinase**, *Cell* **1996**, *86*, 937-947.
- [83] K. Hilpert, J. Behlke, C. Scholz, R. Misselwitz, J. Schneider-Mergener, W. Hohne, **Interaction of the Capsid Protein p24 (HIV-1) with Sequence-Derived Peptides: Influence on p24 Dimerization**, *Virology* **1999**, *254*, 6-10.
- [84] A. Kramer, R.D. Stigler, T. Knaute, B. Hoffmann, J. Schneider-Mergener, **Stepwise Transformation of a Cholera Toxin and a p24 (HIV-1) Epitope into D-Peptide Analogs**, *Protein Eng.* **1998**, *11*, 941-948.
- [85] C. Piossek, K.-H. Thierauch, J. Schneider-Mergener, L. Germeroth, **Unexpected Increase of Binding Affinity During the Transformation of a L- into a D-Peptide Inhibiting the Vascular Endothelial Growth Factor** in *Peptides 1998* (Hrsg.: S. Bajusz, F. Hudecz), Akadémiai Kiadó, Budapest, Ungarn **1999**, 618-619.
- [86] U. Hoffmüller, J. Schneider-Mergener, A. Kramer, **Transformation of a p24 (HIV1) Epitope into an Unrelated Binding Peptide** in *Peptides 1998* (Hrsg.: S. Bajusz, F. Hudecz), Akadémiai Kiadó, Budapest, Ungarn **1999**, 592-593.
- [87] U. Hoffmüller, T. Knaute, M. Hahn, W. Höhne, J. Schneider-Mergener, A. Kramer, **Evolutionary Transition Pathways for Changing Peptide Ligand Specificity and Structure**, *eingereicht*.
- [88] W. Tegge, R. Frank, F. Hofmann, W.R.G. Dostmann, **Determination of Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinase Substrate Specificity by the Use of Peptide Libraries on Cellulose Paper**, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10569-10577.
- [89] W.J. Tegge, R. Frank, **Analysis of Protein Kinase Substrate Specificity by the Use of Peptide Libraries on Cellulose Paper (SPOT-Method)**, *Methods Mol. Biol.* **1998**, *87*, 99-106.
- [90] S. Mukhija, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, B. Erni, **Identification of Peptides Inhibiting Enzyme I of the Bacterial Phosphotransferase System Using Combinatorial Cellulose-Bound Peptide Libraries**, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 433-438.
- [91] Y. Duan, R.A. Laursen, **Protease Substrate Specificity Mapping Using Membrane-Bound Peptides**, *Anal. Biochem.* **1994**, *216*, 431-438.
- [92] A. Kramer, M. Affeldt, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, **A Novel Type of Protease Cleavage Assay Based on Cellulose-Bound Libraries** in *Peptides 1998* (Hrsg.: S. Bajusz, F. Hudecz), Akadémiai Kiadó, Budapest, Ungarn **1999**, 546-547.
- [93] U. Reineke, S. Bhargava, M. Schuttkowski, C. Landgraf, L. Germeroth, G. Fischer, J. Schneider-Mergener, **Spatial Addressable Fluorescence-Quenched Peptide Libraries for the Identification and Characterisation of Protease Substrates** in *Peptides 1998* (Hrsg.: S. Bajusz, F. Hudecz), Akadémiai Kiadó, Budapest, Ungarn **1999**, 562-563.
- [94] A. Kramer, T. Keitel, K. Winkler, W. Stocklein, W. Höhne, J. Schneider-Mergener, **Molecular Basis for the Binding Promiscuity of an Anti-p24 (HIV-1) Monoclonal Antibody**, *Cell* **1997**, *91*, 799-809.
- [95] A. Kramer, R. Volkmer-Engert, R. Malin, U. Reineke, J. Schneider-Mergener, **Simultaneous Synthesis of Peptide Libraries on Single Resin and Continuous Cellulose Membrane Supports: Examples for the Identification of Protein, Metal and DNA Binding Peptide Mixtures**, *Pept. Res.* **1993**, *6*, 314-319.
- [96] R. Malin, R. Steinbrecher, J. Janssen, W. Semmler, B. Noll, B. Johannsen, C. Frömmel, W. Höhne, J. Schneider-Mergener, **Identification of Technetium-99m Binding Peptides Using Combinatorial Cellulose-Bound Peptide Libraries**, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11821-11822.

