

Hochentwickelte Aminopyrazol-Hybride gegen pathologische Prozesse der Alzheimer- Krankheit

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Marco Hellmert

geboren am 22.11.1983 in Essen

Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen

Essen, 2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2010 bis April 2014 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Schrader am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schrader

Prof. Dr. Georg Jansen

Vorsitzende: Prof. Dr. Karin Stachelscheid

Tag der Disputation: 18.12.2014

Erklärung

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

„Hochentwickelte Aminopyrazol-Hybride gegen pathologische Prozesse der Alzheimer-Krankheit“

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

Essen, August 2014

Marco Hellmert

Für meine Eltern

Danksagung

Besonders Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader möchte ich für die interessante Themenstellung und dafür danken, dass ich die Gelegenheit bekam, meine Dissertation in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Jansen für die Übernahme des Koreferates.

Frau Prof. Dr. Karin Stachelscheid danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich bei Dr. Jolanta Polkowska, Laura Krause sowie Viktor Heinrichs bedanken.

Für die präparative Mithilfe im Laufe ihrer Laborantenausbildung danke ich Miriam Deya, Bianca Münch, Christina Ridder, Joana Tewes, Dominik Brecht und Christopher Wißmanns.

Dr. Andreas Müller-Schiffmann und Prof. Dr. Carsten Korth möchte ich für die interessante Kooperation bezüglich der Antikörper- und APP-Thematik danken.

Olga Rotan vom Arbeitskreis Prof. Dr. Matthias Eple danke ich für die Durchführung der Zelltransportexperimente.

Dr. Christine Kallweit und Frau Petra Schneider vom Arbeitskreis Prof. Dr. Gebhardt Haberhauer danke ich für die Durchführung der Circular dichroismus Messungen.

Prof. Dr. Gal Bitan danke ich für die Durchführung von biologischen Tests zur Überprüfung substöchiometrischer Effekte.

Dr. Robin Roychaudhuri aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. David B. Teplow möchte ich für die Anfertigung der TEM-Aufnahmen danken.

Dr. Luitgard Nagel-Steger vom Arbeitskreis Prof. Dr. Willbold danke ich für die stetige Diskussionsbereitschaft und Hilfestellungen rund um die Proteinaggregation.

Für das sehr angenehme Klima im Arbeitskreis möchte ich mich bei Dr. Kai Bernitzki, Dr. Caroline und Dr. Marc Blecking, Dr. Som Dutt, Dr. Thomas Gersthagen, Dr. Patricia Latza, Dr. Jolanta Polkowska, Dr. Constanze Wilch, Laura Krause, Jessica Kunter, Andrea Sowislok, Elke Sprünken, Heike Wöll, Patrick Gilles, Klaus Kowski, Max Peters und Burkhard Wettig bedanken.

Dr. Wulf Engelen, Dr. Silvia Ernst, Dr. Christine Kallweit, Dr. Christina Tepper, Helma Kallweit, Petra Schneider, Abdulsalam Adam, Christof Füten und Sascha Woitschetzki vom Arbeitskreis Prof. Dr. Haberhauer danke ich für lustige und tolle Momente.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanke ich mich bei Dr. Silvia Ernst, Dr. Thomas Ufer und Laura Krause.

Klaus Kowski möchte ich für die Übernahme von logistischen Angelegenheiten sowie für interessante Unterhaltungen, in denen die Naturwissenschaften nicht unbedingt im Vordergrund waren, danken.

Jessica Kunter, Ingeborg Reiter und Elke Sprünken danke ich für die Hilfestellung bei bürokratischen und organisatorischen Angelegenheiten.

Dipl. Ing. Heinz Bandmann sowie Dr. Torsten Schaller danke ich für die Aufnahmen zahlreicher NMR-Spektren sowie deren stetige Diskussionsbereitschaft.

Heike Wöll danke ich für die Durchführung von analytischen und präparativen HPLC-Messungen sowie automatisierter Peptidfestphasensynthesen.

Für die Messungen von Massenspektren danke ich Frau Gudrun Heinrich und Herrn Dipl.-Ing. Werner Karow.

Bei Dr. Eva Zeppenfeld möchte ich mich für kompetente Hilfestellungen im Bereich der Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums und Personalratsangelegenheiten sowie für angenehme und lustige Gespräche bedanken.

Meinen Eltern danke ich für die moralische Unterstützung während meines Promotionsstudiums. Ohne sie wäre das Anfertigen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Publikationen veröffentlicht oder eingereicht:

- ◆ A. Müller-Schiffmann, J. März-Berberich, A. Andreyeva, R. Rönicke, D. Bartnik, O. Brener, J. Kutzsche, A. H. C. Horn, M. Hellmert, J. Polkowska, K. Gottmann, K. G. Reymann, S. A. Funke, L. Nagel-Steger, C. Moriscot, G. Schoehn, H. Sticht, D. Willbold, T. Schrader, C. Korth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8743.
- ◆ A. Müller-Schiffmann, J. März-Berberich, A. Andreyeva, R. Rönicke, D. Bartnik, O. Brener, J. Kutzsche, A. H. C. Horn, M. Hellmert, J. Polkowska, K. Gottmann, K. G. Reymann, S. A. Funke, L. Nagel-Steger, C. Moriscot, G. Schoehn, H. Sticht, D. Willbold, T. Schrader, C. Korth, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8925.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Poster auf folgenden Konferenzen präsentiert:

- ◆ *GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2011 „Chemie schafft Zukunft“*, Bremen, 04.-07. September **2011**.
- ◆ *Forschungstag der Medizinischen Fakultät 2011*, Essen, 25. November **2011**.
- ◆ *2nd International Symposium of the Collaborative Research Center (SFB) 765 „Multivalency in Chemistry and Biochemistry“*, Berlin, 18.-19. Oktober **2012**.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Amyloidcharakteristika	1
1.2. Morbus Alzheimer	2
1.2.1. Das Amyloid- β -Peptid und die Amyloid-Kaskaden-Hypothese	3
1.2.2. Fibrillogenese des A β -Peptids	5
1.2.3. Therapeutische Maßnahmen	7
1.2.4. Suppression der Fibrillogenese	8
1.2.5. Synthetische Liganden zur Inhibierung der A β -Aggregation	15
1.2.6. Immunotherapeutische Ansätze	18
1.2.7. β -Faltblattbrecher auf Aminopyrazolbasis	19
2. Aufgabenstellung	24
3. Durchführung und Ergebnisse	27
3.1. Aminopyrazoltrimer als β -Faltblattbrechereinheit	27
3.2. Funktionalisierung des Trimer-Bausteins für Peptidsynthesen	29
3.2.1. Zusammenfassung	32
3.3. Substöchiometrische Effekte bereits synthetisierter Liganden	34
3.3.1. Bestimmung der aktiven Konzentrationen der Liganden	35
3.3.2. Thioflavin T Experimente	37
3.3.3. CD-Messungen	43
3.3.4. PICUP-Experimente	46
3.3.5. Transmissionselektronenmikroskopie Experimente	49
3.3.6. Zusammenfassung	51
3.4. Hybridverbindungen in Kombination mit Antikörpern zur verbesserten Erkennung von A β	53

3.4.1. Synthese des Trimer-tris(NTA)-Cyclam Chelators	54
3.4.2. Biophysikalische Experimente mit dem Aminopyrazol-Chelator-Hybrid ...	64
3.4.3. Biologische Experimente des Ni ²⁺ -induzierten Trimer-Antikörper-Komplexes	66
3.4.4. Zusammenfassung.....	70
3.5. Aminopyrazol-Cyclen-Hybride als künstliche Proteasen.....	72
3.5.1. Synthese von Trimer-Cyclen Hybriden.....	74
3.5.2. Biophysikalische Experimente mit dem Trimer-Cyclen-Hybrid.....	80
3.5.3. Experiment zur Herstellung des Co ^{III} -Cyclen-Trimer-Komplexes	82
3.5.4. Zusammenfassung.....	83
3.6. Einfluss der Aminopyrazol-Hybride auf die Sekretion von APP	84
3.6.1. Synthese von Trimer-D3 und Trimer-D3-Lys über SPPS.....	84
3.6.2. Bindung von Trimer-D3 an APP und Beeinflussung der APP-CTF-Generierung	86
3.6.3. γ -Sekretase Modulierung.....	88
3.6.4. Identifizierung des APP-Fragments.....	90
3.6.5. Einfluss der Spacerlänge auf die θ -CTF-Generierung.....	91
3.6.6. Zusammenfassung.....	92
3.7. Zellgängigkeit von Aminopyrazol-Derivaten.....	94
3.7.1. Synthese fluoreszenzgelabelter Aminopyrazol-Hybride über SPPS	95
3.7.2. UV/Vis- und Fluoreszenzmessungen der gelabelten Trimer-Derivate.....	97
3.7.3. Zelltransportexperimente	99
3.7.4. Zusammenfassung.....	107
4. Zusammenfassung/Ausblick	108
5. Experimenteller Teil.....	114
5.1. Verwendete Chemikalien und Analysemethoden	114
5.1.1. Chemikalien und Lösungsmittel	114
5.1.2. Verwendete Puffer	114

5.1.3. Dünnschicht- und Säulenchromatographie	114
5.1.4. Magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR)	115
5.1.5. Massenspektrometrie	115
5.1.6. Fluoreszenzspektroskopie	115
5.1.7. UV/Vis-Spektroskopie	116
5.1.8. HPLC-Messungen	116
5.1.9. Gel-Permeations-Chromatographie-Messungen	116
5.1.10. CD-Spektroskopie	116
5.2. Funktionalisierung des Aminopyrazoltrimers	117
5.2.1. Synthese vom PMB-geschützten Aminotrimer 36	117
5.2.2. Synthese von Trimer-Säure 57	119
5.2.3. Synthese von Aminotrimer-Säure 37	121
5.2.4. Synthese von Fmoc-Trimer 35	123
5.3. Tris(NTA)-Cyclam Funktionalisierung des Aminopyrazoltrimers	125
5.3.1. Synthese von 5-Benzyl-1- <i>tert</i> -butyl-2-(bis(2-(<i>tert</i> -butoxy)-2-oxoethyl)amino)-pentandioat (50)	125
5.3.2. Synthese von 4-(Bis(2-(<i>tert</i> -butoxy)-2-oxoethyl)amino)-5-(<i>tert</i> -butoxy)-5-oxo-pentansäure (51)	127
5.3.3. Synthese von Tris(<i>t</i> Bu-NTA)-Cyclam 53	129
5.3.4. Synthese von Tris(<i>t</i> Bu-NTA)-Cyclam mit Z-geschütztem C ₆ -Spacer 59	132
5.3.5. Synthese von Tris(<i>t</i> Bu-NTA)-Cyclam mit Aminohexyl-Spacer 60	134
5.3.6. Synthese von PMB-geschütztem Trimer-tris(<i>t</i> Bu-NTA)-Cyclam 61	136
5.3.7. Synthese von entschütztem Trimer-tris(NTA)-Cyclam	138
5.3.8. Synthese des Natriumsalzes von Trimer-tris(NTA)-Cyclam 62	139
5.3.9. Synthese von Tris(<i>t</i> Bu-NTA)-Cyclam mit Z-geschütztem C ₃ -Spacer 55	141
5.3.10. Synthese von Tris(<i>t</i> Bu-NTA)-Cyclam mit Aminopropyl-Spacer 56	143
5.3.11. Synthese von Tris(<i>t</i> Bu-NTA)-Cyclam mit <i>N</i> -Fmoc-C ₁₂ -Spacer 63	145
5.3.12. Synthese von Tris(<i>t</i> Bu-NTA)-Cyclam mit Aminododecyl-Spacer 64	147

5.3.13. Synthese von entschütztem Tris(NTA)-Cyclam.....	149
5.3.14. Synthese des Natriumsalzes von Tris(NTA)-Cyclam 54	150
5.4. Cyclen-Funktionalisierung des Aminopyrazoltrimers	152
5.4.1. Synthese von Tris(<i>N</i> -Boc)-Cyclen 66	152
5.4.2. Synthese von Tris(<i>N</i> -Boc)-Cyclenmethylnitril 70	154
5.4.3. Synthese von Tris(<i>N</i> -Boc)-Cyclenpropansäuremethylester	156
5.4.4. Synthese von Tris(<i>N</i> -Boc)-Cyclenhexansäuremethylester 78	158
5.4.5. Synthese von Tris(<i>N</i> -Boc)-Cyclenhexansäure 79	160
5.4.6. Synthese von 12-Bromdodecansäuremethylester (82)	162
5.4.7. Synthese von Tris(<i>N</i> -Boc)-Cyclendodecansäuremethylester 83	164
5.4.8. Synthese von Tris(<i>N</i> -Boc)-Cyclendodecansäure 84	166
5.4.9. Synthese von PMB-geschütztem Trimer-dodecyl-tris(<i>N</i> -Boc)-Cyclen 85	168
5.4.10. Synthese von Trimer-dodecyl-Cyclen 86	171
5.4.11. Synthese von 6- <i>Z</i> -Aminohexyl- <i>p</i> -toluolsulfonat (75).....	173
5.5. Manuelle Festphasensynthese von Trimer-Peptid Derivaten	175
5.5.1. Darstellung von Trimer-D3 43	175
5.5.2. Darstellung von Trimer-D3-Lys 45	177
5.5.3. Darstellung von Trimer-D3-Dansyl 88	179
5.5.4. Darstellung von Trimer-D3-Coumarin 89	181
5.6. UV/Vis-Spektroskopie.....	183
5.7. ThT-Fluoreszenzmessungen	187
5.8. CD-Spektroskopie	189
5.9. Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen	192
6. Literaturverzeichnis.....	194

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
AD	Alzheimer Disease
AP	Aminopyrazol
APP	Amyloid Precursor Protein
BACE	<i>Beta-site APP Cleaving Enzyme</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Cystein
Cbz	Carbonylbenzyloxy-Zerwas
CD	Circulardichroismus
Cl-HOBT	6-Chloro-1-hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
D	Asparginsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DIEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Glutaminsäure
eq.	Äquivalente
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere
F	Phenylalanin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
G	Glycin
GABA	γ -Aminobutansäure
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie

H	Histidin
HCCA	α -Cyano-4-hydroxycimtsäure
HCTU	5-Chloro-1-[bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -benzotriazolium-3-oxid
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol
His	Histidin
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectroscopy</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
I	Isoleucin
IgG	Immunglobulin G
K	Lysin
L	Leucin
LG	<i>Leaving Group</i>
LiBr	Lithiumbromid
LiOH	Lithiumhydroxid
M	Methionin
mEPSC	<i>Miniature Excitatory Postsynaptic Current</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MEM	2-Methoxyethoxymethyl
MHz	Megahertz
MS	<i>Mass Spectroscopy</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Aspargin
Ni	Nickel
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
NMP	<i>N-Methylpyrrolidin</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NP	Nanopartikel
NS	NanoSight Ltd
NTA	Nitrilotriessigsäure

P	Prolin
p.a.	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDI	Polydispersitätsindex
PEI	Polyethylenimin
pl	Isoelektrischer Punkt
PICUP	<i>Photo-Induced Cross-Linking of Unmodified Proteins</i>
PMB	<i>p</i> -Methoxybenzyl
ppm	<i>parts per million</i>
PSS	Polystyrolsulfonsäure
PyClop	Chlortripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
Q	Glutamin
R	Arginin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Serin
Schmp.	Schmelzpunkt
scFv	<i>single chain variable Fragment</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
T	Threonin
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
ThT	Thioflavin T
Trt	Triphenylmethyl
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

1. Einleitung

Die Fehlfaltung von Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Krankheiten wie Alzheimer, Typ II Diabetes, Parkinson und Huntington.^[1] Die durch diese Fehlfaltungen entstehenden Ablagerungen (Plaques) akkumulieren aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit in Nervenzellen und erzeugen Durchblutungsstörungen, wodurch die Kommunikation der Zellen untereinander gestört wird.

Auf der Proteinefehlfaltung basierende neurodegenerative Krankheiten werden als Amyloidosen bezeichnet. Historisch stammt der Ausdruck „Amyloid“ aus dem Griechischen, wodurch die Ähnlichkeit der Plaques in ihrer helicalen Struktur mit dem Polysaccharid Amylose (Stärke) unterstrichen werden sollte. Den Nachweis für Ablagerungen in menschlichen Geweben erbrachte *Virchow* unter Verwendung eines Iod-Schwefelsäure-Gemisches unter Entstehung eines blauen Farbumschlages^[2,3], welcher charakteristisch für den Iod-Amylose-Komplex ist.^[4] Der spätere Einsatz des Farbstoffes Kongorot etablierte sich für den positiven Nachweis von Plaques.^[5]

1.1. Amyloidcharakteristika

Amyloide sind geradlinig sowie unverzweigt fibrillär aufgebaut und weisen einen Durchmesser von 5-10 nm auf. Die „*cross-β*“-Faltblattstruktur konnte mit Hilfe von Röntgenbeugungsexperimenten nachgewiesen werden.^[6] Der schematische Aufbau einer Amyloid-Fibrille ist in Abbildung 1 gezeigt.

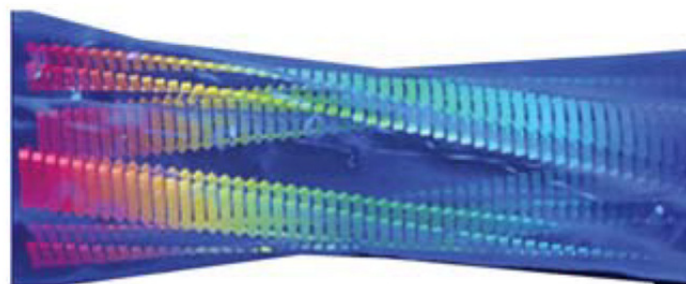


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Amyloid-Fibrille in der β -Faltblatt-Konformation.^[1]

Die „cross- β “-Faltblattstruktur wird durch die Orthogonalität der Faltblattstränge zueinander sowie die Orientierung der Wasserstoffbrückenbindungen parallel zur Fibrillenachse definiert.^[7] Die Abhängigkeit von Aggregationsprozessen zu größeren Fibrillen gegenüber vorhergehender Keimbildung konnte mit Hilfe kinetischer Messungen nachgewiesen werden.^[8] Simulationen von Fehlfaltungsprozessen zeigten, dass beitragende Proteine mehr α -helicale Fragmente in ihrer nativen Form beinhalten, wobei im pathogenen Bereich der β -Faltblattanteil dominiert.^[9] Resultierend entstehen durch Konformationsänderungen in den nativen Proteinen fehlgefaltete Intermediate, welche in wässrigen Medien instabil sind und somit die Aggregation zu β -faltblattreichen Oligomeren fördern.^[10]

1.2. Morbus Alzheimer

Die Alzheimer'sche Krankheit ist die prominenteste Form im Bereich der neurodegenerativen Krankheiten und stellt eine Art der senilen Demenz dar, welche erstmals von *Alois Alzheimer* (1864-1915) im Jahre 1906 erläutert wurde.^[11,12] In einem Alter zwischen 65 und 75 Jahren sind circa 3%, zwischen 75 und 84 Jahren ungefähr 20% und über 85 Jahren etwa 50% der Menschen an dieser Form der Altersdemenz erkrankt.^[13]

Allgemein lässt sich der Krankheitsverlauf in drei Phasen unterteilen. Anfängliche Symptome sind beispielsweise das Vergessen von kürzlich durchlebten Geschehnissen oder Namen. Nach zwei bis vier Jahren zeigt die zweite Phase Persönlichkeitsveränderungen, Orientierungs- und Konzentrationsstörungen, Stimmungsschwankungen sowie Beeinträchtigungen des Kurzzeitgedächtnisses. Letztlich kommen physische Beeinträchtigungen und das familiäre Austreten, zum Beispiel das Vergessen von Familienmitgliedern, hinzu, was nach weiteren ein bis drei Jahren schließlich zum Tod der betroffenen Person führt.^[14]

Eine sichere Diagnose der Alzheimer'schen Krankheit lässt sich nur nach dem Tod des Patienten durch Untersuchung des Gehirns erstellen. Charakteristische Merkmale sind intrazelluläre neurofibrilläre Bündel und extrazelluläre amyloide Ablagerungen. Abb. 2 zeigt schematisch gesunde Neuronen sowie pathologische Veränderungen, die durch Morbus Alzheimer hervorgerufen wurden.

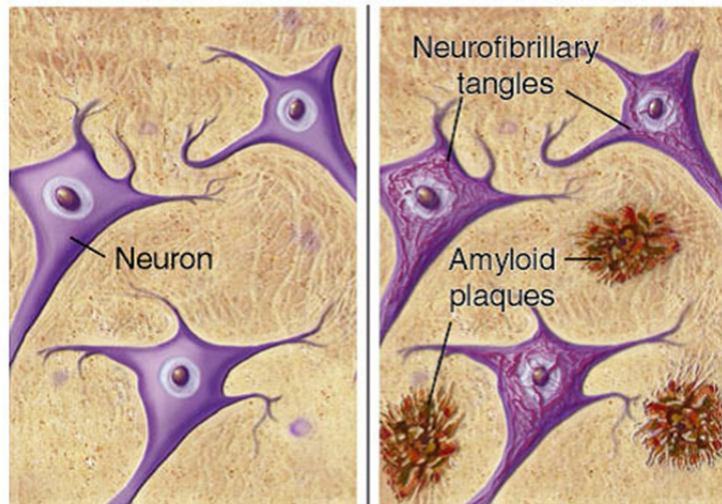


Abb. 2: Links: Gesunde Neuronen. Rechts: Neuronen mit neurofibrillären Bündeln und Plaques.^[15]

1.2.1. Das Amyloid- β -Peptid und die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Das Amyloid β -Peptid hat eine Größe von 4 kDa und entsteht durch proteolytische Spaltung des **Amyloid Precursor Proteins (APP)**, welches ein Transmembranprotein mit unbekannter Funktion ist.^[16,17] Es besitzt eine lange extrazelluläre und eine kurze intrazelluläre Einheit und enthält drei proteolytische Schnittstellen für die α -, β -, und γ -Sekretase. In Abbildung 3 ist die APP-Prozessierung schematisch dargestellt.