- [97] M. Reuter, J. Schneider-Mergener, D. Kupper, A. Meisel, P. Mackeldanz, D.H. Kruger, C. Schroeder, **Regions of Endonuclease EcorII Involved in DNA Target Recognition Identified by Membrane-Bound Peptide Repertoires**, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5213-5221.
- [98] S. Adler, R. Frank, A. Lanzavecchia, S. Weiss, **T Cell Epitope Analysis with Peptides Simultaneously Synthesized on Cellulose Membranes: Fine Mapping of Two DQ Dependent Epitopes**, *FEBS Lett.* **1994**, *352*, 167-170.
- [99] L. Otvos, A.M. Pease, K. Bokonyi, W. Giles-Davis, M.E. Rogers, P.A. Hintz, R. Hoffmann, H.C. Ertl, **In Situ Stimulation of a T Helper Cell Hybridoma with a Cellulose-Bound Peptide Antigen**, *J. Immunol. Methods* **2000**, *233*, 95-105.
- [100] B. Maier, M. Molinger, A.P. Cope, L. Fugger, J. Schneider-Mergener, G. Sonderstrup, T. Kamradt, A. Kramer, **Multiple Cross-Reactive Self-Ligands for Borrelia Burgdorferi-Specific HLA-DR4-Restricted T-Cells**, *Eur. J. Immunol.* **2000**, *30*, 448-457.
- [101] N. Heveker, M. Montes, L. Germeroth, A. Amara, A. Trautmann, M. Alizon, J. Schneider-Mergener, **Dissociation of the Signalling and Antiviral Properties of SDF-1-Derived Small Peptides**, *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 369-376.
- [102] K. Dietmeier, T. Lanz, T. Fischer, U. Reineke, L. Germeroth, **Matrix-Assisted High Throughput Agar Diffusion Assay for New Antibiotics**, Posterpresentation: *Microbiology*, München, Deutschland **2000**.
- [103] J.A.W. Kruijtz, R.M.J. Liskamp, **Synthesis in Solution of Peptoids Using Fmoc-Protected N-Substituted Glycines**, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6969-6972.
- [104] G.M. Figliozzi, R. Goldsmith, S.C. No, S.C. Banville, R.N. Zuckermann, **Synthesis of N-Substituted Glycine Peptoid Libraries**, *Methods Enzymol.* **1996**, *267*, 437-447.
- [105] J.M. Humphrey, A.R. Chamberlin, **Chemical Synthesis of Natural Product Peptides: Coupling Methods for the Incorporation of Noncoded Amino Acids into Peptides**, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243-2266.
- [106] T.-A. Tran, R.-H. Mattern, M. Afargan, O. Amitay, O. Ziv, B.A. Morgana, J.E. Taylor, D. Hoyer, M. Goodman, **Design, Synthesis, and Biological Activities of Potent and Selective Somatostatin Analogues Incorporating Novel Peptoid Residues**, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2679-2685.
- [107] A.M. Mouna, C. Nguyen, I. Rage, J. Xie, G. Nee, J.P. Mazaleyra, M. Wakselman, **Preparation of N-Boc N-Alkyl Glycines for Peptoid Synthesis**, *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 2429-2435.
- [108] L.S. Richter, D.C. Spellmeyer, E.J. Martin, G.M. Figliozzi, R.N. Zuckermann, **Automated Synthesis of Nonnatural Oligomer Libraries: The Peptoid Concept** in *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries* (Hrsg.: G. Jung), VCH, Weinheim, Deutschland **1996**, 387-404.
- [109] G. Heizmann, P. Hildebrand, H. Tanner, S. Ketterer, C. Beglinger, A.N. Eberle, **Peptoid and Hybrid Peptoid-Peptide Ligands for the MSH and the GRP-Preferring Bombesin Receptor Developed from a Combinatorial Peptoid Library** in *Peptides 1996* (Hrsg.: R. Ramage, R. Epton), Mayflower Scientific Ltd., Kingswinford, UK **1998**, 161-164.
- [110] T. Ast, N. Heine, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, H. Wenschuh, **Efficient Assembly of Peptomers on Continuous Surfaces**, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4317-4318.
- [111] D. Kern, M. Schutkowski, T. Drakenberg, **Rotational Barriers of cis/trans Isomerisation of Proline Analogues and Their Catalysis by Cyclophilin**, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8403-8408.
- [112] Y. Feng, G. Melacini, J.P. Taulane, M. Goodman, **Collagen-Based Structures Containing the Peptoid Residue N-Isobutylglycine (NLeu): Synthesis and Biophysical Studies of Gly-Pro-NLeu Sequences by Circular Dichroism, Ultraviolet Absorbance, and Optical Rotation**, *Biopolymers* **1996**, *39*, 859-872.