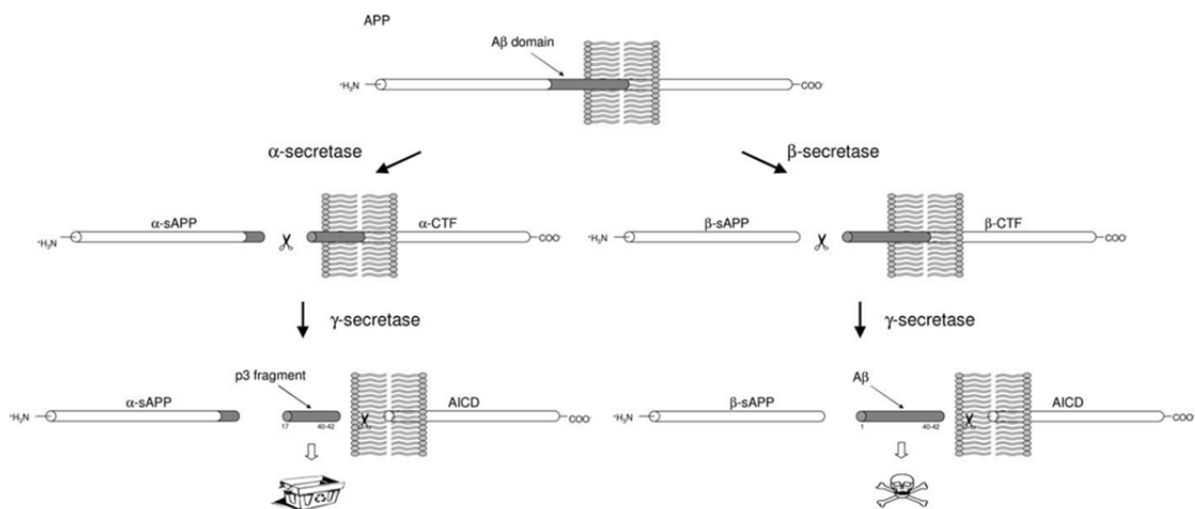


Abb.3: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung.^[18]

Über die α -Sekretase-Spaltung entsteht das lösliche sAPP- α -Fragment, welches in den extrazellulären Raum abgegeben wird sowie eine C-terminale Einheit (C83), welche aus 83 Aminosäuren besteht und in der Membran erhalten bleibt.^[19,20] Für die Sequenz des Amyloid- β -Peptids sitzen die Schnittstellen der α -Sekretase zwischen dem Lysin (16) und dem Leucin (17). Die γ -Sekretase spaltet das C83-Fragment in ein kurzes Oligopeptid (p3: A β (17-40), A β (17-42)).^[21]

Des Weiteren kann das APP über die β -Sekretase so gespalten werden, dass ein sAPP- β -Fragment und ein C-terminales Fragment (C99) gebildet wird. C99 besteht aus 99 Aminosäuren und wird schließlich über die γ -Sekretase gespalten. Letztlich wird das A β -Peptid mit unterschiedlichen Größen in Abhängigkeit von der Anzahl der Aminosäuren (zwischen 39 und 43) gebildet. Am häufigsten entstehen A β (1-40) und A β (1-42), wobei letzteres schneller Fibrillen ausbilden kann und somit die pathogenere Version der beiden A β -Proteine darstellt.^[22,23]

Die Schnittstelle für die γ -Sekretase befindet sich im hydrophoben Teil des APP. Ungewöhnlich ist allerdings, dass Wasser bei der Spaltung eine große Rolle spielt, so dass eine Schädigung der Membran vorhergehen müsste. Jedoch konnte festgestellt werden, dass A β (1-40) und A β (1-42) in gesunden Zellen ohne jegliche Beeinträchtigung der Membran generiert werden können.^[24] Es ist bekannt, dass zu circa 85% A β (1-40) und zu ungefähr 5-10% A β (1-42) im menschlichen Gehirn gebildet werden.^[15]

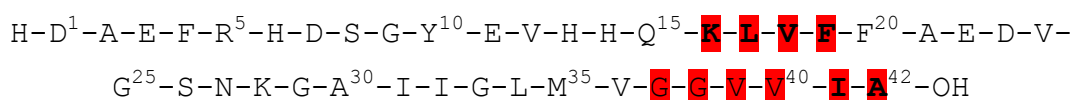


Abb. 4: Aminosäuresequenz von A β (1-42), wobei die rot unterlegten Einheiten als kritisch für die Aggregation angesehen werden.^[25]

Die Erscheinungsform von erblichen Prägungen, welche auf Mutationen innerhalb des APPs basieren, veranschaulicht die zentrale Rolle von APP in der Pathogenese der Alzheimer'schen Krankheit. Auf Grund dessen wurde die Amyloid-Kaskaden-Hypothese aufgestellt. Eine erhöhte A β -Produktion, insbesondere A β (1-42), wird durch eine umgewandelte Prozessierung des APPs verursacht. In der Aggregationsphase bilden sich Fibrillen aus und es kommt zu Ablagerungen in diffusen Plaques. Solche amyloiden Ablagerungen führen zur Schädigung von Neuronen oder

induzieren entzündliche Reaktionen, durch die Zellen in Mitleidenschaft gezogen werden. Folglich entstehen Stoffwechselstörungen sowie oxidativer Stress. Durch Hyperphosphorylierung des τ -Proteins bilden sich sogenannte neurofibrilläre Bündel, die neuronale Fehlfunktionen und folglich die Neurodegeneration auslösen, was letztlich zur Altersdemenz führt.^[19,26]

1.2.2. Fibrillogenese des A β -Peptids

Eine vollständige Aufklärung des genauen Mechanismus von monomeren A β -Peptiden bis hin zur Fibrille ist bis jetzt noch nicht bekannt.^[27] Jedoch ist bereits bekannt, dass sich Vorstufen fibrillärer Aggregate mit spezieller Struktur ausbilden.^[28,29] Solche Protofibrillen scheinen Zwischenstufen bei der Aggregation amyloidogener Peptide zu sein und wurden bei Untersuchungen von A β entdeckt.

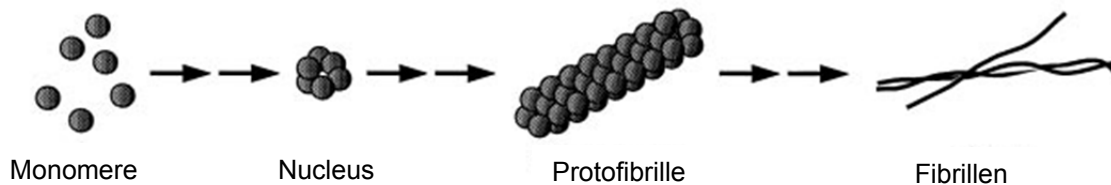


Abb. 5.: Schematische Darstellung der A β -Fibrillogenese.^[28]

Für die Fibrillenbildung von A β liegt eine Sekundärstrukturänderung zu einer β -Faltblattkonformation zugrunde. Mittels CD-Spektroskopie konnte zunächst ein ansteigender, dann jedoch wieder abnehmender Anteil einer α -helicalen Struktur gemessen werden. Es ist zudem noch bekannt, dass sich A β (1-40) in einem Gleichgewicht zwischen monomeren, dimeren, trimeren und tetrameren Einheiten befindet, während A β (1-42) sofort zu pentameren bis hexameren Zuständen aggregiert, welche als sogenannte sphärische perlenartige Paranuclei bezeichnet werden.^[30] Diese größeren Oligomere dienen als Nukleationskeime für die Bildung von Protofibrillen, welche letztlich zu den Fibrillen heranwachsen. Von großer Bedeutung für die Aggregation und die daraus folgende Fibrillenbildung ist die Sequenz A β (16-20). Einheiten dieser Sequenz sind zwar nicht fähig alleine zu aggregieren, jedoch konnte eine Fibrillenbildung mit den benachbarten Aminosäuren 14-15 und 21-23 beobachtet wer-

den.^[31] Ohne Vorhandensein dieses kritischen Sequenzabschnittes wäre A β (1-42) nicht in der Lage Fibrillen auszubilden. Es ist darauf hinzuweisen, dass die α -Sekretase das APP so zerlegt, dass die besagte kritische Sequenz in p3 nicht mehr vorhanden ist. Ebenfalls von kritischer Bedeutung ist der Sequenzabschnitt A β (17-20).^[32] In Bezug auf das oben beschriebene Modell stehen Monomereinheiten von A β im Gleichgewicht zwischen einer α -helicalen und β -Faltblattkonformation, wobei die zur Aggregation fähigen „cross- β “-Monomere aus dem Gleichgewicht entfernt werden können, was das Gleichgewicht auf die Seite der β -faltblattkonformierten Einheiten schiebt.

Da die Aggregation von A β (1-42) im Vergleich zu A β (1-40) wesentlich schneller verläuft, sind die beiden Aminosäuren des C-Terminus von A β (1-42) ebenfalls als kritisch einzustufen. Es besteht die Möglichkeit, dass durch zwei zusätzliche hydrophobe Aminosäuren die Aggregation begünstigt wird. „Cross-linking“-Studien von A β (1-42) via Photoinduktion zeigten, dass Isoleucin(41) für die Bildung der Paranuclei und Alanin(42) für die Selbstorganisation dieser Paranuclei zu größeren Oligomeren verantwortlich sein könnten.^[33]

Später wurde von *Teplow et al.* gezeigt, dass die monomere Konformation, die an der Fibrillenbildung beteiligt ist, durch den Sequenzabschnitt A β (24-28) induziert wird.^[34]

Zum Prozess der Fibrillogenese trägt die Akkumulation eines α -helicalen, oligomeren Intermediates bei, weshalb *Kirkitadze et al.* ein Modell unter Verwendung dieses Nachweises definierten.^[35] Ebenfalls auf oligomerer Ebene findet der Übergang zu einer β -Faltblattkonformation statt. Größere, unlösliche Oligomere besitzen eine β -Faltblattstruktur, wohingegen kleinere, lösliche Oligomere eine α -helicale Struktur aufweisen.^[23] Die Bildung von Fibrillen ist vermutlich entropisch abhängig von hydrophoben Kontakten zwischen drei bis sechs Protofibrillen. Mit Hilfe von Untersuchungen des Fibrillenwachstums konnte herausgefunden werden, dass ein kooperativer Prozess mit konstanter Elongationsgeschwindigkeit vonstatten geht.^[36] Ebenfalls besteht die Möglichkeit der Entstehung reifer Fibrillen aus größeren Oligomeren oder die Bildung von Protofibrillen durch Monomeraddition.^[37] Über die vorhandenen Diskussionsansätze hinaus kann gesagt werden, dass die Entwicklungsstadien von A β neurotoxische Eigenschaften besitzen.

1.2.3. Therapeutische Maßnahmen

Die Entwicklung effektiver Therapieansätze wird dadurch eingeschränkt, dass der Mechanismus der Alzheimer'schen Erkrankung auf chemischer Grundlage nicht vollständig geklärt ist. Standardisierte Behandlungsmethoden führen nur zu kurzzeitigen Hemmungen mancher Symptome. Die Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Familienmedizin (DEGAM) empfiehlt folgende Antidementiva^[38]:

- Acetylcholinesterasehemmer: Donepezil (**1**) (Aricept[®]), Galantamin (Reminyl[®]), und Rivastigmin (Exelon[®])
- *N*-Methyl-*D*-Aspartat-Rezeptor-Antagonist: Memantin (**2**) (Axura[®], Ebixa[®])

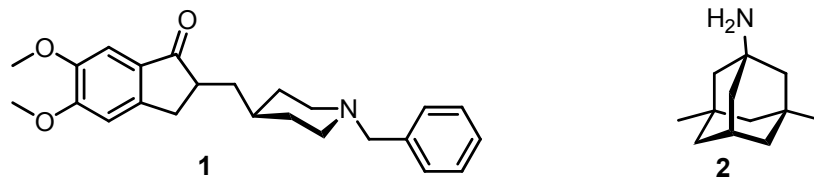


Abb. 6: Strukturen von Donepezil (1) und Memantin (2) (Stand 2008).

Im Allgemeinen zeigen die verwendeten Medikamente eine geringe Effektivität und können ebenfalls schwerwiegende Nebenwirkungen auslösen.^[39,40,41] In gegenwärtigen Therapieansätzen werden neuroprotektive Wirkstoffe^[42], antiinflammatorische Mittel^[43], Antioxidantien^[44], Metallchelatoren^[45,46,47,48] und *N*-Methyl-*D*-Aspartat-Rezeptor-Antagonisten^[49,50,51,52] eingesetzt.

Auf Grundlage der Amyloid-Kaskaden-Hypothese versuchen die meisten Therapieansätze die Amyloid-Kaskade zu beeinflussen. Es sollen die Bildung der neurotoxischen A β -Aggregate inhibiert oder schon gebildete Aggregate aufgelöst werden. Am häufigsten durchgeführte Methoden sind die A β -Immunisierung^[53,54] sowie die Inhibierung der A β -Bildung.^[55,56]

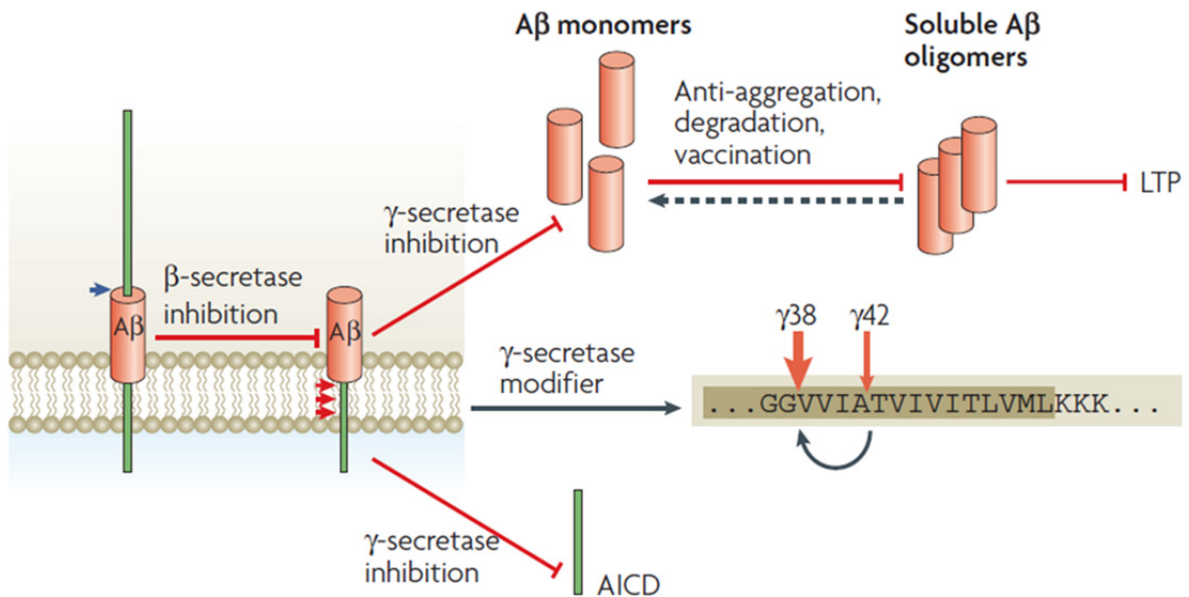


Abb. 7: Schematische Darstellung therapeutischer Ansätze im Hinblick auf die Aβ-Produktion und Oligomerisierung.^[16]

Es gibt drei Hauptansätze die Bildung des Aβ-Peptids zu verhindern, und zwar die Inhibition der β-Sekretase^[57,58,59], der γ-Sekretase^[60,61] und der Aβ-Polymerisation. Im Folgenden soll die Inhibition der Aβ-Polymerisation näher behandelt werden, da dieser Bereich für die vorliegende Thematik als Grundlage dient.

1.2.4. Suppression der Fibrillogenese

Aufgrund der Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist die Aβ-Polymerisation die grundlegende pathogene Ursache von Morbus Alzheimer. Im Gegensatz zu monomerem Aβ, das ebenfalls im gesunden Organismus gebildet wird, besitzt oligomerisierendes Aβ neurotoxische Eigenschaften, die zum Auftreten von Demenz führen. Es ist jedoch nicht ganz deutlich, ob große Fibrillen oder kleine lösliche Oligomere als neurotoxische Spezies angesehen werden sollen. Bis heute konnte noch keine direkte Relation zwischen der Anzahl der Plaques und dem Fortschreiten der Krankheit nachgewiesen werden. Aus diesem Grund stellt die Inhibition der Proteinaggregation durch kompetitive Liganden einen eventuell wichtigen therapeutischen Ansatz dar, um eine Polymerisation möglichst vollständig zu unterdrücken. Möglichkeiten sind beispielsweise der Einsatz von Reagenzien, welche die β-Faltblattstruktur destabilisieren oder durch Komplexbildung von monomerem Aβ die Bildung von Oligomeren

verhindern. Idealerweise sollte A β auf der monomeren Stufe oder auf noch nicht toxischen oligomeren Stufen stabilisiert werden. Aufgrund dessen wären Liganden, die eine Komplexierung der A β -Monomere hervorrufen im ungünstigsten Fall ungeeignet, da dies ebenfalls zur Stabilisierung von toxischen Intermediaten führen könnte und sich der Krankheitsverlauf somit verschlechtern würde.^[62]

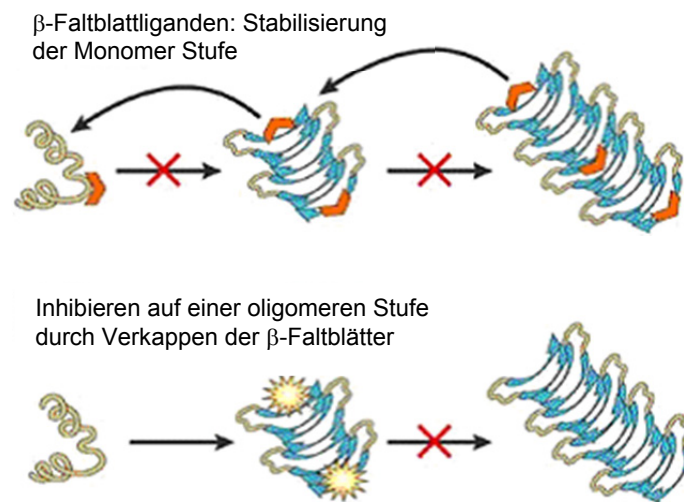


Abb. 8: Schematische Darstellung für mögliche Aggregationsinhibitoren.^[25]

Die *in vitro* Inhibierung der A β -Fibrillogenese sowie die Reduzierung der Toxizität konnten für mehrere kleine Moleküle beobachtet werden.^[62]

Die Hemmung der A β -Neurotoxizität durch den Farbstoff Kongorot (**3**) begründet sich in der Komplexierung amyloider beziehungsweise vorgeformter Fibrillen, woraus die Inhibierung der Fibrillenbildung resultiert.^[63] Ebenfalls inhibierende Wirkung zeigen Farbstoffe wie Benzofuran-Derivate^[64,65,66,67], kleine anionische Sulfonat- und Sulfat-Einheiten^[68] und arylische Sulfonamide.^[69]

Das Lepra-Medikament Rifampicin (**4**) hemmt die Aggregation des A β (1-40)-Peptids und führt ebenfalls zur Reduzierung der Neurotoxizität.^[70] Der körpereigene Wirkstoff Melatonin (**5**), welcher in der Behandlung von Schlafstörungen eingesetzt wird, zeigt ebenfalls erfreuliche Resultate.^[71,72] Clioquinol (**6**), ein Kupfer- und Zinkchelator, reduziert die Agglomeration von A β -Monomeren durch Komplexierung von Kupfer-Ionen aus dem Aggregationsprozess.^[73,74,75,76]

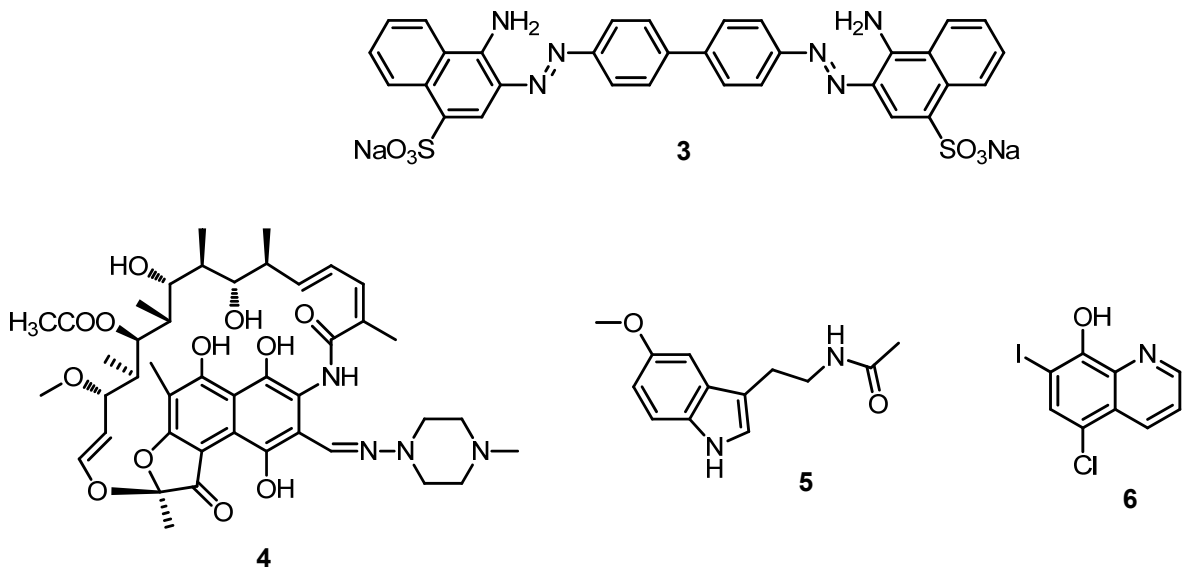


Abb. 9: Strukturen von Kongorot (3), Rifampicin (4), Melatonin (5) und Clioquinol (6).

Die Hemmung der Fibrillogenese und sogar die Auflösung von schon entstandenen Fibrillen verursachen weitestgehend aromatische Verbindungen, zum Beispiel Polyphenole und Nordihydroguaiaretische Säure.^[77,78] Das Polyphenol Tannin (7) konnte die Fibrillenbildung aufhalten, wobei der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist.^[79] Curcumin (8) und Rosmarinsäure (9) besitzen laut *Ono et al.* anti-amyloidogene Eigenschaften.^[80] Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bindet Curcumin (8) direkt an amyloide Untereinheiten und blockiert somit die Aggregation sowie die Fibrillenbildung.^[81]

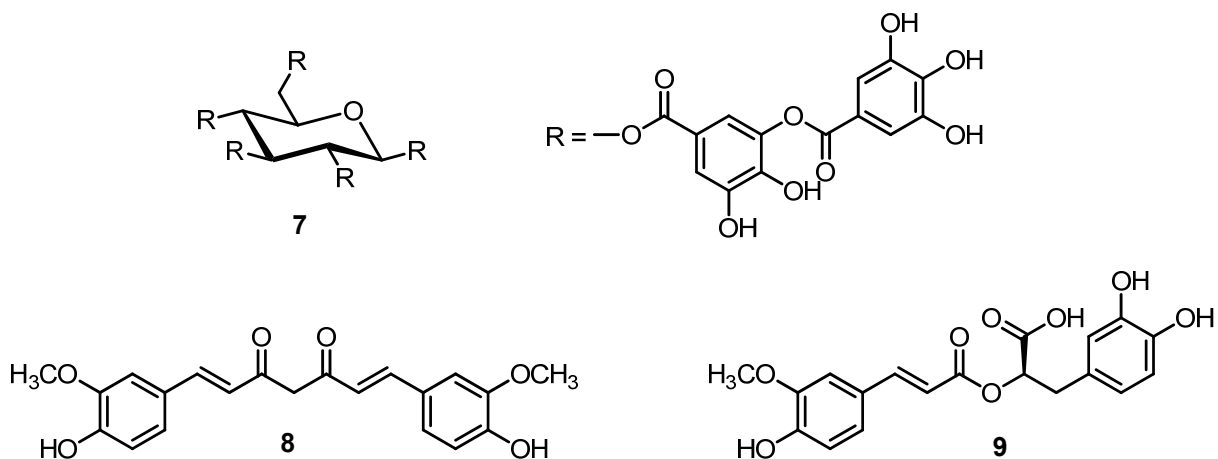


Abb. 10: Strukturen von Tannin (7), Curcumin (8) und Rosmarinsäure (9).

Jedoch zeigen manche dieser Inhibitoren unter anderem eine gewisse toxische Wirkung, einen ungeklärten Wirkmechanismus sowie eine geringfügige Spezifität.

Darauf folgend wurden peptidische Verbindungen entwickelt, welche selektiv A β binden und ebenfalls dessen Aggregation inhibieren sollen. Von *Hilbich et al.* wurde ge-

zeigt, dass ein Areal im hydrophoben Bereich um die Reste LVFF (17-20) (siehe Abb. 4) für die Entstehung von β -Faltblattstrukturen von äußerster Wichtigkeit ist.^[31]

Für den Sequenzabschnitt KLVFF (16-20) konnten *Tjernberg et al.* beobachten, dass diese Einheit ausschlaggebend für die A β -Protein-Protein-Wechselwirkung ist. Dieser Abschnitt bindet stereospezifisch unter Ausbildung einer anti-parallelen β -Faltblattstruktur an die homologe Sequenz des A β -Peptids.^[82] Für diese Stereospezifität sollen die Aminosäuren Leucin, Lysin und das C-terminale Phenylalanin verantwortlich sein.^[83]

Die Sequenz 16-21 wurde dann als Erkennungsmotiv für weitere Strategien zur Inhibierung der Aggregatbildung verwendet.

Es sollte die Erkennungssequenz mit geladenen Resten verknüpft werden, um den hydrophoben Anteil zu reduzieren.^[84,85] Eine erhöhte Oberflächenspannung diene als Antrieb für die Aggregation toxischer A β -Oligomere.^[86]

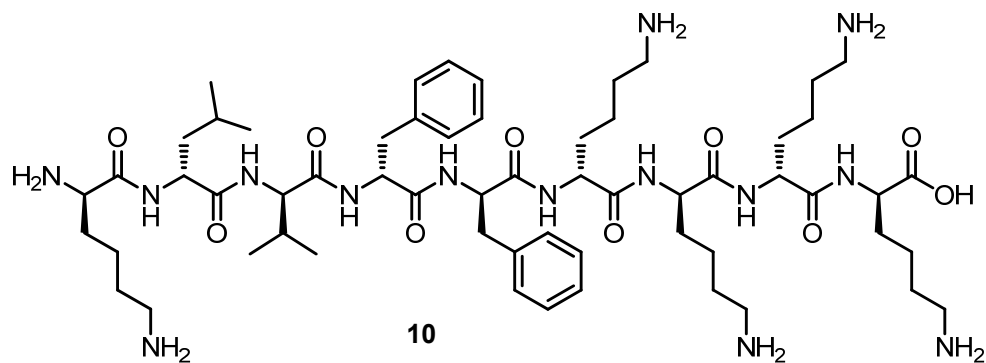


Abb. 11: Struktur von KLVFF-KKKK (10) nach *Murphy et al.*^[85]

Zum anderen wird durch das Einführen von *N*-Methyl- oder *N*-Alkyl-Gruppen die Ausbildung von Wasserstoff-Wasserstoff-Brückenbindungen auf einer Bindungsseite blockiert.^[87]

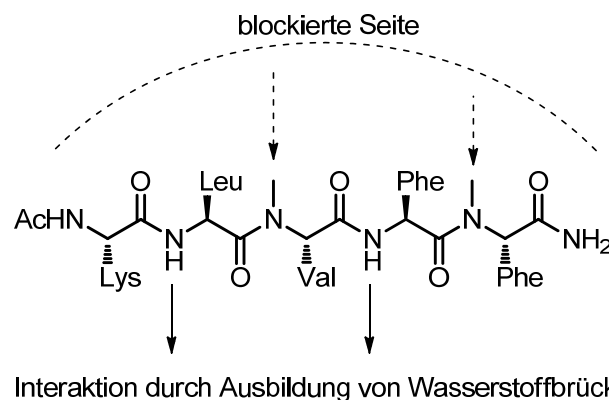


Abb. 12: Blockierung eines Peptidrückgrats durch *N*-Methylaminosäuren.^[87]

Durch Einführen sperriger Gruppen soll die Kommunikation mit weiteren Faltblattsträngen unterdrückt werden.^[88]

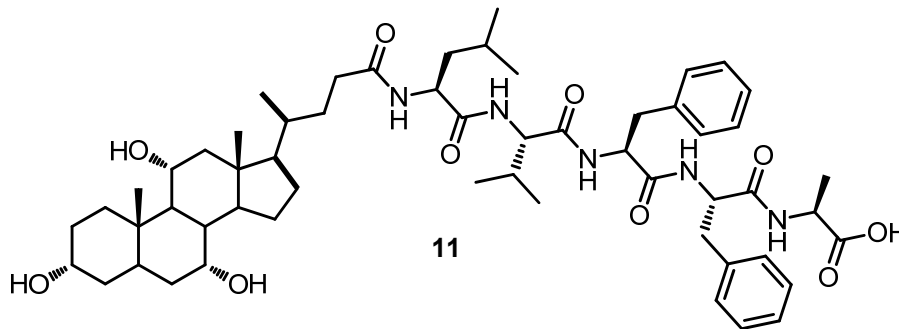


Abb. 13: Ein Beispielpeptid Choly-LVFFA-OH 11 nach *Findeis et al.*^[88]

Über die Einführung der Aminosäure Prolin wird die β -Faltblattstruktur des A β -Peptids destabilisiert, da die ringförmige Geometrie der sekundären Aminosäure einen Knick in der Struktur bewirkt.^[89]

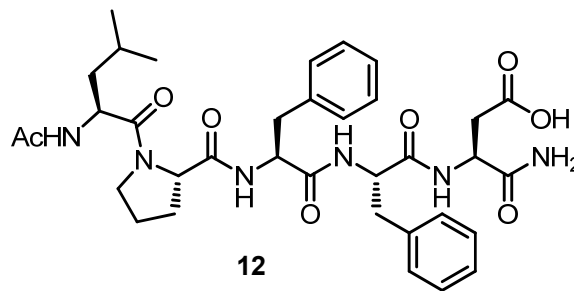


Abb. 14: Nach *Soto et al.* modifiziertes Peptid 12.^[89]

Die oben aufgezeigten Verbindungen neigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu inhibierenden und disaggregierenden Wirkungen, jedoch werden diese durch ihre Eigenschaft selbst Fibrillen auszubilden und aufgrund ihrer Größe eingeschränkt.

Die Verbindung Tramiprosat (**13**) besitzt anti-amyloidogene Eigenschaften. Lösliche A β -Monomere sollen durch diese Substanz gebunden werden und somit die Ablagerung von Plaques verhindern.^[90]

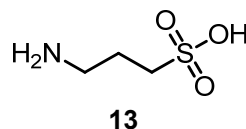


Abb. 15: Struktur von Tramiprosat (13).

Wiesehan et al. konnten beobachten, dass sogenannte *D*-Peptide über Phagen-Display-Verfahren spezifisch an das A β -Peptid binden.^[91,92,93]

Bartnik et al. identifizierten 2 *D*-Peptide über Spiegelbild-Phagen-Display-Selektion.^[94] Das D1-Peptid (oben) zeigte hohe Affinität gegenüber der A β -Aggregation im submikromolaren Bereich der Bindungskonstante. Ebenfalls konnte keine Interaktion mit fibrillären Strukturen gezeigt werden. Das D3-Peptid (unten) beeinflusst die A β -Aggregation und setzt dessen Zelltoxizität herab. *In vivo* konnten Plaques und Entzündungsprozesse im Gehirn transgener Mäuse reduziert werden. Abb. 16 zeigt die Strukturen der beiden *D*-Peptide.^[95,96,97]

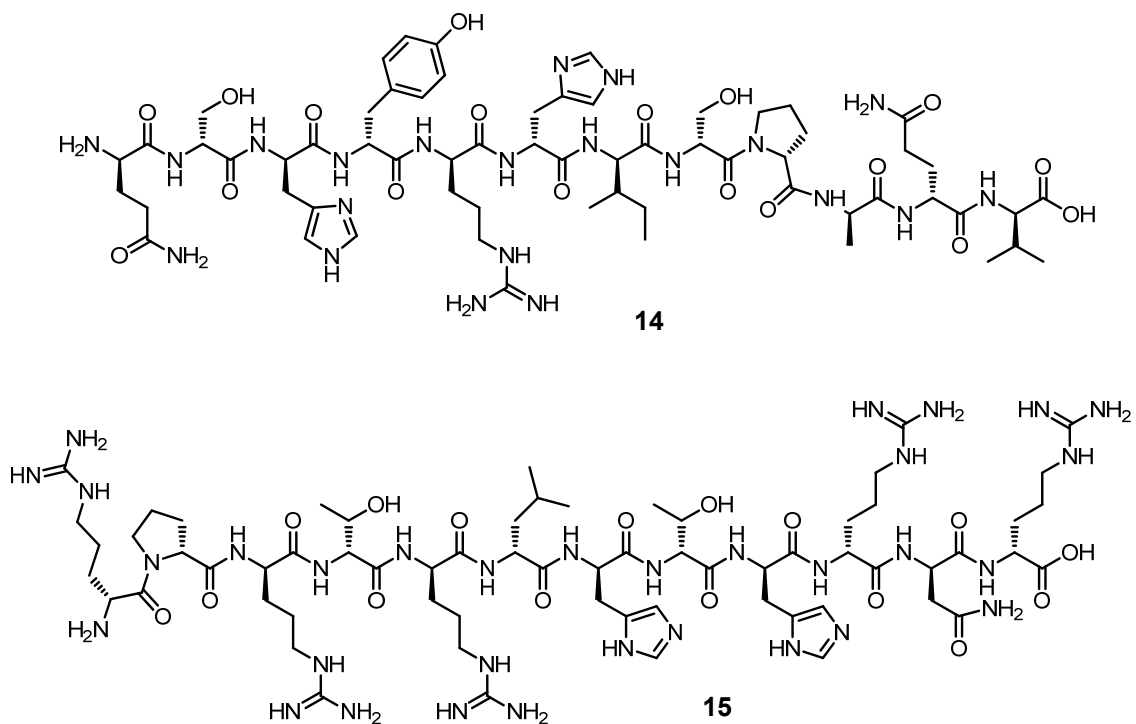


Abb. 16: Strukturen des D1-Peptids 14 (oben) und des D3-Peptids 15 (unten).

A β (1-42)-Monomere oligomerisieren zu toxischen Pentameren beziehungsweise Hexameren (Paranuclei), welche mit sich selbst interagieren und daraus folgend größere Oligomere bilden. Dies zeigten *Bitan et al.*, A β (1-40) bildet diese Oligomere nicht, was erklären könnte, warum A β (1-42) die pathogenere Variante ist. Die Bildung der Paranuclei wurde durch eine gezielte Oxidation des Methionins (35) am A β (1-42)-Peptid verhindert, wodurch Oligomere entstanden, die in ihrer Beschaffenheit sowie ihrer Größe nicht von denen des A β (1-40)-Peptids differenziert werden konnten.^[98]

Derzeit sind jedoch wenige strukturelle Aufklärungen in Bezug auf die Inhibitor-A β -Peptid-Wechselwirkung bekannt. *Sato et al.* veröffentlichten strukturelle Angaben in Bezug auf eine solche Interaktion.^[99]

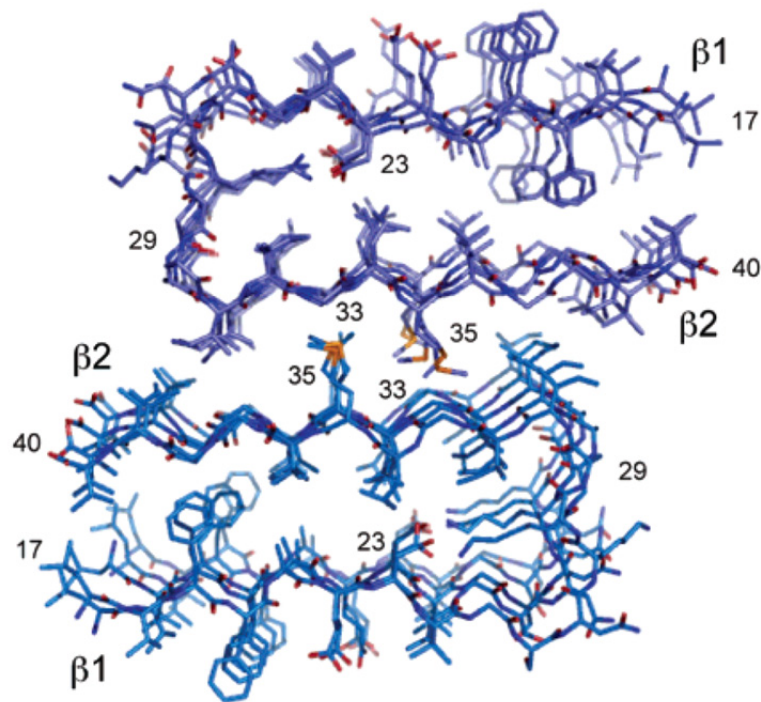


Abb. 17: Strukturmodell der A β (1-40)-Fibrillen nach Sato *et al.*^[99]

Amyloide Fibrillen in der β -Faltblattstruktur besitzen eine gewellte Oberfläche.^[100,101] Aufgrund dieser Strukturbegebenheit entwickelten Sato *et al.* eine neue Klasse von Inhibitoren. Sie konnten mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie erkennen, dass eine räumliche Beziehung zwischen Glycin (33) und Methionin (35) im C-terminalen Areal in gegenüberliegenden Fibrillen des A β (1-40)-Peptids besteht. Im Vergleich dazu sind es die Positionen 35 und 37 für Methionin und Glycin im A β (1-42)-Peptid.

Es wurden verschiedene Peptidsequenzen entwickelt, welche in jeder zweiten Sequenz abwechselnd eine Glycin- und eine Phenylalanin-Einheit besitzen (G-(AS)-F-(AS)-G-(AS)-F, wobei (AS) für eine beliebige Aminosäure steht). Die Bildung von Fibrillen kann so inhibiert und die Anlagerung weiterer β -Faltblätter verhindert werden. In dieser peptidischen Sequenz wurden die abwechselnden Aminosäuren so gewählt, dass diese mit dem Motiv I-(AS)-G-(AS)-M-(AS)-G, welches dem C-terminalen Bereich 31-37 im A β (1-40) beziehungsweise A β (1-42) entspricht, korrespondieren. Mit Hilfe dieser Inhibitoren konnte *in vitro* die Toxizität erheblich gesenkt werden (Beispiel Abb. 18).

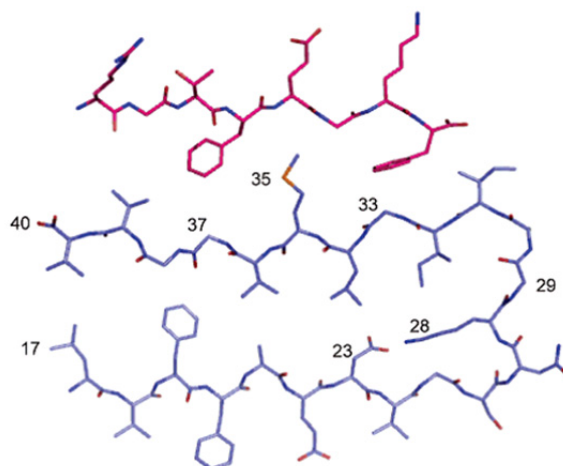


Abb. 18: Festkörper-NMR-Struktur des Liganden $\text{H}_3\text{N}^+\text{-RGTFEGKF-CONH}_2$, gebunden an das $\text{A}\beta(1\text{-}40)\text{-Monomer}$.^[99]

1.2.5. Synthetische Liganden zur Inhibierung der $\text{A}\beta$ -Aggregation

Frydman-Marom et al. entwickelten *D*-Trp-Aib (**16**) als neuen Liganden, welcher einen erfolgversprechenden Inhibitor darstellt, der die Entstehung toxischer $\text{A}\beta$ -Oligomere eingrenzt.^[102]

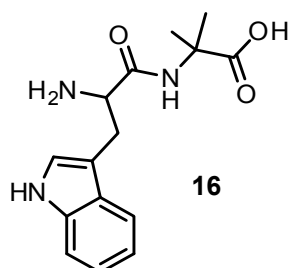


Abb. 19: Struktur von *D*-Trp-Aib (**16**) nach *Frydman-Marom et al.*.^[102]

Die spezifische Wirkung resultiert einerseits aus der aromatischen Wechselwirkung zwischen Tryptophan und den Phenylalaninen an den Sequenzabschnitten 19 bis 20 im $\text{A}\beta$ -Peptid und andererseits aus der Rolle der Aminoisobutansäure als Auflöser von β -Faltblättern. In Tierversuchen konnten mit dieser Verbindung amyloide Plaques im Gehirn von Mäusen erheblich verringert und kognitive Eigenschaften verbessert werden.

Sinha et al. berichteten über eine Lysin-spezifische molekulare Pinzette, ausgestattet mit zwei Phosphat-Einheiten, welche die Fähigkeit besitzt, sowohl die Aggregation als auch die Toxizität des $\text{A}\beta$ -Peptids über die Bindung an Lysin-Reste zu inhibieren. Abb. 20 zeigt die Struktur der symmetrischen Diphosphat-Pinzette **17**.^[103]

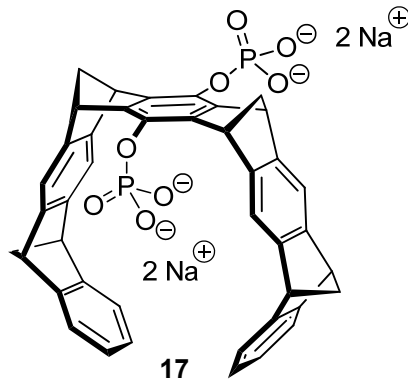


Abb. 20: Struktur der molekularen Pinzette **17** nach *Sinha et al.*^[103]

Die Bindung der Pinzette an die Lysin-Reste konnte mit massenspektrometrischen Untersuchungen sowie Festkörper-NMR nachgewiesen werden.

Eine weitere interessante Verbindung für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen die Alzheimer'sche Krankheit ist das Epigallocatechin-3-gallat (**18**, EGCG). Über NMR-spektroskopische Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass EGCG (**18**) mit dem aromatisch-hydrophoben Kern von A β wechselwirkt und dabei die Neurotoxizität herabsetzt sowie die strukturelle Information verändert. Abb. 21 zeigt die Struktur von EGCG (**18**).^[104,105]

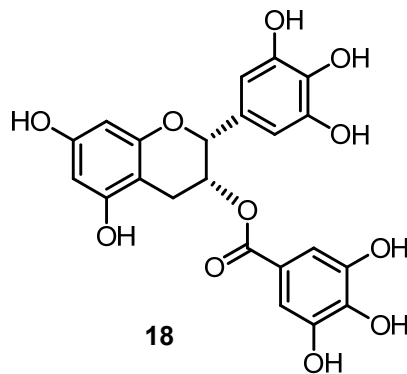


Abb. 21: Strukturformel der Verbindung EGCG (**18**).^[104]

Froestl et al. stellten eine Zusammenfassung von Inhibitoren vor, die sich momentan zum Teil in verschiedenen klinischen Tests befinden.^[106] Abb. 22 zeigt drei vielversprechende Wirkstoffe mit ihrer aktuellen klinischen Phase, die mit A β in Interagieren.

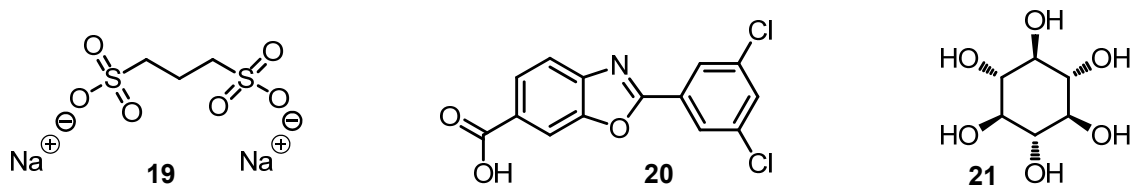


Abb. 22: Strukturen der Verbindungen Eprodisat (19, Stufe III), Tafamidis (20, Stufe III) und ELND-005 (21, Stufe II).^[106]

Ein anderer interessanter Ansatz ist die Herstellung künstlicher Proteasen als katalytische Wirkstoffe gegen die pathologische Proteinaggregation. Hierbei berichteten *Lee et al.* über eine Bibliothek mit einem Co^{III} -Cyclen-Komplex als Zentrum der proteolytischen Funktion. Dieser ist mit bekannten $\text{A}\beta$ -affinen aromatischen Bausteinen gekuppelt, um die Selektivität zu erhöhen.^[107,108] Bei Spaltungsexperimenten kristallisierten sich mehrere Derivate heraus, welche eine proteolytische Aktivität bezüglich $\text{A}\beta(1-40)$ und $\text{A}\beta(1-42)$ haben. Abb. 21 zeigt die Strukturen zweier aktiver Proteolyse-Derivate.

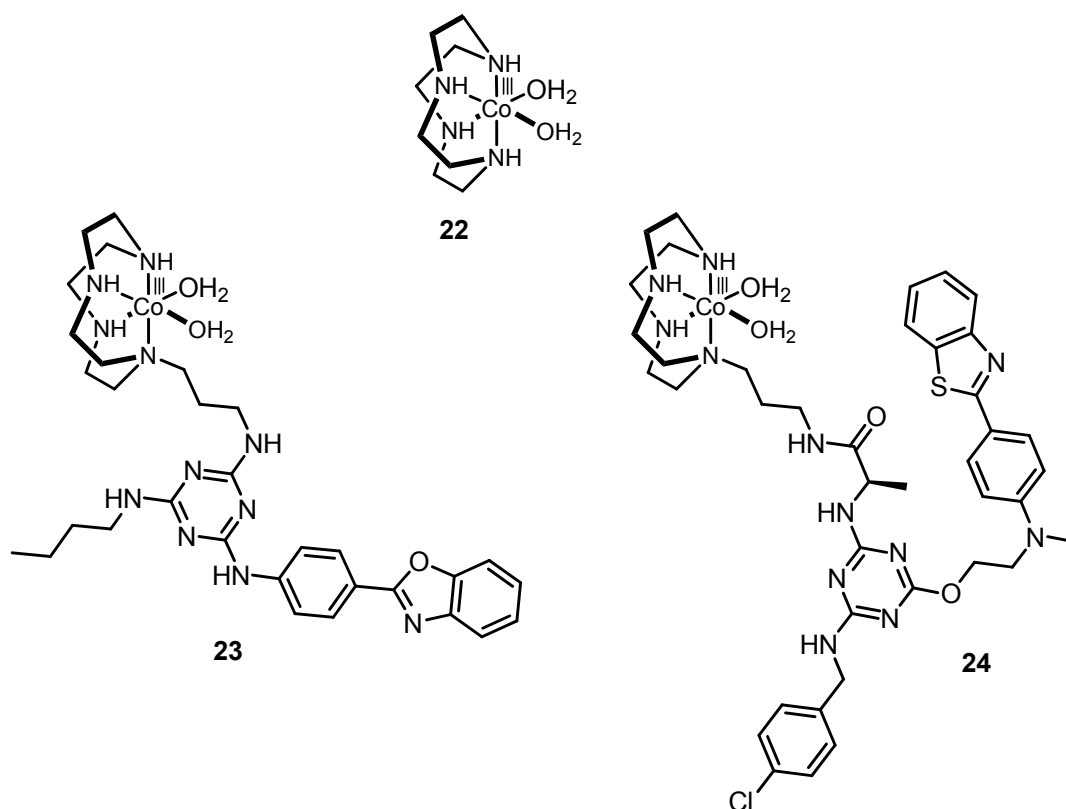


Abb. 23: Strukturen des Co^{III} -Cyclen-Komplexes 22 und zweier proteolyseaktiver Derivate 23 und 24.^[107,108]

Massenspektrometrische Ergebnisse nach Inkubation der künstlichen Protease mit dem jeweiligen A β -Peptid zeigten die Anwesenheit von Spaltfragmenten wie A β (1-20) und A β (1-21).^[108]

Der Mechanismus der Proteolyse ist in Abb. 24 dargestellt. Hierbei besitzt das Cobalt zwei koordinierte Wassermoleküle und es liegt ein Gleichgewicht zwischen protonierter und deprotonierter Form eines Wassermoleküls vor. Anschließend substituiert ein Peptid mit seiner Carbonyl-Gruppe einen Wasserliganden. Über eine viergliedrige Zwischenstufe bildet sich der Co^{III}-Cyclen-Komplex zurück und liefert außerdem die Produkte der Peptidspaltung – eine freie Carbonsäure und ein primäres Amin.