- [113] J. Kwak, E.A. Jefferson, M. Bhumralkar, M. Goodman, **Triple-Helical Stabilities of Guest-Host Collagen Mimetic Structures**, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 153-160.
- [114] P. Armand, K. Kirshenbaum, R.A. Goldsmith, S. Farr-Jones, A.E. Barron, K.T. Truong, K.A. Dill, D.F. Mierke, F.E. Cohen, R.N. Zuckermann, E.K. Bradley, **NMR Determination of the Major Solution Conformation of a Peptoid Pentamer with Chiral Side Chains**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4309-4314.
- [115] K. Kirshenbaum, A.E. Barron, R.A. Goldsmith, P. Armand, E.K. Bradley, K.T. Truong, K.A. Dill, F.E. Cohen, R.N. Zuckermann, **Sequence-Specific Polypeptoids: A Diverse Family of Heteropolymers with Stable Secondary Structure**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4303-4308.
- [116] P. Armand, K. Kirshenbaum, A. Falicov, R.L. Dunbrack, Jr., K.A. Dill, R.N. Zuckermann, F.E. Cohen, **Chiral N-Substituted Glycines can Form Stable Helical Conformations**, *Fold. Des.* **1997**, *2*, 369-375.
- [117] K. Moehle, H.J. Hofmann, **Peptides and Peptoids - A Quantum Chemical Structure Comparison**, *Biopolymers* **1996**, *38*, 781-790.
- [118] G.J. Boks, **Structure and Conformational Behaviour of Peptoid Peptidomimetics - Towards an Understanding of the Mechanism of Action of Substance P and NK1 Antagonists**, Dissertation, Dept. Med. Chem., Utrecht Inst. for Pharmaceut. Sci., University of Utrecht, Utrecht, Niederlande **1999** (<http://www.far.ruu.nl/thesis/boks/>).
- [119] E.K. Bradley, J.M. Kerr, L.S. Richter, G.M. Figliozzi, D.A. Goff, R.N. Zuckermann, D.C. Spellmeyer, J.M. Blaney, **NMR Structural Characterization of Oligo-N-Substituted Glycine Lead Compounds from a Combinatorial Library**, *Mol. Divers.* **1997**, *3*, 1-15.
- [120] H. Wenschuh, B. Hoffmann, S. Schaller, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, R. Volkmer-Engert, **Efficient Parallel Synthesis of Cellulose Bound and Cleavable Peptides via Direct Anchoring of Fmoc-Amino-Acid Fluorides onto Cellulose** in *Peptides 1998* (Hrsg.: S. Bajusz, F. Hudecz), Akadémiai Kiadó, Budapest, Ungarn **1998**, 772-773.
- [121] J. Eichler, M. Bienert, A. Stierandova, M. Lebl, **Evaluation of Cotton as a Carrier for Solid-Phase Peptide Synthesis**, *Pept. Res.* **1991**, *4*, 296-307.
- [122] T. Ast, N. Heine, H. Wenschuh, L. Germeroth, U. Reineke, J. Schneider-Mergener, **Peptomer-Synthesis on Continuous Surfaces - A Versatile Approach to Identify Novel Peptidomimetic Ligands**, Posterpresentation: *Peptido- and Proteinomimetics*, Houffalize, Belgium **1999**.
- [123] T. Ast, Dissertation, Inst. f. Molekulare Immunologie, Charité, Humboldt-Universität, Berlin, Deutschland (*in Vorbereitung*).
- [124] D. Scharn, Dissertation, Inst. f. Chemie, Humboldt Universität, Berlin, Deutschland (*in Vorbereitung*).
- [125] R.A. Zambias, D.A. Boulton, P.R. Griffin, **Microchemical Structural Determination of a Peptoid Covalently Bound to a Polymeric Bead by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry**, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4283-4286.
- [126] D. Scharn, H. Wenschuh, U. Reineke, J. Schneider-Mergener, L. Germeroth, **Spatially Addressed Synthesis of Amino- and Amino-Oxy-Substituted 1,3,5-Triazine Arrays on Polymeric Membranes**, *J. Combi. Chem.* **2000**, *2*, 361-370.
- [127] C.P. Holmes, D.G. Jones, **Reagents for Combinatorial Organic Synthesis: Development of a New o-Nitrobenzyl Photolabile Linker for Solid Phase Synthesis**, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2318-2319.
- [128] C.P. Holmes, **Model Studies for New o-Nitrobenzyl Photolabile Linkers: Substituent Effects on the Rates of Photochemical Cleavage**, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2370-2380.
- [129] V.N.R. Pillai, **Photoremovable Protecting Groups in Organic Synthesis**, *Synthesis* **1980**, 1-26.

- [130] T. Uno, E. Beausoleil, R.A. Goldsmith, B.H. Levine, R.N. Zuckermann, **New Submonomers for Poly N-Substituted Glycines (Peptoids)**, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1475-1478.
- [131] L. Kisfaludy, T. Mohacsi, M. Low, F. Drexler, **Pentafluorophenyl Acetate: A New, Highly Selective Acetylating Agent**, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 654-656.
- [132] M.J. Drysdale, M.C. Pritchard, D.C. Horwell, **Rationally Designed "Dipeptoid" Analogues of CCK. Acid Mimics of the Potent and Selective Non-Peptide CCK-B Receptor Antagonist CI-988**, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2573-2581.
- [133] I. Mir, M.T. Siddiqui, A.M. Comrie, **Antituberculosis Agent. V: alpha-[5-(5-Nitro-2-furyl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio]acetylhydrazide and Related Compounds**, *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 548-550.
- [134] D.S. Jones, P.A. Barstad, M.J. Feild, J.P. Hachmann, M.S. Hayag, K.W. Hill, G.M. Iverson, D.A. Livingston, M.S. Palanke, A.R. Tibbetts, L. Yu, S.M. Coutts, **Immunospecific Reduction of Antiligonucleotide Antibody-Forming Cells with a Tetrakis-Oligonucleotide Conjugate (LJP 394), a Therapeutic Candidate for the Treatment of Lupus Nephritis**, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2138-2144.
- [135] H. Ammann, G. Dupuis, **Synthesis of a Lactosamine-Type Trisaccharide: 6-(Bromoacetamido)-hexyl-2-O-(4-O-b-D-galactopyranosyl-2-acetamide-2-deoxy-b-D-glucopyranosyl)- α -D-mannopyranoside, Designed to Affinity Label the Leukoagglutinin Sugar Binding Site**, *Can. J. Chem.* **1988**, *68*, 1651-1655.
- [136] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C. Anfinsen, **Affinity Labeling of the Active Site of Staphylococcal Nuclease**, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 4316-4329.
- [137] W.B. Lawson, M.D. Leafer, A. Tewes, G.J.S. Rao, **Alkylation of Serine at the Active Site of Trypsin**, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1968**, *349*, 251-262.
- [138] R.D. Elliott, R.W. Brockman, J.A. Montgomery, **Reactive 5'-Substituted Thymidine Derivatives as Potential Inhibitors of Nucleotide Biosynthesis**, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1052-1056.
- [139] V.L. Korlipara, A.E. Takemori, P.S. Portoghese, **Electrophilic N-Benzylaltrindoles as δ -Opioid Receptor-Selective Antagonists**, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1337-1343.
- [140] L.A. Carpino, **1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive**, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [141] M. Hashimoto, Y. Eda, Y. Osanai, T. Iwai, S. Aoki, **A Novel Decarboxylation of Alpha-Amino Acids. A Facile Method for Decarboxylation by the use of 2-Cyclohexen-1-one as a Catalyst**, *Chem. Lett.* **1986**, 893-896.
- [142] W.M.A. Niessen, **State-Of-The-Art in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**, *J. Chromatogr.* **1999**, *856*, 179-197.
- [143] D.J. Burdick, J.T. Stults, **Analysis of Peptide Synthesis Products by Electrospray Ionization Mass Spectrometry**, *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 499-519.
- [144] M.E. Bier, J.C. Schwartz, **Electrospray-Ionization Quadrupole Ion-Trap Mass Spectrometry in Electrospray Ionization Mass Spectrometry** (Hrsg.: R.B. Cole), John Wiley & Sons, Inc., New York, USA **1997**, 235-288.
- [145] W. Heerma, C. Versluis, C.G. Dekoster, J.A.W. Kruijtzter, I. Zigrovic, R.M.J. Liskamp, **Comparing Mass Spectrometric Characteristics of Peptides and Peptoids**, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 459-464.
- [146] W. Heerma, J.P.J.L. Boon, C. Versluis, J.A.W. Kruijtzter, L.J.F. Hofmeyer, R.M.J. Liskamp, **Comparing Mass Spectrometric Characteristics of Peptides and Peptoids - 2**, *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32*, 697-704.