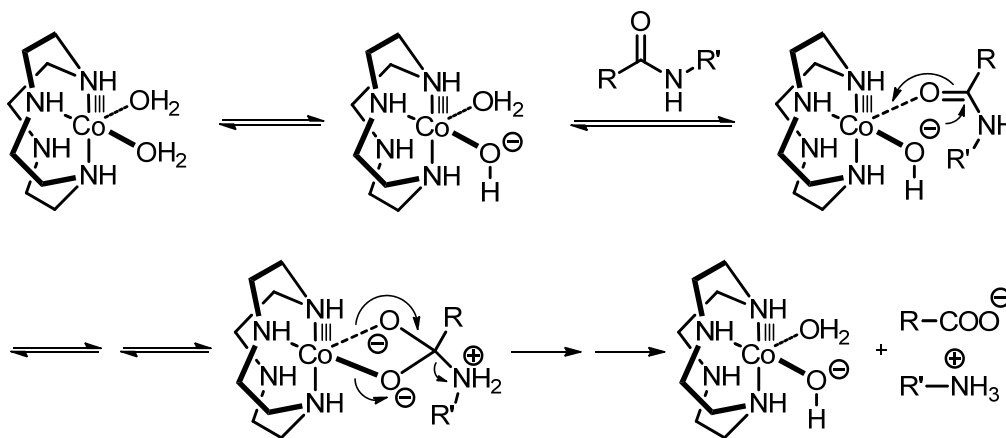


Abb. 24: Mechanismus der katalytischen Peptidspaltung mit dem Co^{III}-Cyclen-Komplex.^[109,110]

1.2.6. Immunotherapeutische Ansätze

Seit mehr als einer Dekade liegt der Fokus der Forschung ebenfalls in der Immunotherapie für die kausale Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit. Bei klinischen Tests aktiver Immunisierung durch die Verwendung von A β traten unterschiedliche Komplikationen auf, wodurch das Augenmerk auf der passiven Immunisierung mit Antikörpern lag.^[111] Als Alternative zu großen Immunglobulinen (IgGs) wurden A β bindende Antikörperfragmente (scFvs) für diagnostische und therapeutische Zwecke eingesetzt. Die scFvs besitzen verstärkte pharmakokinetische Eigenschaften wie eine erhöhte Diffusionsfähigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke oder reduzierte Nebenwirkungen in *in vivo* Experimenten. Als Beispiel dient das A β -bindende IC16-scFv. Dieses Fragment erkennt die A β (1-8)-Sequenz, interagiert mit verschiedenen A β

Spezies und beeinflusst dessen Fibrillenbildung. Abb. 25 zeigt die Interaktion von IC16-scFv mit A β (1-8).

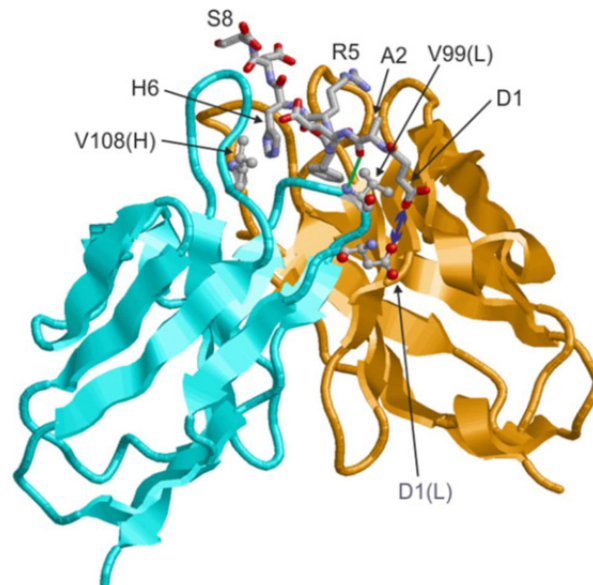


Abb. 25: Interaktion von monomerem A β (1-8) mit dem IC16-scFv.^[111]

Ein weiterer monoklonaler Anti-A β -Antikörper 266 wurde entwickelt, um monomeres A β zu erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass in Hirnen von Mäusen die Eliminierung von A β durch A β -Antikörper-Komplexe gebremst wurde. Es wurden höhere Level von monomeren A β -Spezies gefunden, welche in der Antikörper-gebundenen Form vorlagen, ohne die Zahl insgesamt gebildeter A β -Moleküle zu beeinflussen.^[112]

1.2.7. β -Faltblattbrecher auf Aminopyrazolbasis

Schrader und *Kirsten* entwickelten Anti- β -Faltblattreagenzien, welche acylierte und monomere Aminopyrazole enthalten.^[113] Diese erkennen das Rückgrat der Peptide, was auf eine Komplexierung mit Dipeptiden in organischen Lösungsmitteln zurück zu führen ist. Mit ihrem Donor-Akzeptor-Donor-Bindungsmotiv sind sie aufgrund von Wechselwirkung mit dem Akzeptor-Donor-Akzeptor-Motiv des Peptids als vorteilhaft einzustufen. Unter Durchführung von Kraftfeldrechnungen und NMR-Analysen konnte dargelegt werden, dass Aminopyrazole über Wasserstoffbrückenbindungen das Rückgrat des Peptids stabilisieren können

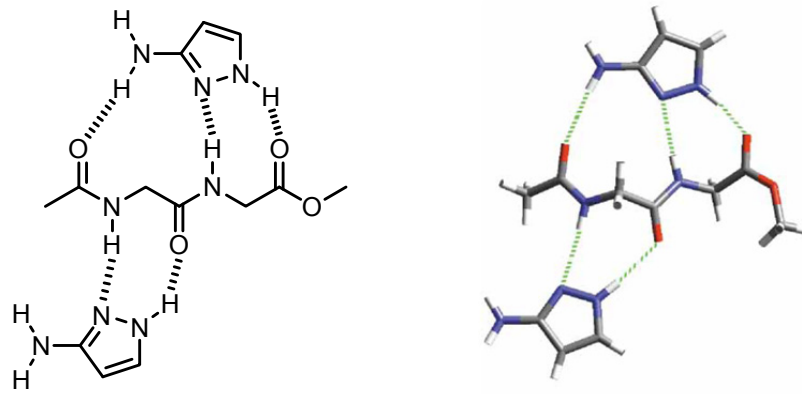


Abb. 26: β -Faltblattstabilisierung durch ein Aminopyrazol an einem Dipeptid.^[114]

Daraus folgend konnten *Schrader* und *Wehner* neue Rezeptoren synthetisieren, welche kleine Peptideinheiten selektiv erkennen können. Hierbei wurden zwei Aminopyrazol-Einheiten über Dicarbonsäuren verknüpft. Diese neue Art von Rezeptoren wies dasselbe Bindungsmotiv auf wie das Aminopyrazol-Monomer.^[115]

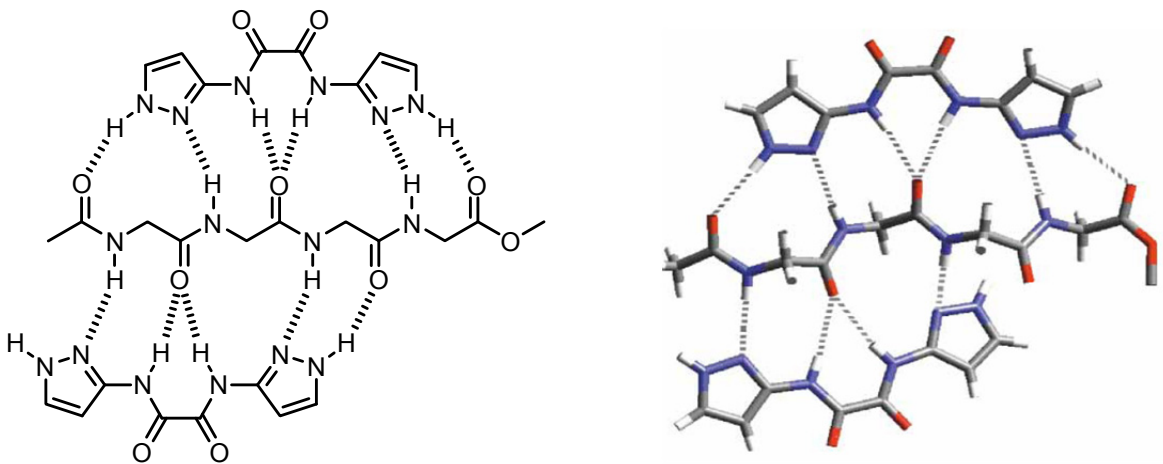


Abb. 27: Interaktion des Liganden-Dimers mit dem Tetraglycin-Peptid.^[115]

Der nächste Schritt war die Substitution des Aminopyrazols durch eine heterocyclische Aminosäure (speziell: 3-Aminopyrazol-5-carbonsäure), welche mit proteinartigen Aminosäuren zu sogenannten Hybridverbindungen modifiziert wurde.^[116] *Schrader* und *Rzepecki* gelang es Liganden zu synthetisieren, welche eine Selektivität in Bezug auf die KLVFF-Sequenz des A β -Peptids aufweisen.^[117]

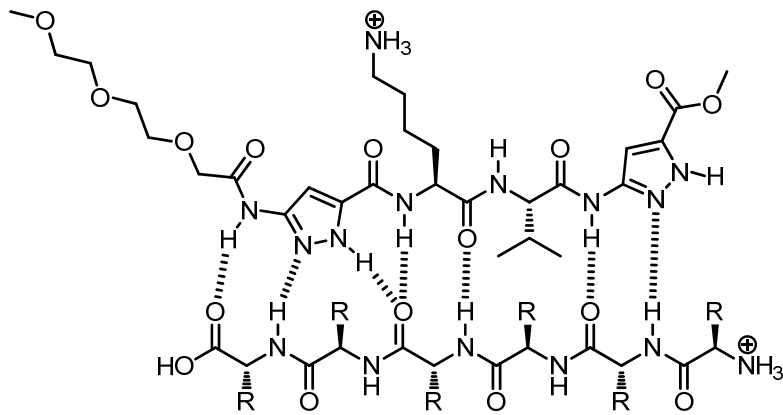


Abb. 28: Komplexierung eines Hybridliganden mit einem Hexapeptid.^[117]

Dieser Ligand und seine Derivate zeigten sowohl in Zellkultur-Assays mit neuronalen Zellen^[118] als auch bei *in vitro* Experimenten erfolgversprechende inhibierende Eigenschaften. Daraus folgend konnte über Peptidkupplungsreaktionen der Ligand 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbonsäuremethylester (**25**, Trimer) synthetisiert werden. Dieses Aminopyrazol-Trimer **25** komplexiert spezifisch die KLVFF-Sequenz und bringt hohe inhibierende Eigenschaften mit sich. Mit dieser Verbindung konnte über Fluoreszenz-korrelationsspektroskopie und Dichte-Gradienten-Ultrazentrifugation gezeigt werden, dass inhibierende sowie disaggregierende Effekte zu beobachten sind und dass die Agglomeration kleiner A β -Oligomere verhindert wird.

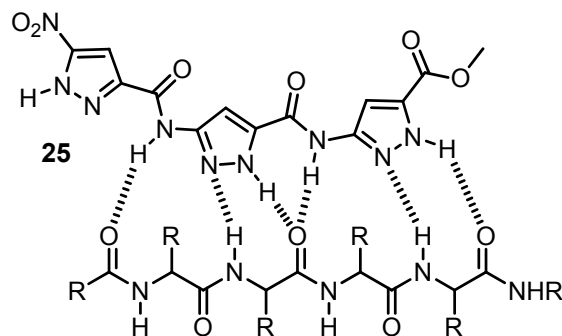


Abb. 29: Struktur des Aminopyrazol-Trimers **25** und die Interaktion mit einem Pentapeptid.^[118,119]

Hochdörffer modifizierte das Trimer **25** C-terminal mit verschiedenen peptidischen Sequenzen, um spezifische Bindungen an das A β -Peptid zu ermöglichen. Dabei konnten verschiedene Kombinationen der Sequenzen mit variierender Größe synthetisiert werden.^[15,119] Eine der erfolgversprechenderen Verbindungen war das Trimer-

KKKKKG (**26**), das als Ligand die Aggregation des A β (1-42)-Peptids bis zu 25% inhibieren konnte.

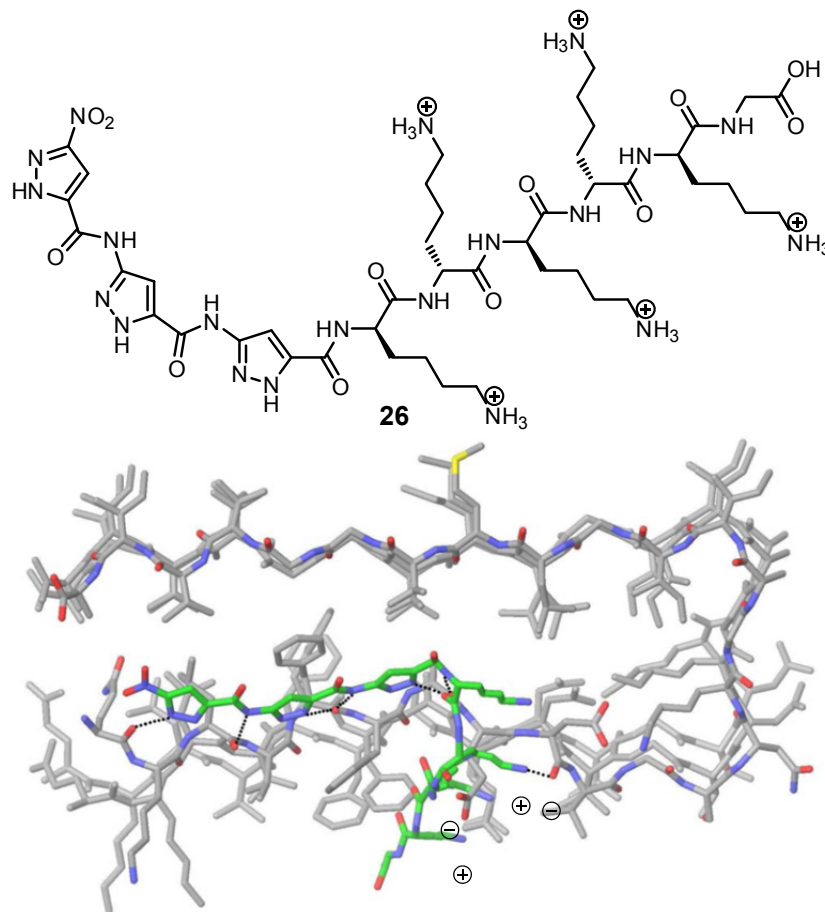


Abb. 30: Oben: Struktur von Thioflavin-KKKKKG (**26**). Unten: Energieminimierter Komplex zwischen dem Liganden Trimer-KKKKKG (**27**) und einer pentameren Protofibrille.^[15,119]

Jedoch könnte das Ergebnis bei diesem Liganden aufgrund der Bildung von Fibrillen anderer Beschaffenheit verfälscht worden sein, was mittels CD-Spektroskopie beobachtet werden konnte, da andere Fibrillenformen nur schlecht mit Thioflavin T komplexiert werden.

Müller-Schiffmann et al. berichteten von zwei miteinander über verschiedene Spacer-Einheiten kovalent verknüpften unabhängigen Wirkungsklassen, die auf dem Aminopyrazoltrimer und dem D1/D3-Peptid basieren und beeindruckende Ergebnisse in biochemischen und -physikalischen Experimenten zeigten.^[120,121,122]

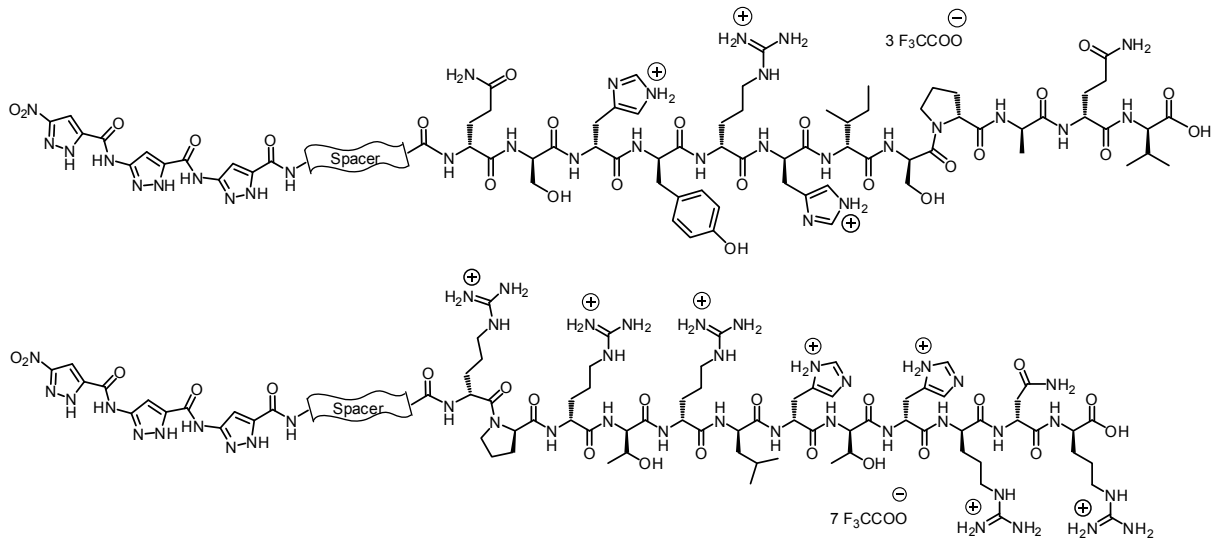


Abb. 31: oben: Trimer-Spacer-D1-Hybride, unten: Trimer-Spacer-D3-Hybride.^[120]

Abb. 32a zeigt die berechnete Trimer-TEG-D3/Aβ-Oligomer-Interaktion. Die Glutamatreste der benachbarten Aβ-Stränge (orange) beziehen räumliche Nähe zu den basischen Aminosäureresten der D3-Einheit (grün), während das Aminopyrazoltrimer (rot) mit den beiden Phenylalaninresten (weiß) an F19 und F20 in Wechselwirkung tritt. Im Vergleich zu den einzeln hinzugefügten Wirkstoffen (Mitte) konnte die Hybrids substanz (rechts) die mEPSC-Suppression signifikant revertieren (Abb. 32b). ThT-Experimente wiesen starke Aggregationsinhibierungen durch die Hybridliganden auf, wobei der Effekt zunahm, je kürzer der Spacer gewählt wurde (Abb. 32c).

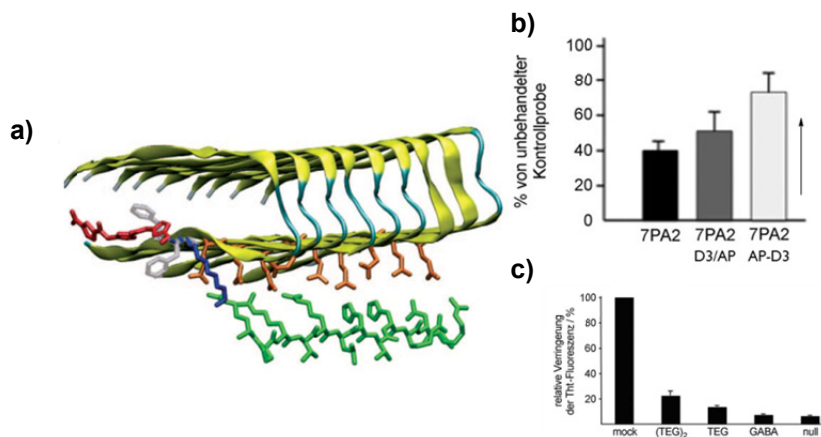


Abb. 32: a) Modellierung des Trimer-TEG-D3/Aβ-Oligomer-Komplexes. b) mEPSC-Frequenz in primären neuronalen Zellkulturen (7PA2-Zellkulturüberstand) der Maus. c) ThT-Experimente mit Hybrid-Inhibitoren unterschiedlicher Spacer-Längen. Von links nach rechts: Aβ als Referenz, Ligandenzugabe mit absteigender Spacer-Länge.^[121,122]

2. Aufgabenstellung

Die Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen spielt auf dem Gebiet der pathologischen Proteinaggregation eine große Rolle. Basierend auf der Amyloid-Kaskaden-Hypothese liegt somit das Augenmerk auf Liganden, welche die Aggregation von Proteinen inhibieren und die daraus folgende Fibrillen- und Plaque-Bildung verhindern können. Bereits synthetisierte peptidische und aromatische Wirkstoffe zeigen eine Wechselwirkung mit dem A β -Peptid, so dass die Fibrillogenease beeinflusst wird. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Aminopyrazol-Trimer-Derivate die KLVFF-Sequenz des Alzheimer-Peptids am Rückgrat erkennen und als Komplex über Wasserstoffbrückenbindungen und π - π -Stapelwechselwirkungen stabilisieren können (Abb. 33).^[15,25,120]

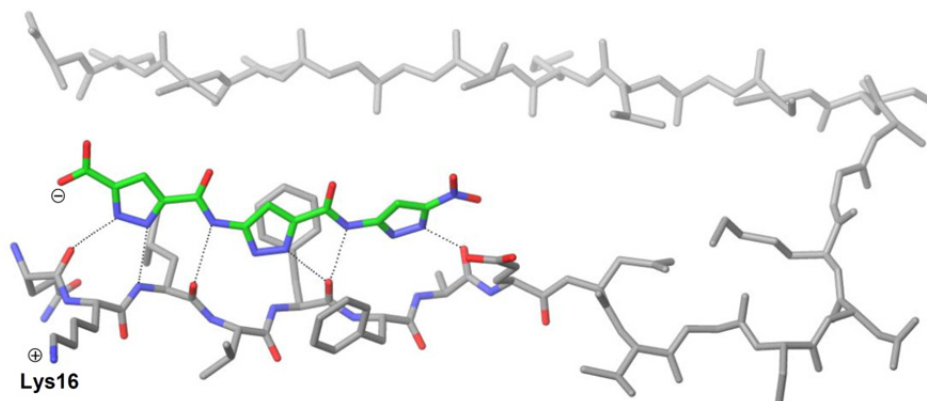


Abb. 33: Minimiere Wirkungsbeziehung zwischen Aminopyrazoltrimer und einem A β -Peptid aus einer pentameren Protofibrille.^[15]

März-Berberich konnte erste Ergebnisse in der substöchiometrischen Wirkungsweise einiger Aminopyrazol-Derivate in Bezug auf die A β -Agglomeration erzielen. Dabei wurden die Probenlösungen zentrifugiert oder auch filtriert, um dann mit den gesättigten Lösungen Wirkungseffekte zu erzielen.

Daraus folgend war das Ziel meiner Arbeit weitere Untersuchungen mit den bereits synthetisierten Verbindungen mit dem Fokus auf substöchiometrischen Effekten via ThT-Assays, CD-Spektroskopie, TE-Mikroskopie und biologischen Tests durchzuführen.

Ein anderer Ansatzpunkt lag in der nichtkovalenten Verknüpfung zweier Wirkstoffe über Metallkomplexierung. Durch die Funktionalisierung des Aminopyrazol-Trimers mit einer Nitrilotriessigsäure-Einheit (NTA) könnten His-getaggte Antikörper mit Hilfe von Ni^{2+} -Ionen komplexiert werden und somit eine höhere Selektivität und Affinität gegenüber dem A β -Peptid aufweisen.

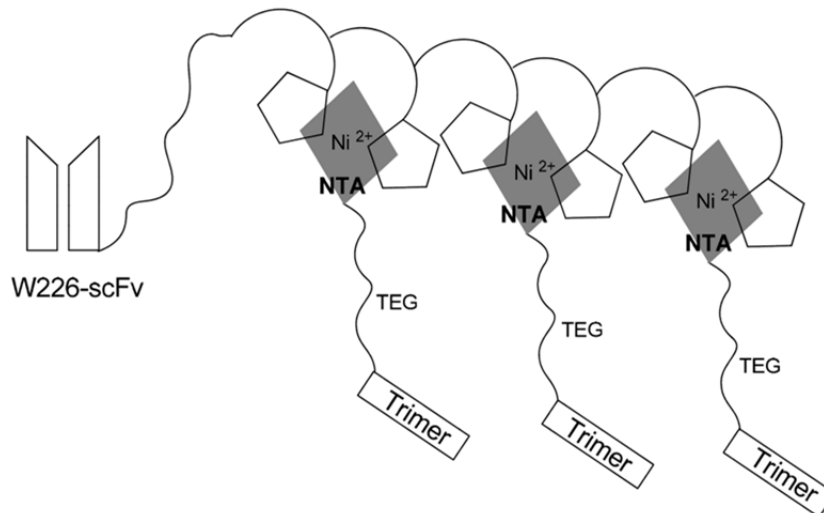


Abb. 34: Schematische Darstellung der Komplexierung des Trimer-NTA-Bausteins über Ni^{2+} -Ionen mit einem Hexa-His-getaggten W226-scFv-Antikörper.^[120]

Jedoch konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex keine Stabilität aufweist. Somit konnten keine weiteren Experimente durchgeführt werden.

Um eine Erhöhung der Komplexstabilität hervorzurufen, bestand in dieser Arbeit die Aufgabe darin, das Aminopyrazoltrimer mit mehr NTA-Resten auszustatten, was über eine Cyclam-Einheit realisierbar gemacht werden könnte. Weiterführend sollten in biologischen Tests nachgewiesen werden, ob der Komplex im Vergleich zu den einzelnen Komponenten eine stärkere Affinität zum A β -Peptid zeigt.

Der dritte Bereich dieser Arbeit befasst sich damit, eine künstliche Protease herzustellen, die aus dem Aminopyrazoltrimer und einer Co^{III} -Cyclen-Einheit (Abb. 36) besteht, um somit eine selektive Erkennung des A β -Peptids durch die Trimer-Einheit zu erhalten, wodurch die Cyclen-Funktion das entsprechende Peptid gezielt proteolyseieren kann. Biophysikalische Tests wie der ThT-Assay und CD-Spektroskopie können dann eine Auskunft darüber geben, ob nach der Proteolyse noch amyloide Strukturen vorhanden sind. Massenspektroskopische Untersuchungen bieten zusätzlich die Möglichkeit genaue Schnittstellen der künstlichen Protease zu ermitteln. Abb. 36 zeigt den oktaedrischen Co^{III} -Cyclen-Komplex. Die Überlegung besteht darin, die

Aminopyrazol-Einheit über einen Spacer mit einer Aminfunktion des Cyclens zu verknüpfen, so dass jedoch das Amin erhalten bleibt und nicht in ein Amid überführt wird, um die Möglichkeit der Co^{III} -Komplexierung zu erhalten.

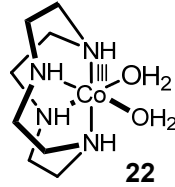


Abb. 35: Oktaedrischer Co^{III} -Cyclen-Komplex 22, wobei die Wasser-Liganden eine große Rolle bei der proteolytischen Wirkung spielen.^[107]

Ein ebenfalls interessanter Ansatzpunkt ist der Einfluss von Aminopyrazolliganden auf das Vorläuferprotein APP. Die Fragestellung hierbei ist, ob Hybridverbindungen in der Lage sind die Sekretion von APP zu den toxischen $\text{A}\beta$ -Derivaten zu inhibieren oder gar in eine andere Richtung zu lenken. Biologische Untersuchungen können Aufschluss darüber geben, ob andere Sekretionsprodukte gebildet werden und in welcher Größenordnung diese liegen. Die Massenspektrometrie gibt dann Informationen über die genaue Spaltungsstelle.

3. Durchführung und Ergebnisse

3.1. Aminopyrazoltrimer als β -Faltblattbrechereinheit

Als Erkennungseinheit der KLVFF-Sequenz im A β -Peptid dient das Aminopyrazoltrimer als Grundbaustein für die Synthesen von unterschiedlichen Hybridverbindungen. Die Herstellung der Pyrazoleinheit erfolgte nach Vorschriften aus vorherigen Arbeiten.^[15,25] Abb. 36 zeigt die Retrosynthese des Aminopyrazoltrimers.

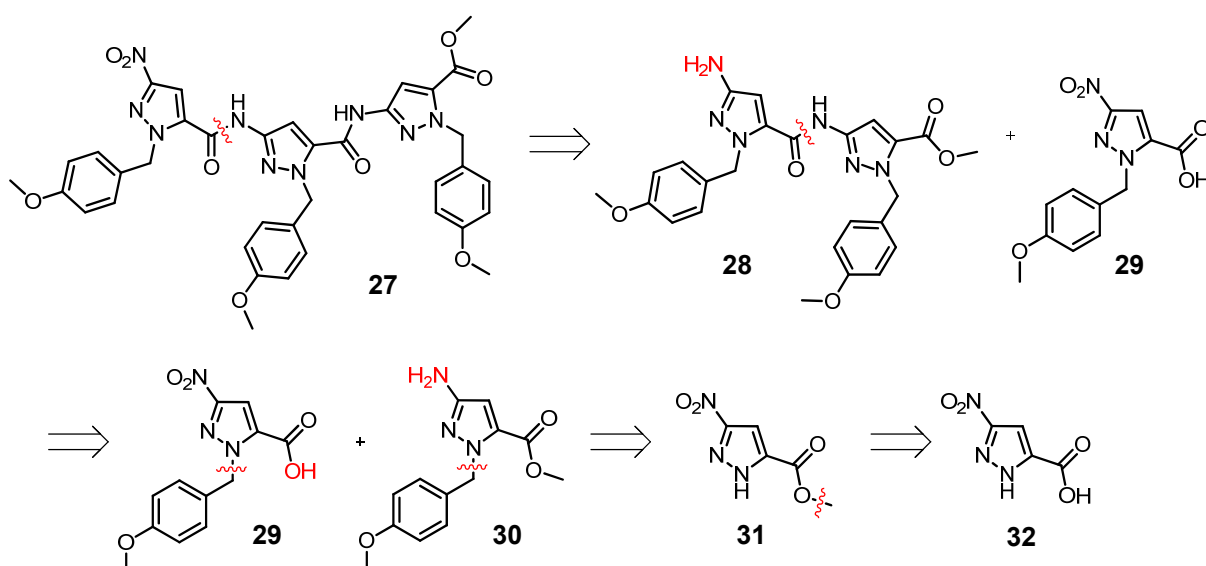


Abb. 36: Retrosynthese des Trimers **27**.

Das Trimer **27** bietet aufgrund orthogonaler Schutzgruppenstrategie ideale Voraussetzungen für C- und N-terminale Funktionalisierungen. Über die Schützung des Stickstoffs im Heterocyclus an Position 2 kann das Zielmolekül schrittweise über Peptidkupplungsreaktionen synthetisiert werden.

Die Ausgangsverbindung für die Trimersynthese ist 5-Nitro-3-pyrazolcarbonsäure (**32**). Zunächst wurde durch Veresterung die Carbonsäureeinheit geschützt, woraufhin schließlich das Pyrazol PMB-geschützt wurde. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeiten konnten die PMB-geschützten Isomere (Schützung an Position 1 und 2) voneinander getrennt werden.^[15] Durch darauffolgende Esterhydrolyse und Redukti-

on der Nitro-Gruppe standen die Grundbausteine für die Peptidkupplung zum Nitro-Dimer zur Verfügung. Abb. 37 zeigt das Syntheschema zu den Monomerbausteinen **29** und **30**.

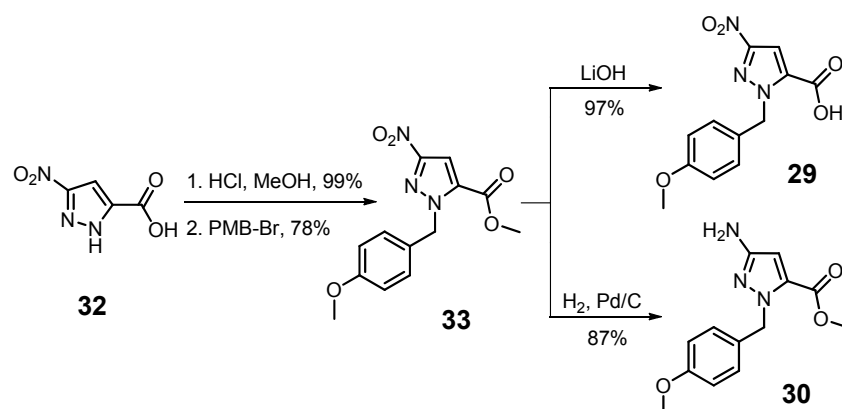


Abb. 37: Syntheschema zur Herstellung der PMB-geschützten Monomerbausteine **29** und **30**.^[15]

Im nächsten Schritt wurden Monomersäure **29** und Aminomonomer **30** über eine Peptidkupplungsreaktion zum Nitro-Dimer verknüpft. Nach Reduktion zum Aminodimer **28** und anschließender wiederholter Kupplung mit der Monomersäure **29** wird das Trimer **27** erhalten. Zur Freilegung der Pyrazole wurden die PMB-Schutzgruppen mit Hilfe trockener TFA und erhöhter Temperatur abgespalten.

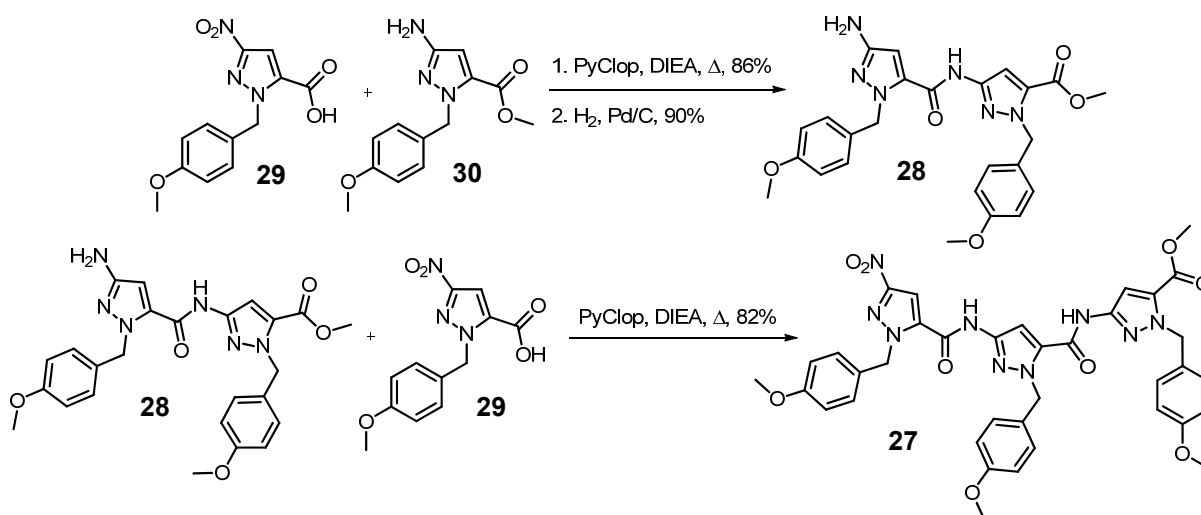


Abb. 38: Fortführender Syntheseweg zur Herstellung des Grundbausteins Trimer **27**.^[15]

3.2. Funktionalisierung des Trimer-Bausteins für Peptidsynthesen

Bisher konnte gezeigt werden, dass der Aminopyrazol-Grundbaustein sowohl C-terminal durch Esterspaltung als auch N-terminal durch Reduktion der Nitro-Gruppe funktionalisiert werden konnte. Die Arbeiten von *Hochdörffer* und *März-Berberich* zeigten ebenfalls eine C-terminale Funktionalisierung mit unterschiedlichen Peptidsequenzen.^[15,120]

Nun bestand die Überlegung darin, das Trimer als β -Faltblattbrecher-Einheit in eine Peptidsequenz einzubauen. Damit die standardisierte Fmoc-Strategie für Peptidfestphasensynthese verwendet werden kann, sollte das Trimer N-terminal Fmoc-geschützt und der C-Terminus frei sein. Abb. 40 zeigt die retrosynthetischen Ansätze für die Fmoc-geschützte Trimer-Säure **34**.

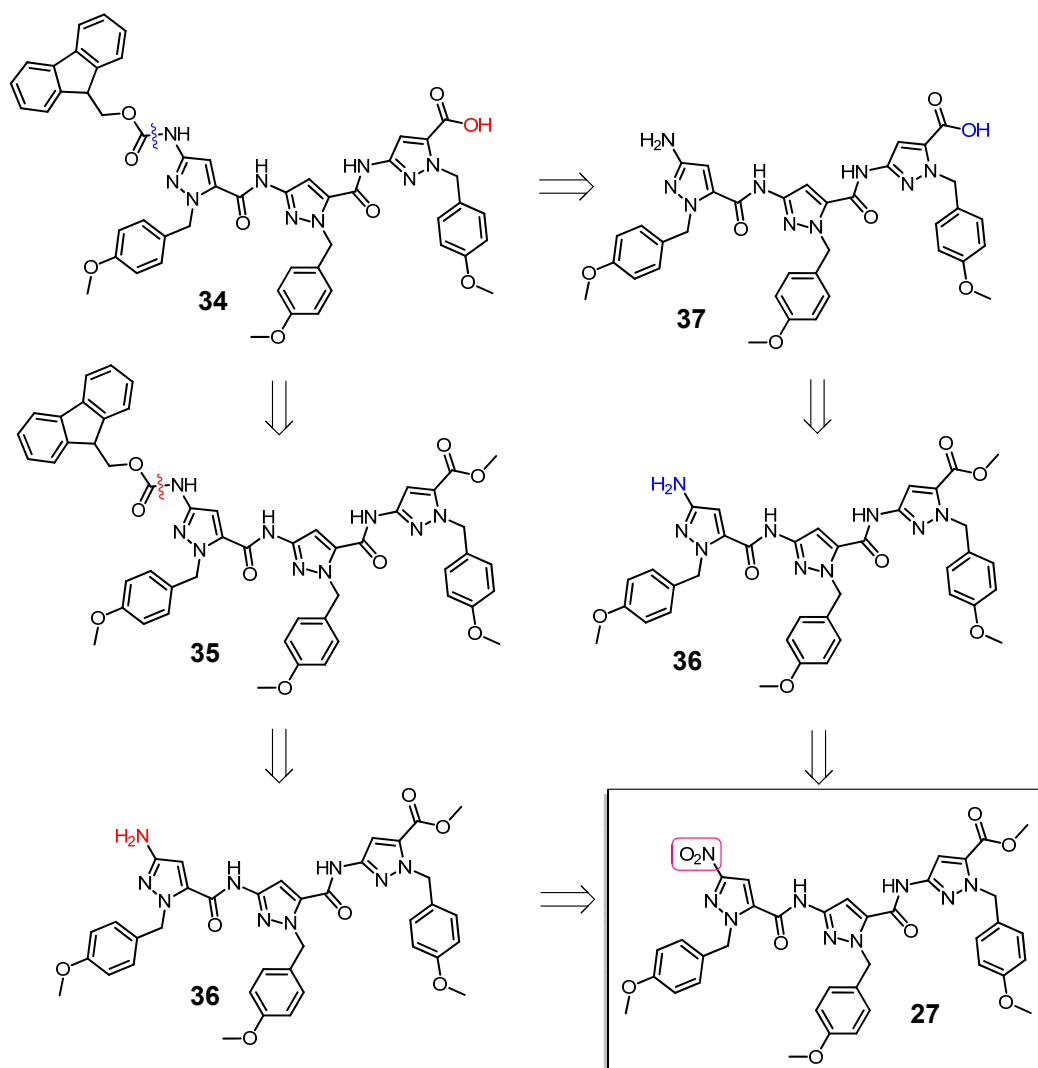


Abb. 39: Struktur und Retrosynthese der Fmoc-Trimer-Säure **34** für SPPS.

Ausgehend vom selben Grundbaustein **27** wurden zwei Syntheserouten geplant. Der erste Syntheseweg beinhaltet die Reduktion der Nitro-Gruppe mit anschließender Fmoc-Schätzung der Amino-Funktion. Darüber hinaus soll die Methylesterspaltung zum gewünschten SPPS-Baustein führen.

In der zweiten Route werden C- und N-Terminus nacheinander entschützt und die Amino-Gruppe darauffolgend geschützt.

Für die erste Variante wurde zunächst das Trimer **27** zum Aminotrimer **36** ohne Probleme reduziert.

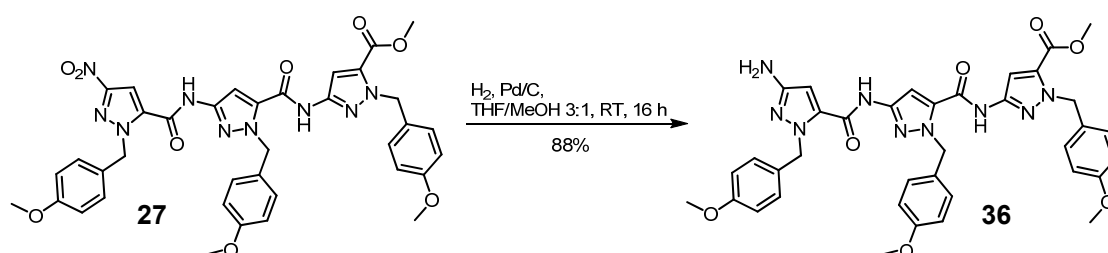


Abb. 40: Schema zur Herstellung von Aminotrimer **36**.

Im nächsten Schritt wurde die Amino-Gruppe mit der basenlabilen Fmoc-Einheit unter Schutzgasatmosphäre in absolutem THF mit akzeptabler Ausbeute geschützt.

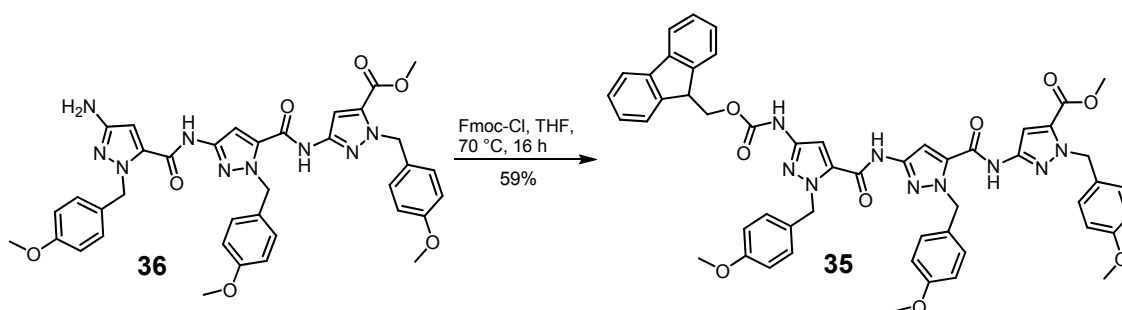


Abb. 41: Schema zur Herstellung des Fmoc-geschützten Trimers **35**.

Für die Esterspaltung zur gewünschten Zielstruktur konnte aufgrund der Instabilität der Fmoc-Schutzgruppe im basischen Milieu nicht auf die standardisierte Umsetzung mit Lithiumhydroxid zurückgegriffen werden. Der erste Versuch bestand darin, eine saure Esterhydrolyse mit halbkonzentrierter Salzsäure und Eisessig durchzuführen. Jedoch führten diese Bedingungen nicht zur gewünschten freien Carbonsäure (Abb. 42).

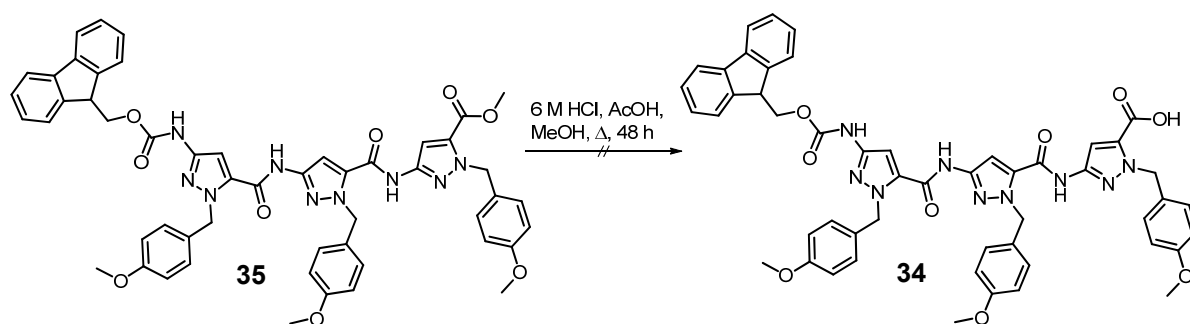


Abb. 42: Schema zur erfolgreichen Herstellung der Fmoc-geschützten Trimer-Säure **34** im sauren Medium.