- [147] A.P. Krapcho, C.S. Kuell, **Mono-Protected Diamines. *N*-tert-Butoxycarbonyl- α,ω -alkanediamines from α,ω -Alkanediamines**, *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 2559-2564.
- [148] P. Huber, V. Enev, A. Linden, S. Bienz, **The Reaction of Acylsilane-Enolates with Benzaldehyde: Reaction Cascade Leading to α -Benzoyloxy- γ -hydroxysilanes**, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3749-3754.
- [149] T. Hunter, **Signaling - 2000 and Beyond**, *Cell* **2000**, *100*, 113-127.
- [150] F.I. Carroll, H.M. Dickson, M.E. Wall, **Organic Sulfur Compounds. III. Synthesis of 2-(Substituted alkylamino)ethanethiols**, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 33-38.
- [151] M. Reichmann, A.L. Harris, **Practical High Throughput Screening** in *Annual Reports in Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity; Volume 1* (Hrsg.: W.H. Moos, M.R. Pavia, B.K. Kay, A.D. Ellington), ESCOM, Leiden, Niederlande **1997**, 273-286.
- [152] L.A. Thompson, J.A. Ellman, **Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries**, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
- [153] T. Weimar, **Neue Trends bei der Verwendung von Biosensoren auf der Basis evaneszierender Wellen**, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1271-1274; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 1219-1221, und darin zitierte Literatur.
- [154] BIACORE-X, **Handbücher zum Gerät (BIAApplications Handbook 5'94; BIAevaluation Software Handbook 7'97; BIAtechnology Handbook 6'94)**, Biacore AB, Uppsala, Schweden.
- [155] B. Hoffmann, Mündliche Mitteilung, April **2000**.
- [156] C. Ivascu, **Statistische Peptid-Bibliotheken: ein neuartiges Screening nach Proteinbindungspartnern**, Diplomarbeit, Institut für Biotechnologie, Technische-Universität, Berlin, Deutschland **2000**.
- [157] R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, S.B.H. Kent, W.H. Moos, R.J. Simon, D.A. Goff, **Synthesis of *N*-Substituted Oligomers**, International Patent **1994**, Chiron Corporation, Emeryville, USA, International Publication Number: WO 94/06451.
- [158] R.N. Zuckermann, D.A. Goff, S. Ng, K. Spear, B. Scott, A.C. Sigmund, R.A. Goldsmith, C.K. Marlowe, Y. Pei, L. Richter, R. Simon, **Synthesis Of *N*-Substituted Oligomers**, United States Patent **1999**, Chiron Corporation, Emeryville, USA, Patent Number: 5,877,278 (US005877278A).
- [159] B.C. Hamper, S.A. Kolodziej, A.M. Scates, R.G. Smith, E. Cortez, **Solid Phase Synthesis of Beta-Peptoids - *N*-Substituted β -Aminopropionic Acid Oligomers**, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 708-718.
- [160] Y.B. Feng, M. Pattarawarapan, Z.C. Wang, K. Burgess, **Solid-Phase S_N2 Macrocyclization Reactions to form Beta-Turn Mimics**, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 121-124.
- [161] J. Kaválek, V. Macháček, G. Svobodová, V. Sterba, **Kinetics of Acid-Catalyzed Cyclization of Substituted Hydantoinamides to Substituted Hydantoins**, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1987**, *52*, 1999-2004.
- [162] M.-E. Kreling, A.F. McKay, **Cyclization of 1,3-Bis(beta-chloroethyl)-urea**, *Can. J. Chem.* **1959**, *37*, 504-505.
- [163] A. Nefzi, J.M. Ostresh, R.A. Houghten, **The Current Status of Heterocyclic Combinatorial Libraries**, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 449-472.
- [164] W.A. Loughlin, **Combinatorial Synthesis: A Heterocyclic Chemist's Perspective**, *Aust. J. Chem.* **1998**, *51*, 875-893.
- [165] J.W. Corbett, **Recent Progress in Solid Phase Heterocycle Syntheses - A Review**, *Org. Prep. Proced. Int.* **1998**, *30*, 489-550.