Eine andere aus der Literatur bekannte Methode zur Spaltung von Carbonsäureestern ist die Umsetzung mit Trimethylsilyliodid.^[123,124] Hierbei bestand die Überlegung darin, mit Hilfe der Umesterung in einen Siloxyester und darauffolgender wässriger Aufarbeitung die Carbonsäure **34** zu erhalten. Ebenfalls konnte hier das gewünschte Produkt nicht erhalten werden.

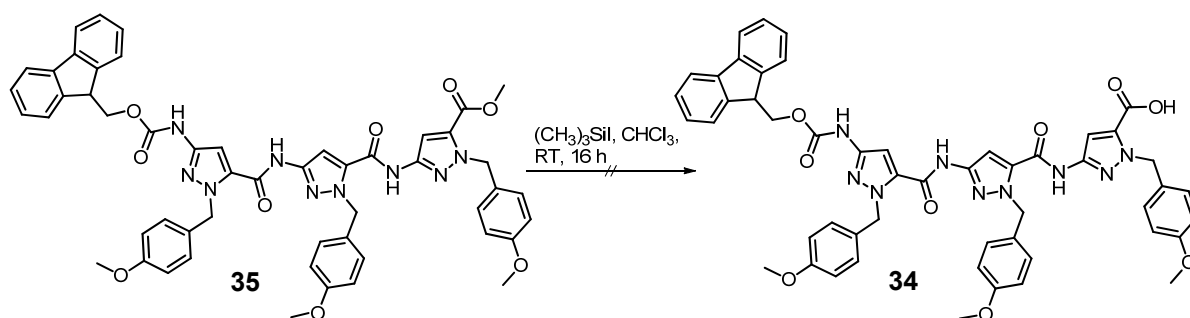


Abb. 43: Schema zur erfolgreichen Herstellung der Fmoc-geschützten Trimer-Säure **34** unter Einsatz von Trimethylsilyliodid.

In der zweiten Syntheseroute wurden zunächst der C- und N-Terminus entschützt. Nach der Reduktion der Nitro-Gruppe (siehe Abb. 40) wurde unter Standardbedingungen der Methylester in guten Ausbeuten gespalten.

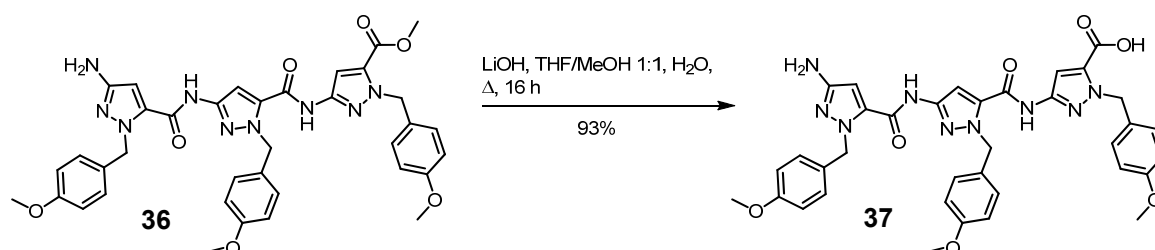


Abb. 44: Schema zur Darstellung der Aminotrimer-Säure **37**.

Der abschließende Schritt war die Umsetzung der Aminosäure **37** mit Fmoc-Chlorid. Diese Reaktion warf einige Schwierigkeiten auf. Zunächst musste eine schwache Base eingesetzt werden, um das Hydrochlorid des Trimers **37** in Lösung zu bringen. Das Problem bestand dann darin, dass die gekoppelte Fmoc-Einheit teilweise sofort wieder abgespalten wurde.

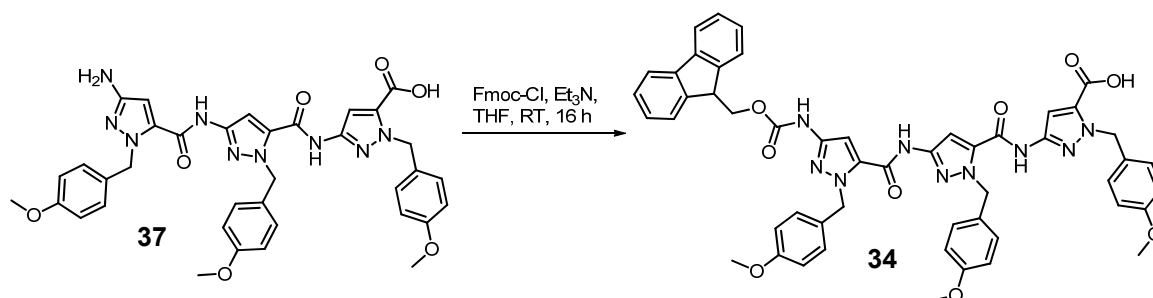


Abb. 45: Schema zur Synthese der Fmoc-Trimer-Säure 34.

Massenspektrometrische Messungen zeigten jedoch die Bildung des gewünschten Produktes (für C₅₁H₄₅N₉O₉Na: berechnet: 950.3232, gefunden: 950.3231). Das nächste Problem lag in der säulenchromatographischen Aufreinigung. Hierbei konnte eine geringe Menge erhalten werden, jedoch zeigten ¹H-NMR-Daten keine gute Reinheit des Produktes auf.

3.2.1. Zusammenfassung

Die Synthese eines neu funktionalisierten Bausteins auf Aminopyrazolbasis für die Peptidfestphasensynthese könnte neue Möglichkeiten in der Funktionalisierung von Peptiden bieten. Hierbei wurde versucht über zwei Syntheserouten zur *N*-terminal Fmoc-geschützten Trimer-Säure **34** zu gelangen.

Die erste Route befasste sich zunächst mit der *N*-terminalen Funktionalisierung des Grundbausteins **27**. Aufgrund der Basenlabilität der Fmoc-Schutzgruppe konnte die standardisierte Methode der Esterspaltung mit Lithiumhydroxid nicht durchgeführt werden. Daher wurden einmal saure Bedingungen und der Umsatz mit Trimethylsilyliodid getestet, woraufhin jedoch der Methyl ester nicht gespalten werden konnte.

Der zweite Ansatz war die Entschützung der *C*- und *N*-Termini des Bausteins **27**. Die erhaltene künstliche Aminosäure **37** wurde anschließend mit Fmoc-Chlorid umgesetzt. Es wurde ein geringer Umsatz und nur unzureichende Reinheit des gewünsch-

ten Produkts **34** erhalten. Aufgrund der Zugabe der schwachen Base Triethylamin für die Deprotonierung des Hydrochlorids wurde zum Teil die Fmoc-Schutzgruppe wieder abgespalten. Die Freilegung der Carbonsäure-Funktion führte zu Problemen in der säulenchromatographischen Aufreinigung, woraufhin das Produkt nicht mit zufriedenstellender Reinheit erhalten werden konnte.

3.3. Substöchiometrische Effekte bereits synthetisierter Liganden

März-Berberich entdeckte erste Anzeichen dafür, dass Aminopyrazolliganden in Bezug auf A β (1-42) aggregationsinhibierende Wirkungen im substöchiometrischen Bereich zeigten.^[120] In dieser Arbeit wurden mehrere Aminopyrazolhybride auf substöchiometrische Effekte hin untersucht (Abb. 46), wobei die Verbindungen bis auf Trimer-D3-Lys **45** von *Höchdörffer* und *März-Berberich* hergestellt wurden.^[15,120]

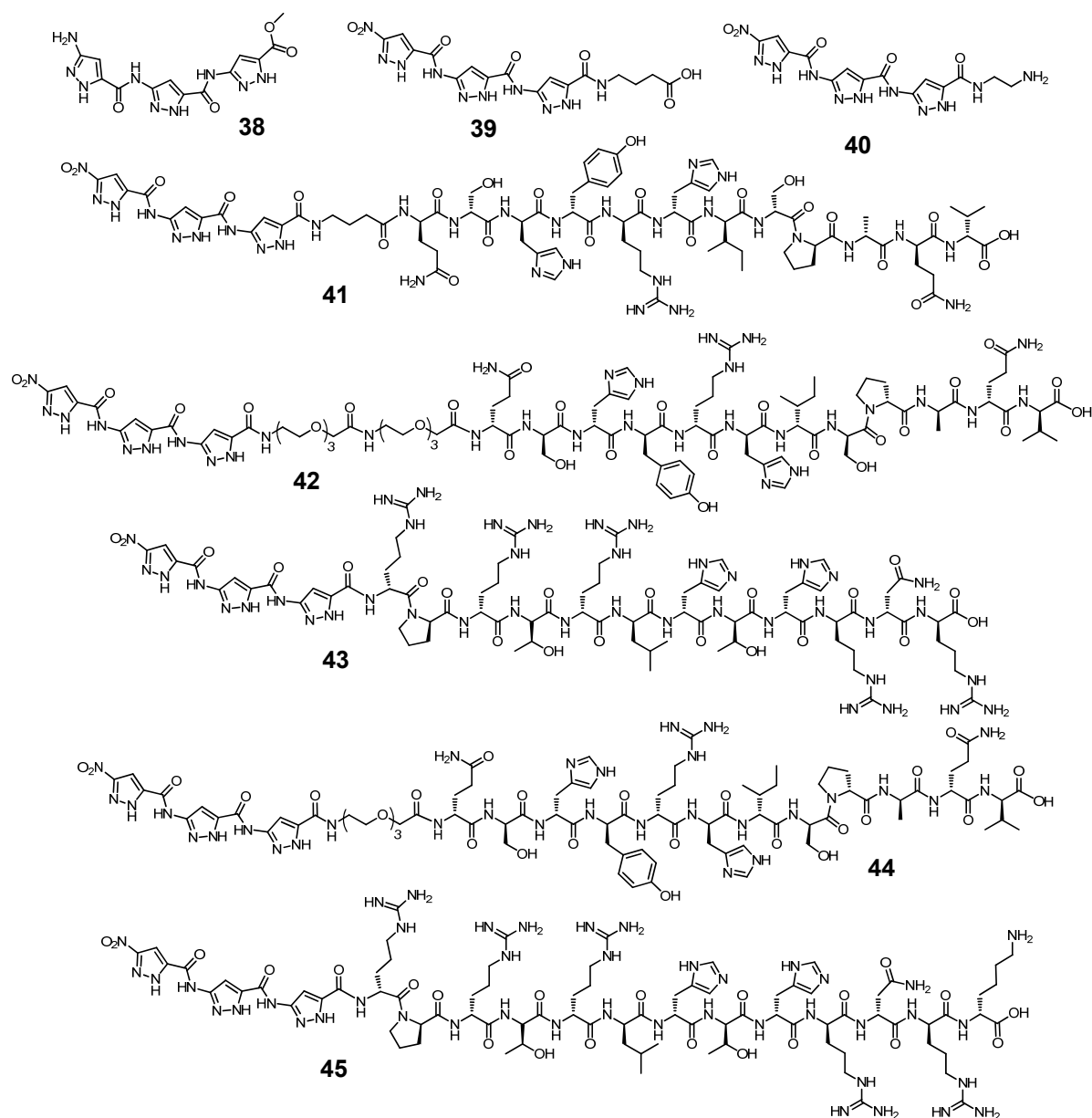


Abb. 46: Strukturen der Verbindungen zur Überprüfung auf substöchiometrische Effekte: Aminotrimer **38**, Trimer-GABA-OH **39**, Trimer-Diamin **40**, Trimer-GABA-D1 **41**, Trimer-TEG-TEG-D1 **42**, Trimer-D3 **43**, Trimer-TEG-D1 **44**, Trimer-D3-Lys **45**.

3.3.1. Bestimmung der aktiven Konzentrationen der Liganden

In vorherigen Arbeiten wurde immer zunächst untersucht, wie groß die aktive Konzentration der Liganden in Lösung ist. Daher wurden Proben zentrifugiert oder filtriert, um gegebenenfalls gebildete Aggregate von den freien Molekülen zu trennen. *März-Berberich* stellte zudem fest, dass die Abtrennung der Aggregate nicht zu einer Veränderung der Messergebnisse führte, wenn zentrifugiert oder filtriert wurde.^[120]

In Abb. 47 ist als Beispiel Trimer-D3 **43** gezeigt. Links ist das UV-Spektrum von der unbehandelten 60 μM Lösung und der zentrifugierten Probe (20 min, 13400 g) gezeigt. Daran war bereits zu erkennen, dass sich zusammengelagerte Aggregate abtrennen ließen. Rechts sind UV-Spektren von angesetzten Konzentrationsreihen zu sehen, um über die *Lambert-Beer'sche* Relation die Konzentration der zentrifugierten Lösung zu bestimmen.^[125] Gleichung (1) zeigt das *Lambert-Beer'sche* Gesetz.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

mit A = Absorption, ε = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration, d = Schichtdicke

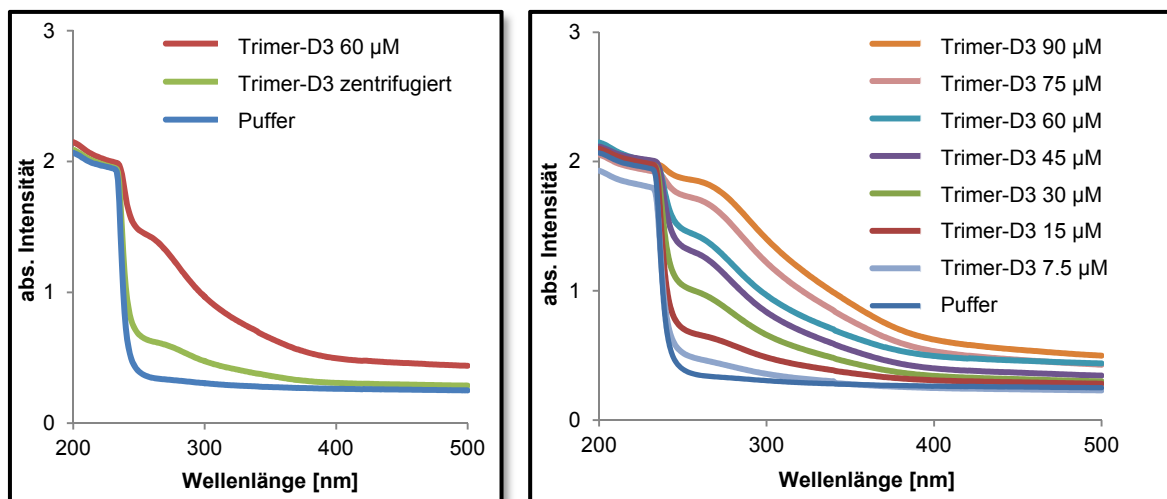


Abb. 47: UV-Spektren der unbehandelten und zentrifugierten Probe (links) und Konzentrationsreihe zur Ermittlung der aktiven Konzentration der zentrifugierten Probe (rechts) ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Dabei wurde jeweils der Absorptionswert bei 260 nm ausgewählt, um mit Hilfe der Extinktion und der Konzentration über lineare Regression und die Lambert-Beer'sche Beziehung die aktive Konzentration der gesättigten Lösung zu ermitteln.

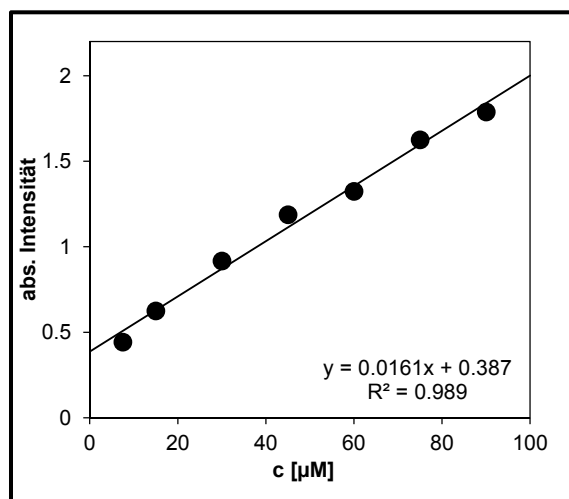


Abb. 48: Lineare Regression für die Bestimmung der aktiven Konzentration von Trimer-D3 43.

Mit der Intensität bei 260 nm der zentrifugierten Lösung konnte dann genau die Konzentration durch Einsetzen des Absorptionswertes in die berechnete Geradengleichung ermittelt werden. In Tab. 1 sind die ermittelten Konzentrationen der zu überprüfenden Verbindungen dargestellt (UV-Spektren und lineare Regressionen der anderen Verbindungen siehe Abschnitt 5.6.).

Tab. 1: Berechnete aktive Konzentrationen für die zu untersuchenden Verbindungen über das Lambert-Beer'sche Gesetz.

Substanz	ermittelte Konzentration [μM]
Trimer-D3 43	15
Trimer-TEG-TEG-D1 42	19
Trimer-Diamin 40	23
Aminotrimer 38	30
Trimer-GABA-OH 39	56
Trimer-TEG-D1 44	20
Trimer-GABA-D1 41	7

Nach Bestimmung der Sättigungskonzentrationen wurden Thioflavin T Experimente durchgeführt, um die Inhibierungseffizienz zu überprüfen.

3.3.2. Thioflavin T Experimente

Thioflavin T (ThT, **46**) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher für die Erkennung von amyloiden fibrillären Strukturen genutzt wird. In Anwesenheit solcher Strukturen verändert sich das Emissionsspektrum durch batho- und hyperchrome Verschiebungen des Emissionsmaximums. Diese Änderung sollte Hinweise auf einen ThT-Protein-Komplex liefern.^[126]

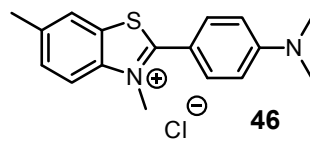


Abb. 49: Struktur von Thioflavin T (**46**).

Abb. 50 zeigt das Absorptions- und Emissionsspektrum von freiem (durchgezogene Linien) und gebundenem (gestrichelte Linien) ThT.

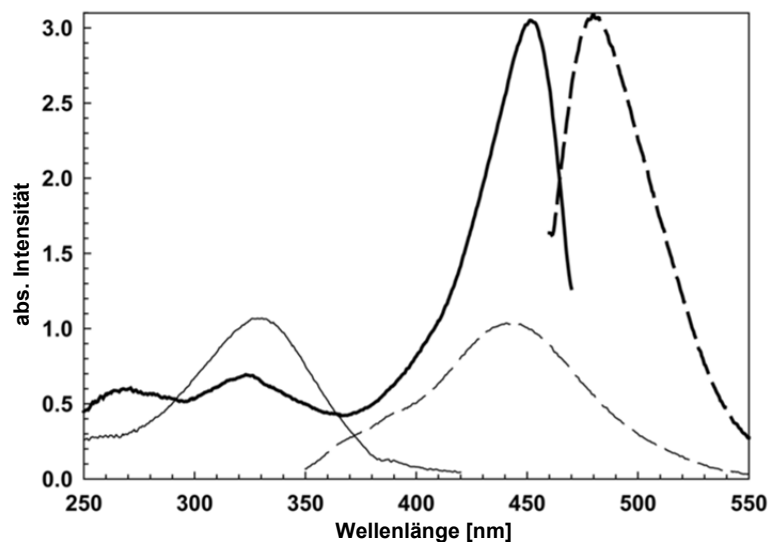


Abb. 50: Absorptions- und Emissionsspektren von freiem ThT (durchgezogene Linien) sowie an A β (1-40) gebundenem ThT (gestrichelte Linien).^[126]

Bei freiem ThT ist zu erkennen, dass die Absorptionswellenlänge bei ca. 330 nm liegt, wobei sich das Emissionsmaximum bei ca. 450 nm befindet. Nach Komplexbildung mit A β (1-40) verschiebt sich die Anregungswelle auf ca. die der Emission von freiem ThT. Das Emissionsmaximum ändert seine Lage auf ca. 490 nm.

ThT-Assays können durchgeführt werden, um amyloide Strukturen zu quantifizieren. Somit kann A β alleine als Richtwert für die vollständige Aggregation genommen werden. In Relation dazu kann dann biophysikalisch auf die Inhibierungseffizienz von Liganden geschlossen werden. Abb. 51 zeigt die Kinetik der A β -Aggregation in ThT-Assays.

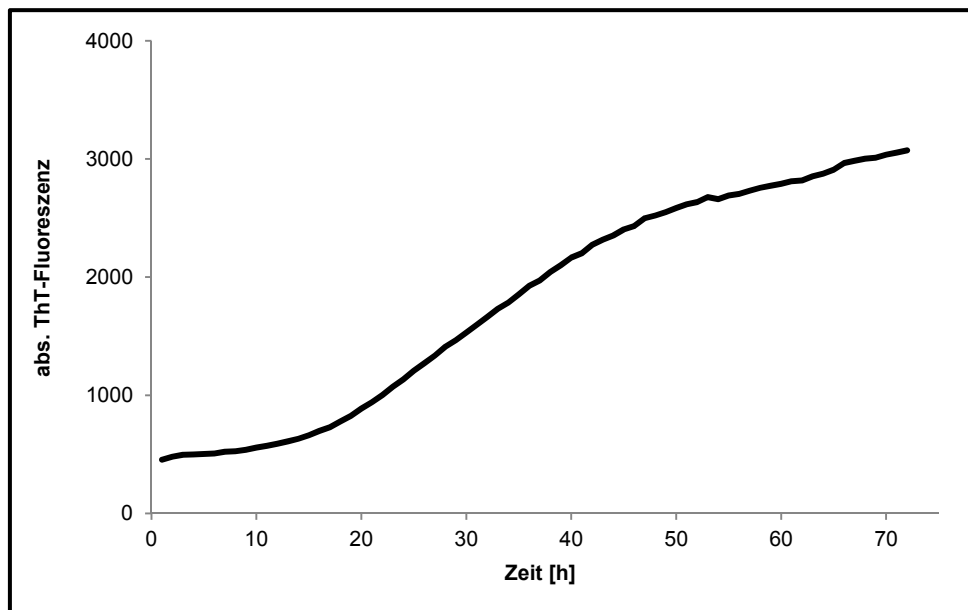


Abb. 51: Kinetik der Aggregation von 10 μ M A β (1-42) in ThT-Assays (Excitationswellenlänge: 446 nm, Emissionswellenlänge: 490 nm, 37 °C, 3 d).

Im zeitlichen Verlauf des Aggregationsprozesses war zunächst ein schwacher Anstieg der ThT-Fluoreszenz bis hin zu 15 h erkennbar. Nach diesem Zeitpunkt begann ein stärkerer Aggregationsprozess, welcher nach ca. 45 h abschwächte. Nach dieser Zeit nahm die Steigung wieder ab, was zur allmählichen Vollständigkeit der Aggregation führte.

Da die aktiven Konzentrationen ermittelt wurden, konnten mit diesen ThT-Assays der zu untersuchenden Liganden durchgeführt werden.