- [166] E. Ware, **The Chemistry of Hydantoins**, *Chem. Rev.* **1950**, *46*, 403-470.
- [167] C.A. Lopez, G.G. Trigo, **The Chemistry of Hydantions**, *Adv. Heterocycl. Chem.* **1985**, *38*, 177-228.
- [168] 54 Treffer bei einer Substruktursuche nach dem Hydantoin Grundgerüst unter "Pharmaceutical Agents" in: **Dictionary of Organic Compounds on CD-ROM**, Chapman & Hall, Version 4:2(a), (Hrsg.: J. Buckingham, F. Macdonald) **1997**.
- [169] S.H. DeWitt, J.S. Kiely, C.J. Stankovic, M.C. Schroeder, D.M.R. Cody, M.R. Pavia, **DIVERSOMERS: An Approach to Nonpeptide, Nonoligomeric Chemical Diversity**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6909-6913.
- [170] L.J. Wilson, M. Li, D.E. Portlock, **Solid Phase Synthesis of 1-Aminohydantoin Libraries**, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5135-5138.
- [171] S. Hanessian, R.Y. Yang, **Solution and Solid Phase Synthesis of 5-Alkoxyhydantoin Libraries with a Three-Fold Functional Diversity**, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5835-5838.
- [172] B.A. Dressman, L.A. Spangle, S.W. Kaldor, **Solid Phase Synthesis of Hydantoins Using a Carbamate Linker and a Novel Cyclization Cleavage Step**, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 937-940.
- [173] S.W. Kim, S.Y. Ahn, J.S. Koh, J.H. Lee, S. Ro, H.Y. Cho, **Solid Phase Synthesis of Hydantoin Library Using a Novel Cyclization and Traceless Cleavage Step**, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4603-4606.
- [174] J. Matthews, R.A. Rivero, **Base-Promoted Solid-Phase Synthesis of Substituted Hydantoins and Thiohydantoins**, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6090-6092.
- [175] S.H. Lee, S.H. Chung, Y.S. Lee, **Preparation of Resin-Bound Ketimines via Transimination and its Application in the Synthesis of Hydantoin Libraries**, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9469-9472.
- [176] J. Stadlwieser, E.P. Ellmerermuller, A. Tako, N. Maslouh, W. Bannwarth, **Kombinatorische Festphasensynthese strukturell komplexer Thiazolyhydantoine**, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1487-1489; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1402-1404.
- [177] A. Boeijen, J.A.W. Kruijtzter, R.M.J. Liskamp, **Combinatorial Chemistry of Hydantoins**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2375-2380.
- [178] K.H. Park, M.J. Kurth, **An Uncatalyzed Cyclo-Elimination Process for the Release of N-3-Alkylated Hydantoins from Solid-Phase: Synthesis of Novel Isoxazoloimidazolidinediones**, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5841-5844.
- [179] X.Y. Xiao, K. Ngu, C. Chao, D.V. Patel, **Selective Solid Phase Synthesis of Ureas and Hydantoins from Common Phenyl Carbamate Intermediates**, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6968-6973.
- [180] A. Nefzi, J.M. Ostresh, M. Giulianotti, R.A. Houghten, **Efficient Solid Phase Synthesis of 3,5-Disubstituted Hydantoins**, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8199-8202.
- [181] G. Bhalay, D. Cowell, N.D. Hone, M. Scobie, D. Baxter, **Multiple Solid-Phase Synthesis of Hydantoins and Thiohydantoins**, *Mol. Div.* **1998**, *3*, 195-198.
- [182] J.J. Scicinski, R.D. Barker, P.J. Murray, E.M. Jarvie, **The Solid-Phase Synthesis of a Series of Tri-Substituted Hydantoin Ligands for the Somatostatin SST5 Receptor**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3609-3614.
- [183] P.Y. Chong, P.A. Petillo, **Solid-Phase Hydantoin Synthesis - An Efficient and Direct Conversion of Fmoc-Protected Dipeptides to Hydantoins**, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2493-2496.
- [184] S.D. Wu, J.M. Janusz, **Solid-Phase Synthesis of 3-Aminohydantoin, Dihydrouracil, Thiohydantoin and Dihydrothiouracil Derivatives**, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1165-1169.

- [185] V. Macháček, G. Svobodová, V. Sterba, **Kinetics and Mechanism of Base-Catalyzed Cyclization of Substituted Amides and Nitriles of Hydantoic Acid**, *Collect. Czech. Chem. Comm.* **1987**, 52, 140-155.
- [186] E. Kleinpeter, **The Structure of Hydantoins in Solution and in the Solid-State**, *Struct. Chem.* **1997**, 8, 161-173.
- [187] A.H. Koedijkov, I.B. Blagoeva, I.G. Pojarlieff, A.J. Kirby, **The Gem-Dimethyl Effect on Reactivities in Cyclizations Through Tetrahedral Intermediates. Cyclization of Methyl-Substituted Methyl Amides of 5-(p-Nitrophenyl)hydantoic Acids**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 2479-2487.
- [188] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, **Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland **1991**.
- [189] C.P. Decicco, J.L. Seng, K.E. Kennedy, M.B. Covington, P.K. Welch, E.C. Arner, R.L. Magolda, D.J. Nelson, **Amide Surrogates of Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Urea and Sulfonamide Mimics**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2331-2336.
- [190] J.S. Davies, A.K.A. Mohammed, **Chiral Analysis of the Reaction Stages in the Edman Method for Sequencing Peptides**, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1984**, 1723-1727.
- [191] A. Boeijen, R.M.J. Liskamp, **Sequencing of Peptoid Peptidomimetics by Edman Degradation**, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 3589-3592.
- [192] A.E.P. Adang, P.H.H. Hermkens, J.T.M. Linders, H.C.J. Ottenheijm, C.J. Vanstaveren, **Case Histories of Peptidomimetics - Progression from Peptides to Drugs**, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, 113, 63-78.
- [193] A.G. Johnston, D.A. Leigh, A. Murphy, J.P. Smart, M.D. Deegan, **The Synthesis and Solubilization of Amide Macrocycles via Rotaxane Formation**, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10662-10663.
- [194] D. Feldman, D. Segal-Lew, M. Rabinovitz, **Nucleophilic Aromatic Substitution by Hydroxide Ion under Phase-Transfer Catalysis Conditions: Fluorine Displacement in Polyfluorobenzene Derivatives**, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 7350-7354.

Anhang

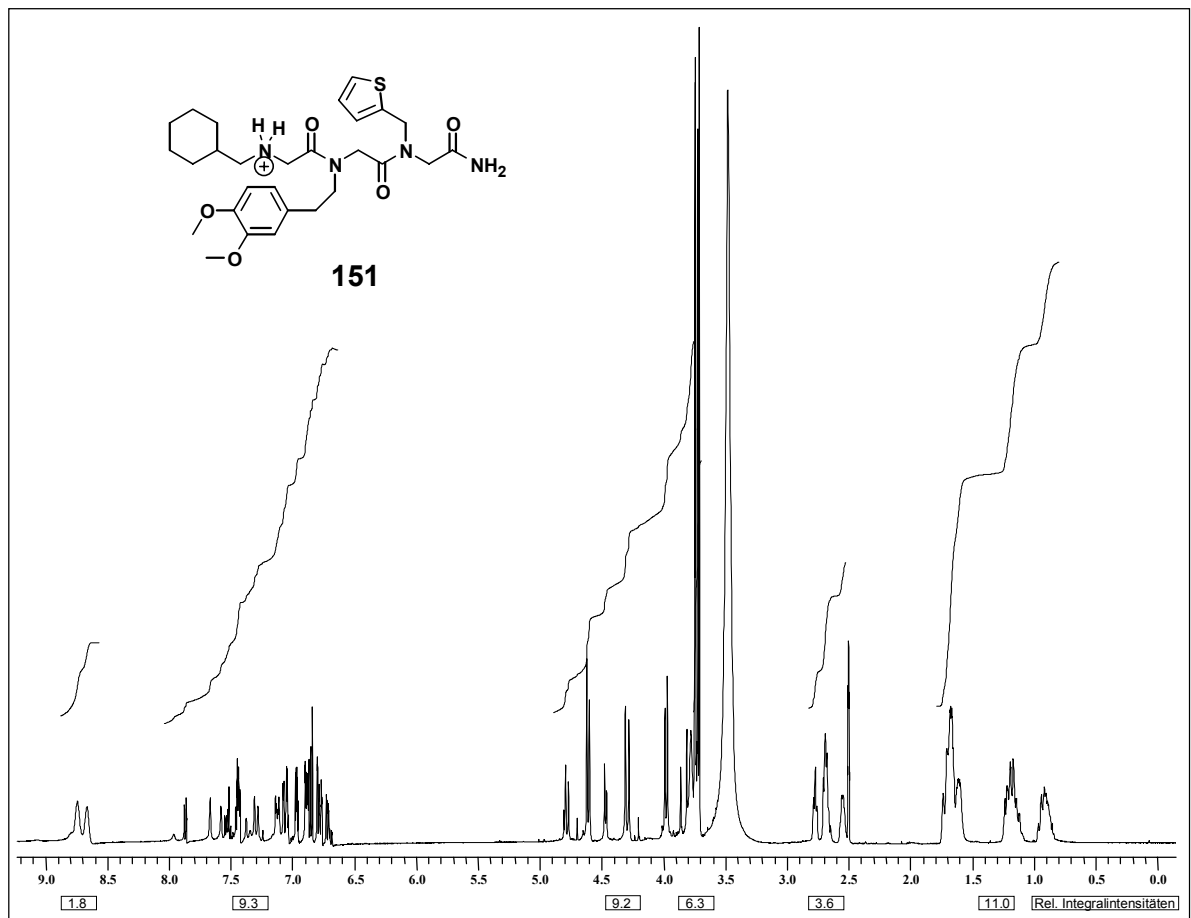


Abb. 33: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO) vom Tripeptoid **151** (Auswertung vergl. Seite 132).