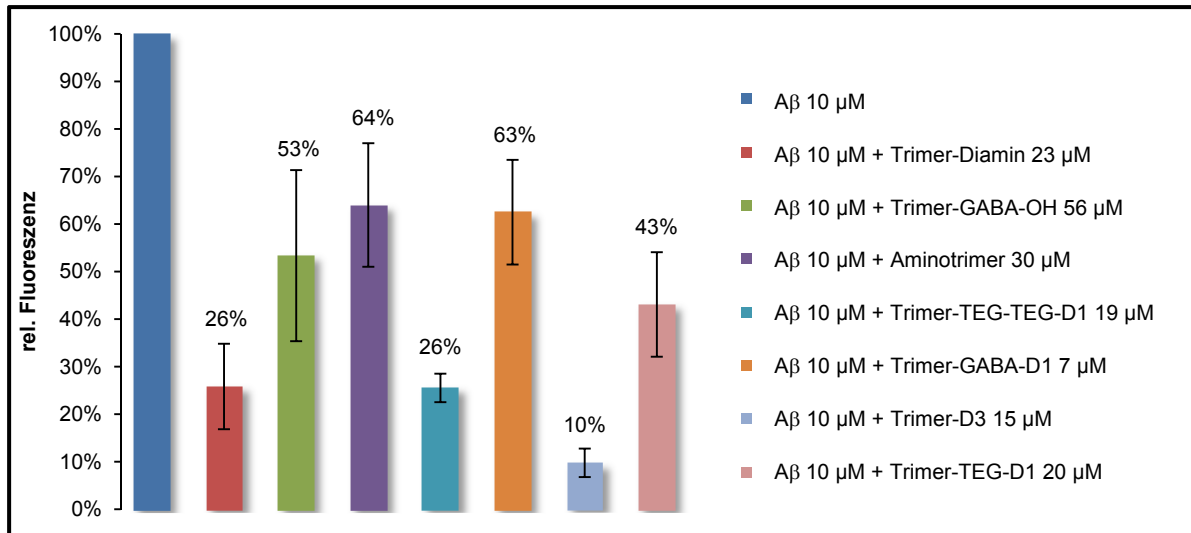


Abb. 52: ThT-Assays mit Liganden unterschiedlich aktiver Konzentrationen (Excitationswellenlänge: 446 nm, Emissionswellenlänge: 490 nm, 37 °C, 650 rpm, 5 d).

Es war zu erkennen, dass alle Liganden immer noch eine Inhibierungsaktivität besaßen. Trimer-Diamin **40**, Trimer-TEG-TEG-D1 **42** und Trimer-D3 **43** zeigten hierbei die besten Ergebnisse. Der amyloide Anteil in den Proben konnte mit diesen Liganden auf ein viertel und darunter reduziert werden. Daraufhin wurden 50mol% der Liganden bezüglich 10 μM Aβ(1-42) eingesetzt, um die Reichweite der Aktivität im substöchiometrischen Bereich zu untersuchen.

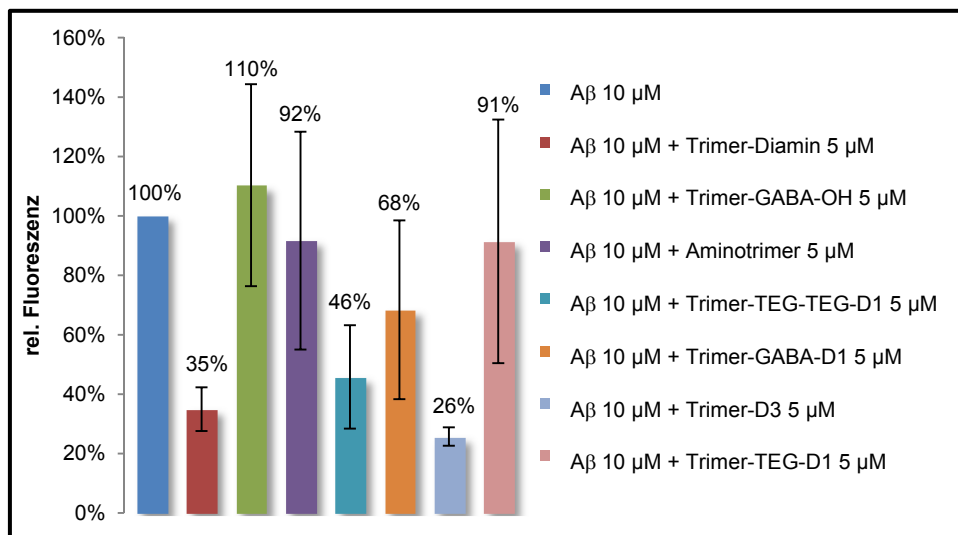


Abb. 53: ThT-Assays mit 5 μM Ligand bezüglich 10 μM Aβ(1-42) (Excitationswellenlänge: 446 nm, Emissionswellenlänge: 490 nm, 37 °C, 650 rpm, 5 d).

Aus diesen Messungen kristallisierten sich drei Verbindungen - Trimer-Diamin **40**, Trimer-TEG-TEG-D1 **42** und Trimer-D3 **43** - heraus, welche die Fluoreszenz auf un-

ter 50% hielten und somit gute inhibitorische Eigenschaften aufweisen. Daher wurden diese drei Liganden näher untersucht. Bei Inkubation von 10 μM A β mit 20mol% Ligand lieferten Trimer-Diamin **40** und Trimer-TEG-TEG-D1 **42** keine gute Inhibierungsaktivität mehr auf. Jedoch zeigte Trimer-D3 **43** noch immer eine Fluoreszenzabnahme auf 49% (Abb. 54).

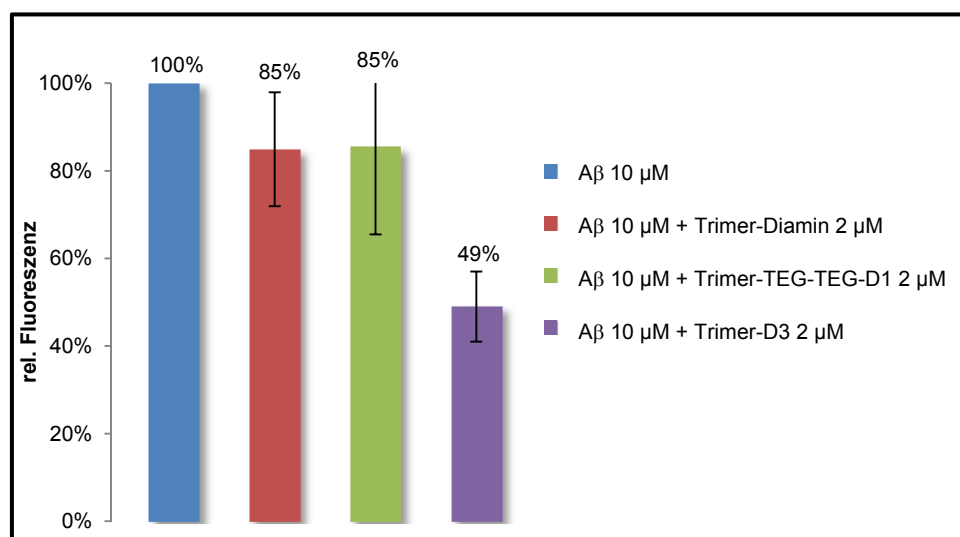


Abb. 54: ThT-Assays mit 2 μM Ligand bezüglich 10 μM A β (1-42) (Excitationswellenlänge: 446 nm, Emissionswellenlänge: 490 nm, 37 °C, 650 rpm, 5 d).

Nachdem für die Verbindungen **40** und **42** die Wirkungsgrenzen bei 20mol% erreicht worden waren, wurden nur noch für Trimer-D3 **43** niedrigere Konzentrationen getestet (Abb. 55).

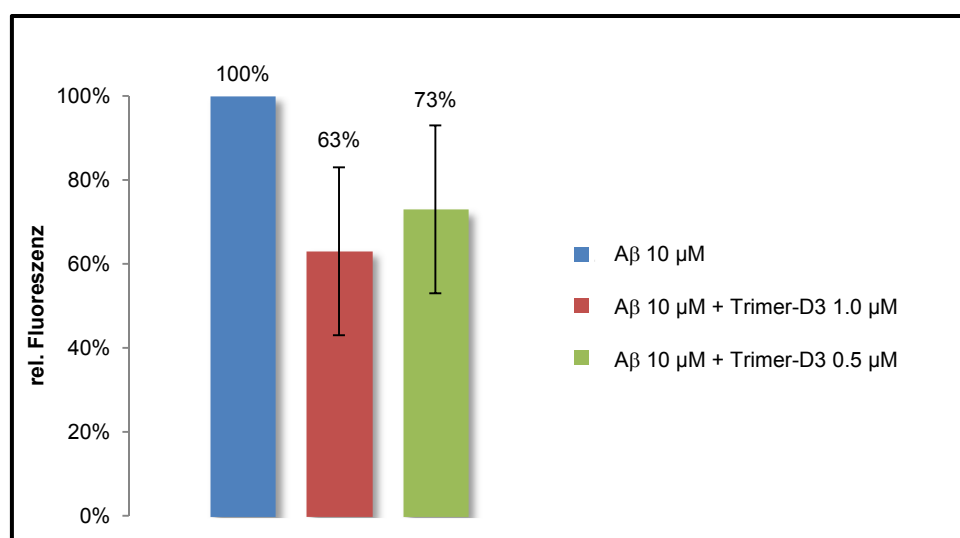


Abb. 55: ThT-Assays mit 0.5 und 1.0 μM Trimer-D3 **43** bezüglich 10 μM A β (1-42) (Excitationswellenlänge: 446 nm, Emissionswellenlänge: 490 nm 37 °C, 650 rpm, 5 d).

Hierbei ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz mit 1.0 μM Trimer-D3 **43** auf 63% erhöht wurde. Beim Einsatz von 0.5 μM dieses Hybrids wurde die Inhibierung weiter verschlechtert (73% Fluoreszenz). In diesen niedrigen Konzentrationsbereichen werden also die Aktivitätsgrenzen erreicht.

Für die Ermittlung des IC_{50} -Wertes wurden für die potentesten Verbindungen „dose-response“-Kurven aufgenommen. Hierbei wurden analog zu den ThT-Assays verschiedene Konzentrationen bei gleichbleibender $\text{A}\beta(1-42)$ -Konzentration (10 μM) angesetzt und die relative Fluoreszenz gegen den dekadischen Logarithmus der Liganden-Konzentration jeweils einem Graphen gegeneinander aufgetragen (Abb. 56). Ebenfalls wurde die Dosis-Wirkungsbeziehung von Trimer-D3-Lys **45** ermittelt, um den Einfluss einer zusätzlichen Aminosäure im Vergleich zu Trimer-D3 **43** zu überprüfen.

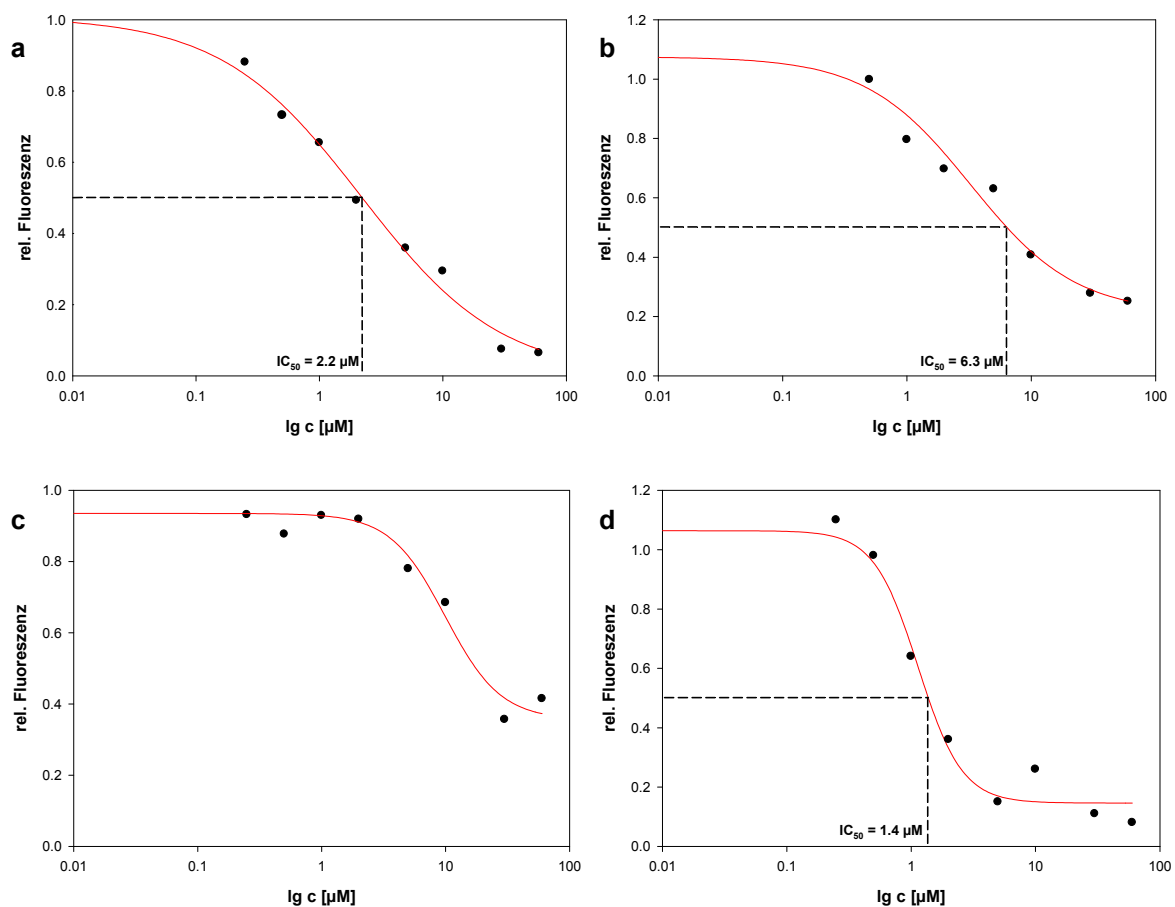


Abb. 56: Dosis-Wirkungsbeziehung der Verbindungen Trimer-D3 **43** (a), Trimer-TEG-TEG-D1 **42** (b), Trimer-Diamin **40** (c) und Trimer-D3-Lys **45** (d) bezüglich 10 μM $\text{A}\beta(1-42)$ (37 °C, 650 rpm, 5 d).

Die Auftragung von relativer Fluoreszenz gegen die Ligandkonzentration in logarithmischer Form zeigte sigmoidale Kurvenverläufe. Hierbei liegt der IC_{50} -Wert im Idealfall im Wendepunkt der Funktion bei gleichzeitiger Inhibierung auf 50% relativer Fluoreszenzintensität. Jedoch konnte nie eine vollständige Inhibierung (0% Fluoreszenz) erreicht werden, wodurch der Wendepunkt des Graphen und 50% der relativen Fluoreszenz nicht genau übereinstimmten. Daraufhin wurde für die Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Schnittpunkt des Graphen mit der horizontalen Linie bei 50% relativer Fluoreszenz ausgewählt. Für Trimer-D3 **43** wurde ein IC_{50} -Wert von 2.2 μM , für Trimer-TEG-TEG-D1 **42** 6.3 μM und für Trimer-D3-Lys **45** 1.4 μM ermittelt. Für Trimer-Diamin **40** wurde kein IC_{50} -Wert bestimmt, da der Wendepunkt der Kurve und der Wert für 50% relative Fluoreszenz zu stark voneinander abweichen. Außerdem werden bei höheren Ligand-Konzentrationen (30 und 60 μM) immer noch Fluoreszenzwerte um 40% erreicht, was im Vergleich zu den anderen Liganden zu hoch ist. Die über ThT-Assays ermittelten IC_{50} -Werte geben Anzeichen für substöchiometrische Wirkungsweisen. Alle ermittelten Werte liegen unterhalb der eingesetzten A β Konzentration (10 μM).

Im nächsten Abschnitt werden Konformationsänderungen von A β mittels CD-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurden substöchiometrische Mengen an Ligand verwendet.

3.3.3. CD-Messungen

Die Überprüfung von strukturellen Veränderungen des A β -Peptids erfolgte mit CD-Spektroskopie. Als Referenzprobe wurde zunächst A β (1-42) alleine vermessen. Hierbei wurde A β in Puffer bei 850 rpm und 25 °C für 4 d inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde dann jeweils von dieser Probe ein CD-Spektrum aufgenommen. Die Zusammenstellung der Spektren ist in Abb. 57 gezeigt.

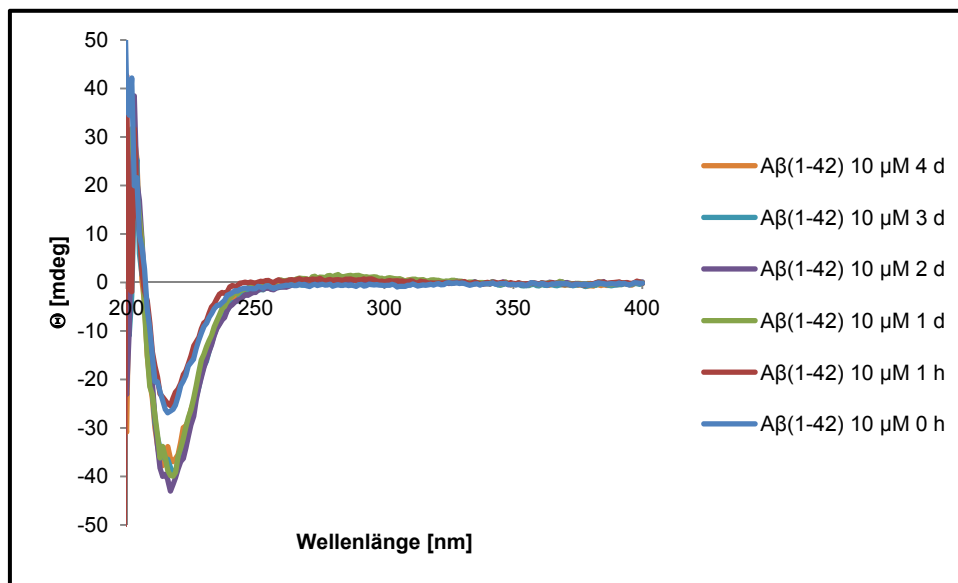


Abb. 57: CD-Messungen von 10 µM A β (1-42) über 4 d (25 °C, 850 rpm, 4 d).

Die CD-Spektren zeigen eine negative Bande bei 218 nm, welche ab 1 d Inkubation verstärkt wird. Diese Bande ist charakteristisch für die Sekundärstruktur des A β -Peptids.^[127]

Für den direkten Vergleich wurde das CD-Spektrum von A β (1-42) nach 4 d in den folgenden Abbildungen mit eingefügt. Im Allgemeinen ist zu erkennen, dass die negative Bande bei 218 nm unter Einfluss der Liganden im Vergleich zur A β Referenz zu keinem Zeitpunkt soweit ausgeprägt ist (Abb. 58), was bedeutet, dass die Liganden die vollständige Sekundärstruktur von A β (1-42) verhindern. Hinzu kommt ein positiver Cotton-Effekt im Wellenlängenbereich von 250-300 nm. Die CD-Inaktivität der Liganden in diesem Bereich und die Absorptionsbereiche der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und der Liganden selbst (Abb. 59) im Bereich zwischen 260 und 320 nm^[128] geben Aufschluss über eine Interaktion mit der KLVFF-Sequenz des A β -Peptids.

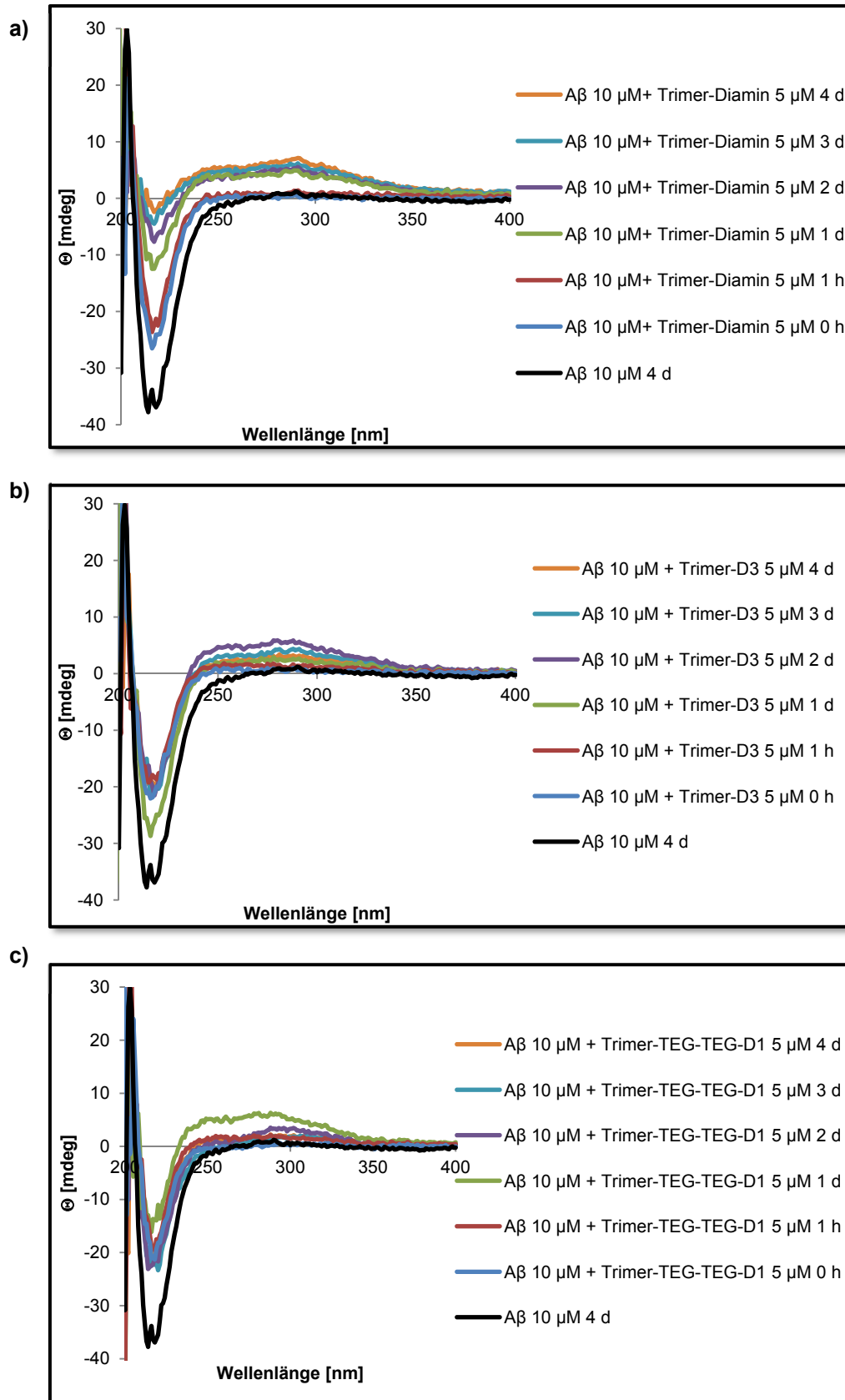


Abb. 58: CD-Messungen von a) 5 μM Trimer-Diamin 40 mit 10 μM $\text{A}\beta(1-42)$ über 4 d (25 $^{\circ}\text{C}$, 850 rpm, 4 d), b) 5 μM Trimer-D3 43 mit 10 μM $\text{A}\beta(1-42)$ über 4 d und c) 5 μM Trimer-TEG-TEG-D1 42 mit 10 μM $\text{A}\beta(1-42)$ über 4 d.