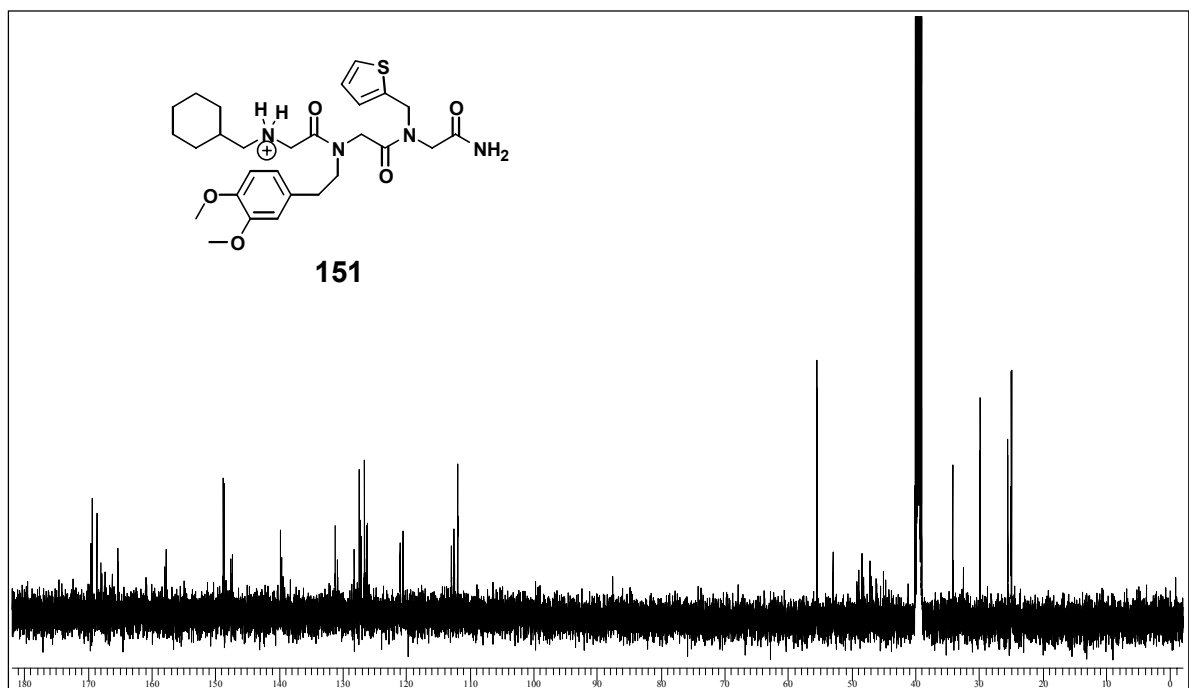


Abb. 34: $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO) vom Tripeptoid **151** (Auswertung vergl. Seite 132).

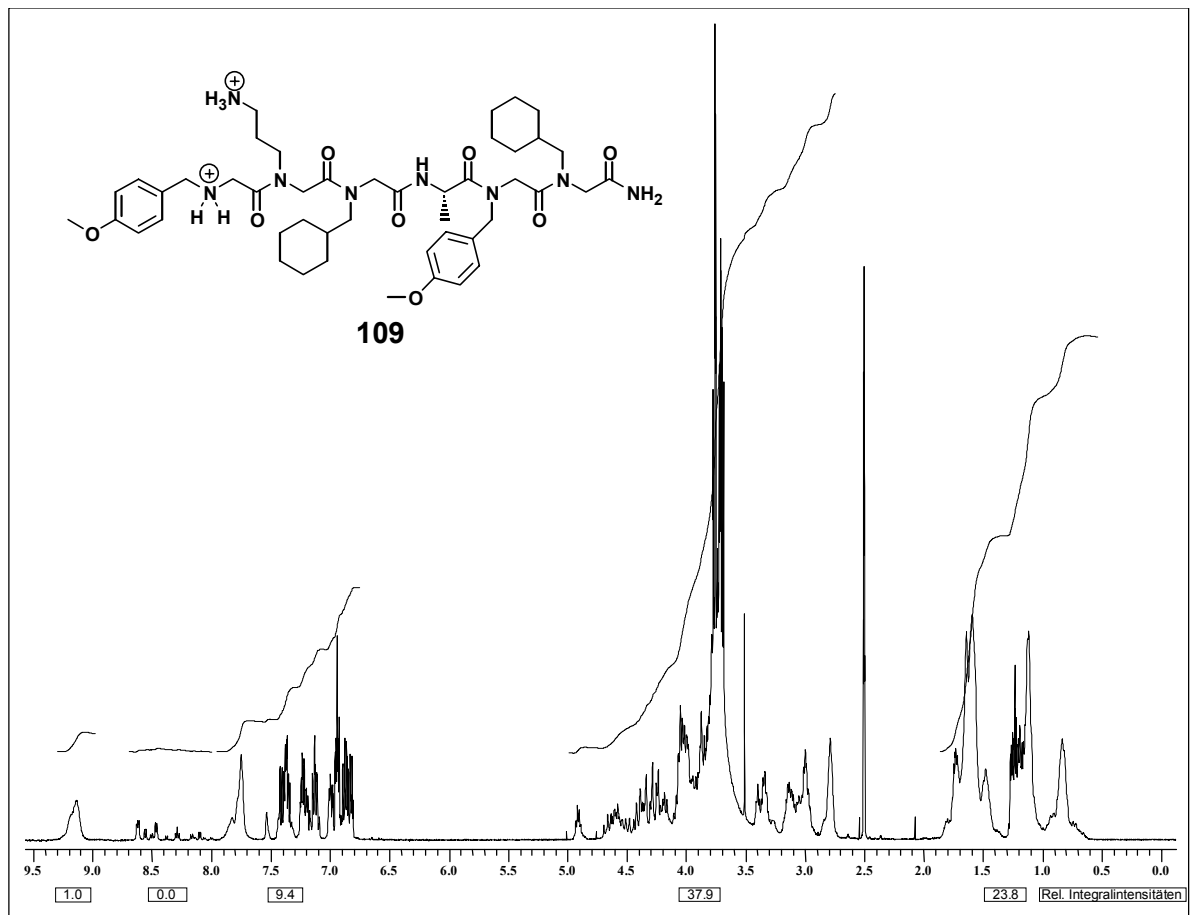


Abb. 35: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$) vom Hexapeptid **109** (Auswertung vergl. Seite 134).

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jens Schneider-Mergener danke ich für die interessante und herausfordernde Themenstellung, seine ständige Diskussionsbereitschaft, die hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie den großen Freiraum, den er mir bei der Gestaltung und Durchführung dieser Arbeit gewährte. Besonderer Dank gilt ferner Dr. Lothar Germeroth und Dr. Holger Wenschuh für die wissenschaftliche Anleitung meiner Arbeit in zahllosen Gesprächen und ihre herausragende Unterstützung. Ferner danke ich Prof. Dr. Ulrich Koert für die Betreuung der Arbeit am Institut für Chemie.

Beim Fonds der Chemischen Industrie bedanke ich mich für die Gewährung eines Kekulé-Promotionsstipendiums, sowie bei der Jerini BioTools GmbH und der ChemotopiX GmbH für die finanzielle Unterstützung.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises, insbesondere Thomas Ast, Dirk Scharn, Rudolph Volkmer-Engert, Florian Töpert, Michael Portwich, Livia Otte, Achim Kramer und Rolf Stigler, sowie den Mitarbeitern der Jerini BioTools GmbH, insbesondere Ulrich Reineke, Frank Osterkamp, Stefan Guffler, Mike Schutkowski, Ulrich Hoffmüller, Christine Piossek, Gerd Hummel und Klaus Dietmeier, möchte ich für das gute Arbeitsklima und ihre Unterstützung in zahlreichen Diskussionen danken.

Für die engagierte Unterstützung bei den präparativen Arbeiten danke ich Ulrike Beutling, Margit Schmidt, Martina Weißbach, Marion Dietze, Iris Stimming, Uta Moerke und ganz besonders Anja Rosenberg. Für die nicht minder engagierte Unterstützung bei der Messung der biochemischen Daten danke ich Berit Hoffmann, Christiane Landgraf, Maren Schlieff und Doren Kurzhals.

Auch allen hier nicht erwähnten Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schneider-Mergener und der Jerini BioTools GmbH sei für ihre Unterstützung gedankt.

Für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich bei Holger Wenschuh, Frank Osterkamp, Ulrich Reineke und Claudia Thies.

Den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen (NMR und Elementaranalyse) des Instituts für Angewandte Chemie Adlershof und des Instituts für Chemie der Humboldt-Universität danke ich für die sorgfältige Anfertigung der Analysen.

Bei meinen Eltern (ohne die mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären), meinen Brüdern Guido und Achim, meiner Großtante Dorothea und den übrigen, hier nicht erwähnten Mitgliedern meiner Familie möchte ich mich für den familiären Zusammenhalt bedanken, der mir sehr wichtig ist. Für die mir entgegengebrachte Freundschaft bedanke ich mich bei Christoph G. & Kerstin M., Frank & Sabine O. mit Paula, Thomas A., Dirk S. & Diana B., Bernd H., Marcus S., Ulf T., Anna P., Carsten R., Birte D., Silke W. und Kai M.

Mein größter Dank gehört Claudia, die mir in allen Phasen meiner Arbeit stets zur Seite stand und die mir die letzten Jahre zu einer wunderbaren Zeit – auch über große Entfernungen hinweg – gemacht hat ♥

Lebenslauf

Helge Niklas Heine
geb. am 4. August 1971 in Lübeck

Schulausbildung

- 1977 - 1981 Grundschule, Solingen und Heidesheim am Rhein
1981 - 1990 Gymnasium, Ingelheim am Rhein und Bremervörde
Mai 1990 Abitur

Hochschulausbildung

- 1991 - 1993 Grundstudium der Chemie, Universität Freiburg i. Br.
 – Diplomvorprüfung (Aug. 1993)
- 1993 - 1996 Hauptstudium der Chemie, Universität Göttingen
 – Diplomarbeit (Jan. 1995 - Feb. 1996) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr.
 H. Laatsch, Institut für Organische Chemie: *„Synthese symmetrischer (E)-3-En-1,5-diine und 1,5-Diin-3,4-diole – Untersuchungen zur Synthese von potentiell photochromen Naphtofuro[3,2-b]furanen und Bis-chinonmethiden durch doppelte Dötz-Reaktion“*
 – Diplomprüfung (Feb. 1996)
- 1997 - 2000 Promotion, Humboldt-Universität Berlin
 – Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. U. Koert, Institut für
 Chemie, durchgeführt und betreut in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr.
 J. Schneider-Mergener, Institut für Medizinische Immunologie, Charité:
 „Peptidmimetika an Zellulosemembranen – SPOT-Synthese und Screening kombinatorischer Peptoid-Bibliotheken“
 – Promotion (Juli 2000)

Sonstige Tätigkeiten

- 1990 - 1991 Zivildienst: Stiftung Ökologie und Landbau, Bad Dürkheim

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Helge Niklas Heine, geb. 04.08.1971 in Lübeck, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der darin angegebenen Hilfsmittel erstellt habe.

Berlin, 13. Juni 2000

Niklas Heine