Trimer-Diamin **40** zeigte im Verlauf der Zeit eine Auflösung der Sekundärstruktur des A β -Peptids aufgrund der Abschwächung der negativen Bande bei 218 nm. Die Verbindungen Trimer-D3 **43** und Trimer-TEG-TEG-D1 **42** zeigten zwar keine Auflösung der negativen charakteristischen Bande, aber eine leichte Abschwächung des Signals bei 218 nm. Der positive CD-Effekt zwischen 250 und 300 nm war dennoch bei allen Liganden erkennbar, so dass ein ähnlicher Wirkmechanismus vermutet werden kann.

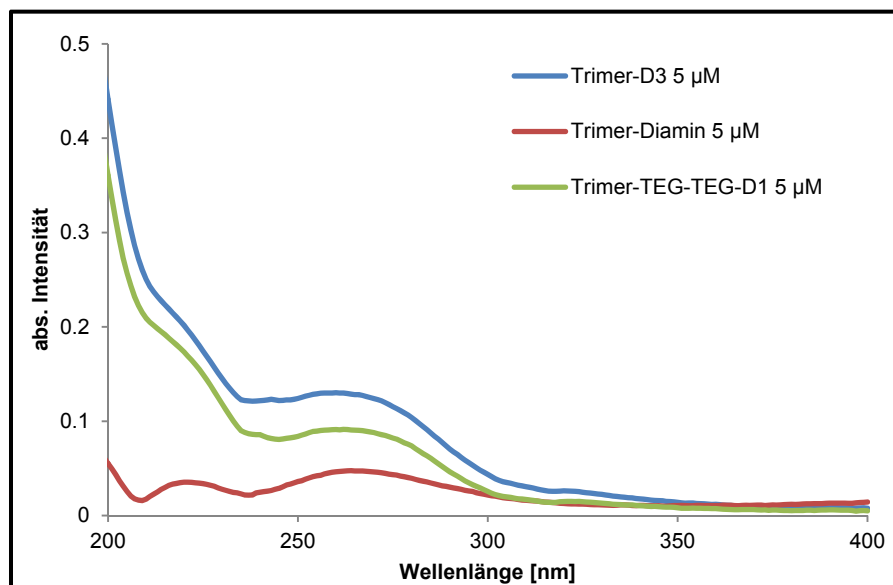


Abb. 59: UV/Vis-Spektrum von 5 µM der Liganden Trimer-D3-43, Trimer-Diamin 40 und Trimer-TEG-TEG-D1 42 bei 25 °C.

3.3.4. PICUP-Experimente

Die photoinduzierte Vernetzung von unmodifizierten Proteinen (PICUP) ist eine quantitative Methode zur Ermittlung der Größenverteilung von Oligomeren. Aufgrund der metastabilen Natur von Proteinaggregaten ist es mit klassischen Methoden wie beispielsweise Elektrophorese, Chromatographie oder dynamische Lichtstreuung schwierig die Größenverteilung quantitativ zu ermitteln. PICUP stabilisiert oligomere Strukturen über kovalente Verknüpfungen. Mechanistisch gesehen ist in diesem Experiment die Photo-Oxidation von Ru^{2+} in einem Tris(bipyridyl) Ru^{II} -Komplex zu Ru^{3+} involviert. Die Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Anwesenheit eines Elektronenakzeptors ruft diese Oxidation hervor. Ru^{3+} ist ein starkes Oxidationsmittel und abstrahiert einem benachbarten Protein ein Elektron, wodurch ein Proteinradikal gebildet wird. Diese hochreaktive Spezies reagiert dann mit einem weiteren monomeren Protein zu einem dimeren Radikal. Das kovalent verknüpfte, stabile Dimer wird darauf folgend durch Abspaltung eines Wasserstoffradikals gebildet. Die dimere Proteinform kann durch einen analogen Mechanismus mit einem weiteren Monomer oder Dimer zu höheren oligomeren Strukturen reagieren.^[129,130] Abb. 60 zeigt die mechanistische Darstellung der Stabilisierung der Oligomere.

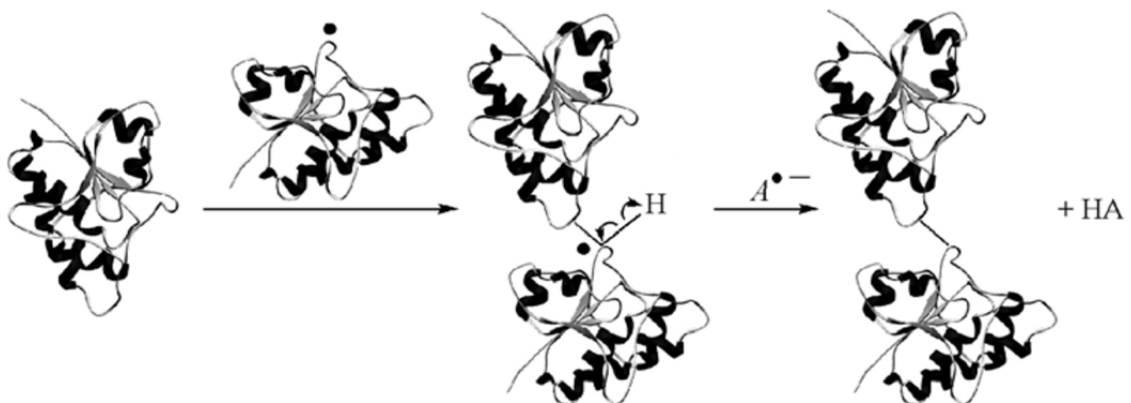


Abb. 60: Radikalischer Mechanismus der Bildung eines kovalent verknüpften, stabilen Proteindimers.^[129]

Bitan und *Teplow* führten PICUP Experimente mit $A\beta(1-40)$ durch. Über SDS-PAGE und densitometrischen Analysen konnte eine oligomere Größenverteilung ermittelt werden.^[131] Abb. 61 zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE und Densitometrie.

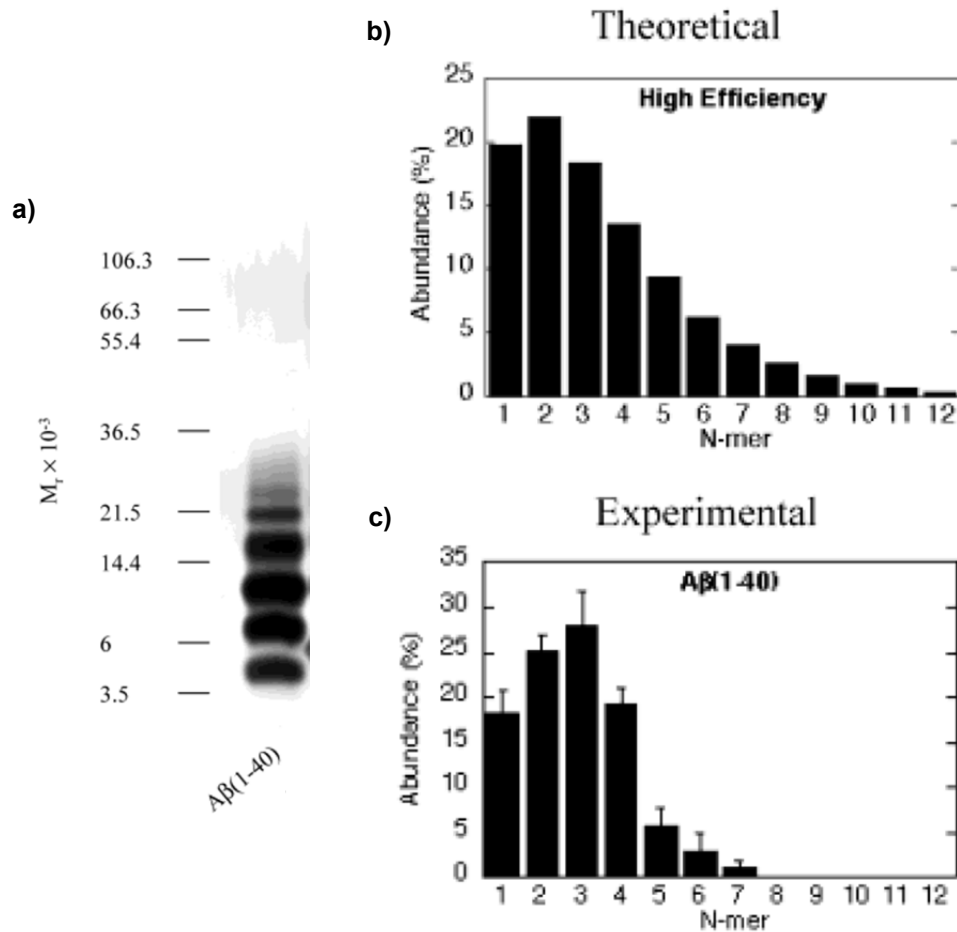


Abb. 61: a) SDS-PAGE von aggregatfreiem A β (1-40) als Produkt von PICUP. b) Theoretische Größenverteilung von A β (1-40). c) Beobachtete Größenverteilung von A β (1-40).^[131,132]

Die SDS-PAGE (Abb. 61a) zeigt unterschiedliche Intensitäten der entstandenen oligomeren Formen. Es ist dabei zu erkennen, dass monomere bis tetramere Strukturen die Hauptprodukte der PICUP Experimente sind. Theoretische Berechnungen zeigen, dass die Dimere die Hauptprodukte gefolgt von einem exponentiellen Abfall zu höheren Oligomeren sind (Abb. 61b). Die Hauptbildung von monomeren bis tetrameren Strukturen geht aus den experimentellen Daten der Densitometrie hervor, was mit dem Ergebnis der SDS-PAGE konform ist (Abb. 61c).

PICUP Experimente wurden in dieser Arbeit von *Bitan* durchgeführt. Dabei wurde überprüft, welche Wirkung Trimer-D3 **43** und Trimer-TEG-TEG-D1 **42** auf die Stabilität der Oligomere haben. Im Vergleich zum amyloidogenen Protein alleine wurden in anderen Proben mit A β (1-42) unterschiedliche Konzentrationen an Ligand hinzugefügt. Abb. 62 zeigt die densitometrischen Ergebnisse mit Trimer-D3 **43** und Trimer-TEG-TEG-D1 **42**.

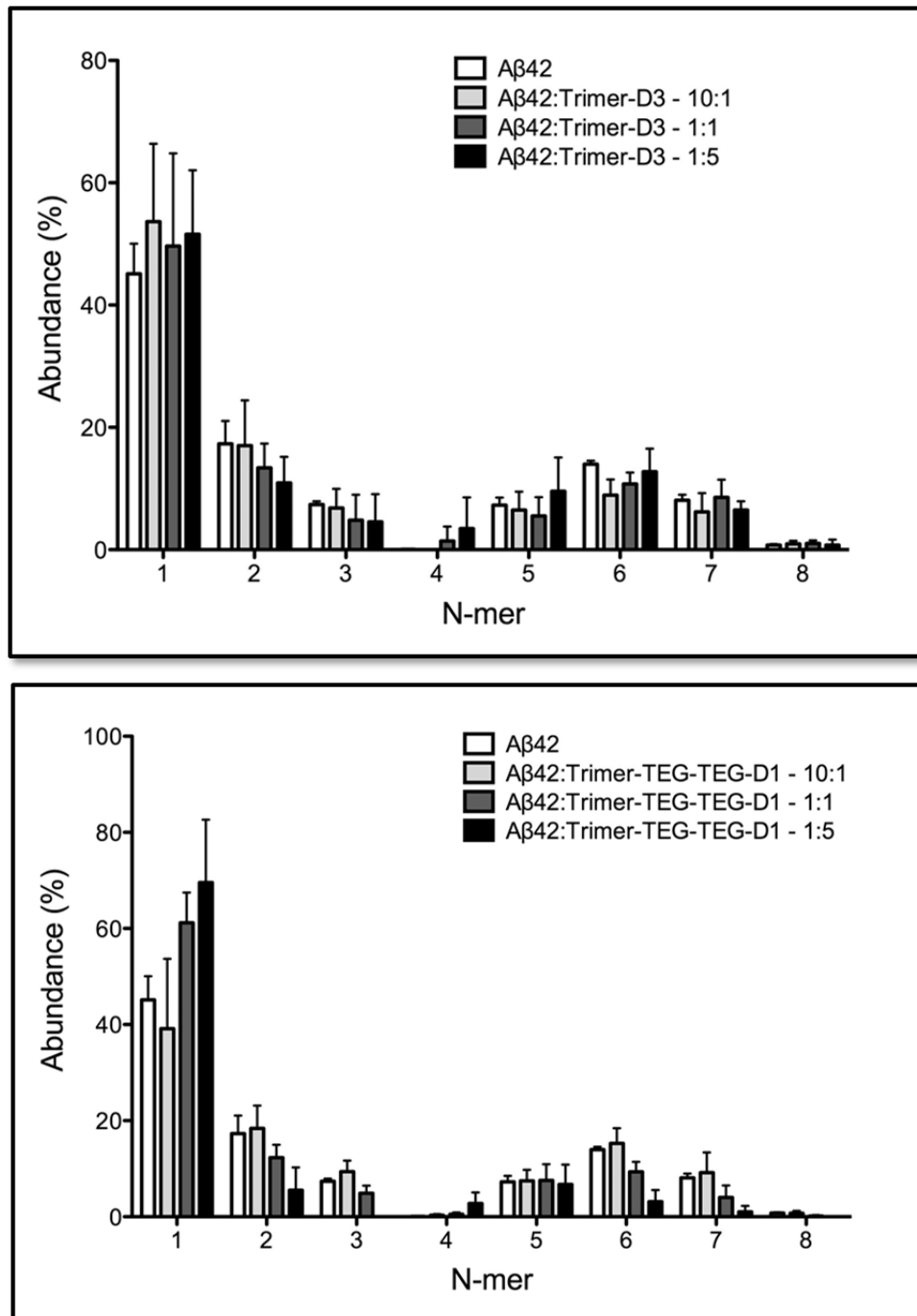


Abb. 62: Densitometrische Analyse der „cross-linking“ Produkte von 30 μM A β (1-42) mit Trimer-D3 **43** (oben) und Trimer-TEG-TEG-D1 **42** (unten) in verschiedenen Konzentrationen.

Mit Trimer-D3 **43** ist in der Größenverteilung zu erkennen, dass im Vergleich zu A β (1-42) alleine in der Größenverteilung keine signifikanten Unterschiede mit dem Einsatz des Liganden erzielt wurden. Ein kleiner Effekt konnte in der Bildung von Tetrameren erreicht werden. Bei dem Einsatz von 150 μM an Ligand konnte eine Bildung von Tetrameren beobachtet werden, wohingegen A β (1-42) alleine keine tetrameren Strukturen detektieren ließ.

Trimer-TEG-TEG-D1 **42** hingegen zeigte einen stärkeren Effekt auf die Größenverteilung. Mit höher werdender Konzentration an Ligand konnte eine Verstärkung der Monomerstabilisierung erreicht werden. Im Vergleich dazu wurden höhere Oligomere nahezu unterdrückt. Kaum einen Unterschied wurde bei der Bildung von Pentameren detektiert. Wie auch beim Einsatz von Trimer-D3 **43** konnte bei Zusatz von 150 μM Ligand eine schwache Tetramerenbildung beobachtet werden.

Für Trimer-Diamin **40** konnten keine PICUP Experimente durchgeführt werden, da das System nur auf wasserlösliche Komponenten ausgelegt ist.

3.3.5. Transmissionselektronenmikroskopie Experimente

Für die Visualisierung von substöchiometrischen Effekten im Hinblick auf die $\text{A}\beta$ -Aggregation wurden TEM-Aufnahmen von *Roychaudhuri* angefertigt. Hierbei wurde zunächst $\text{A}\beta(1-42)$ alleine als Referenz vermessen (Abb. 63).

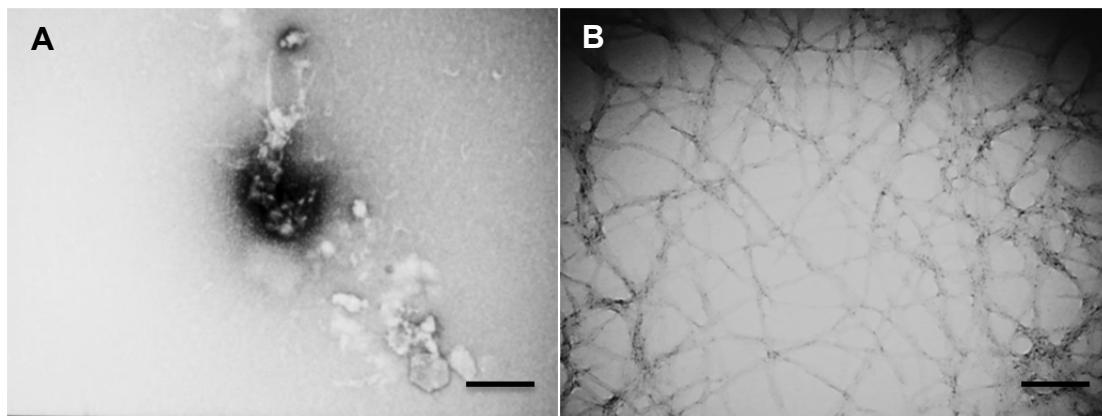


Abb. 63: TEM-Aufnahmen für 20 μM $\text{A}\beta(1-42)$ nach 0 d (A) und nach 5 d (B) (Maßstabsskala: 216 nm).

Die linke Aufnahme zeigt $\text{A}\beta(1-42)$ in seiner monomeren Form vor dem Start der Inkubation. Im rechten Bild sind Fibrillennetzwerke von $\text{A}\beta(1-42)$ nach fünf Tagen Inkubation zu erkennen. Hierbei wurde gezeigt, dass die Aggregation erfolgreich war. Dann wurde der Einfluss der $\text{A}\beta$ -Aggregation nach fünf Tagen mit den vier Liganden Trimer-D3 **43**, Trimer-Diamin **40**, Trimer-TEG-TEG-D1 **42** und Trimer-D3-Lys **45** untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 64 zusammengefasst.

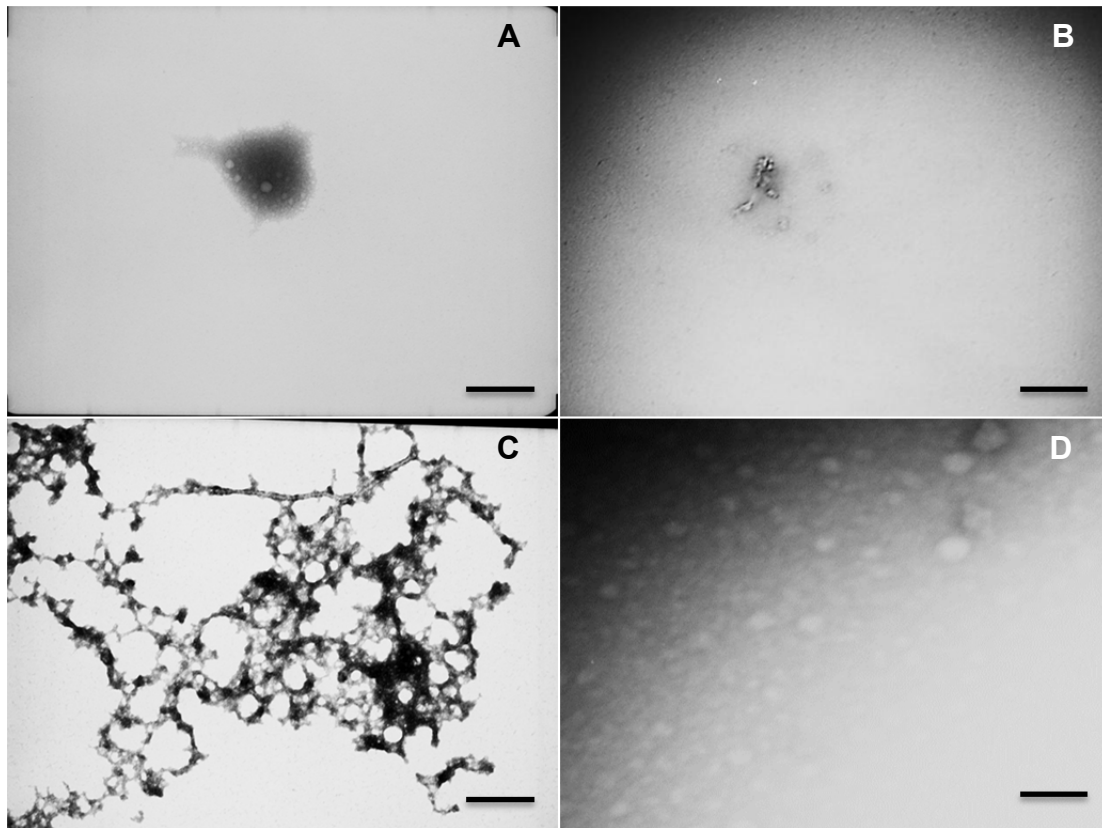


Abb. 64: TEM-Aufnahmen für 20 μM $\text{A}\beta(1-42)$ mit 10 μM der Liganden Trimer-D3 **43** (A), Trimer-Diamin **40** (B), Trimer-TEG-TEG-D1 **42** (C) und Trimer-D3-Lys **45** (D) nach 5 d (Maßstabsskala: 216 nm).

Abb. 64A zeigt kleine Aggregate mit einer Größe von circa 200 nm. Diese Agglomerate sind viel kleiner als die entstandenen Fibrillen in der Referenz und sind somit nicht mit diesen vergleichbar. Daraus lässt sich schließen, dass Trimer-D3 **43** einen Effekt auf die $\text{A}\beta$ -Aggregation ausübt und andere Morphologien induziert. Genauso zu interpretieren sind die durch Trimer-Diamin **40** und Trimer-D3-Lys **45** entstandenen Strukturen (Abb. 64B und D). Dabei wurden etwa 100 nm (Abb. 64B) beziehungsweise 50 nm (Abb. 64D) große Agglomerate gebildet. Der Einfluss von Trimer-TEG-TEG-D1 **42** führte zu einem größeren Aggregatnetzwerk, welches sich jedoch ebenfalls morphologisch von der Referenz unterscheidet.

Ebenfalls wurden TEM-Aufnahmen der Liganden alleine über 5 d Inkubation angefertigt. Die Größe der gebildeten Aggregate betrug 200 nm für Trimer-D3 **43** (Abb. 65A) beziehungsweise 150 nm für Trimer-Diamin **40** (Abb. 65B). Trimer-TEG-TEG-D1 **42** bildete größere Agglomerate von circa 700 nm (Abb. 65C), Trimer-D3-Lys **45** formte definierte Strukturen von etwa 800 nm Größe (Abb. 65D). Diese definierte Morphologie konnte jedoch nicht bei der Inhibierung von $\text{A}\beta(1-42)$ beobachtet werden, was daraus schließen lässt, dass Trimer-D3-Lys **45** mit dem Protein wechselwirkt.

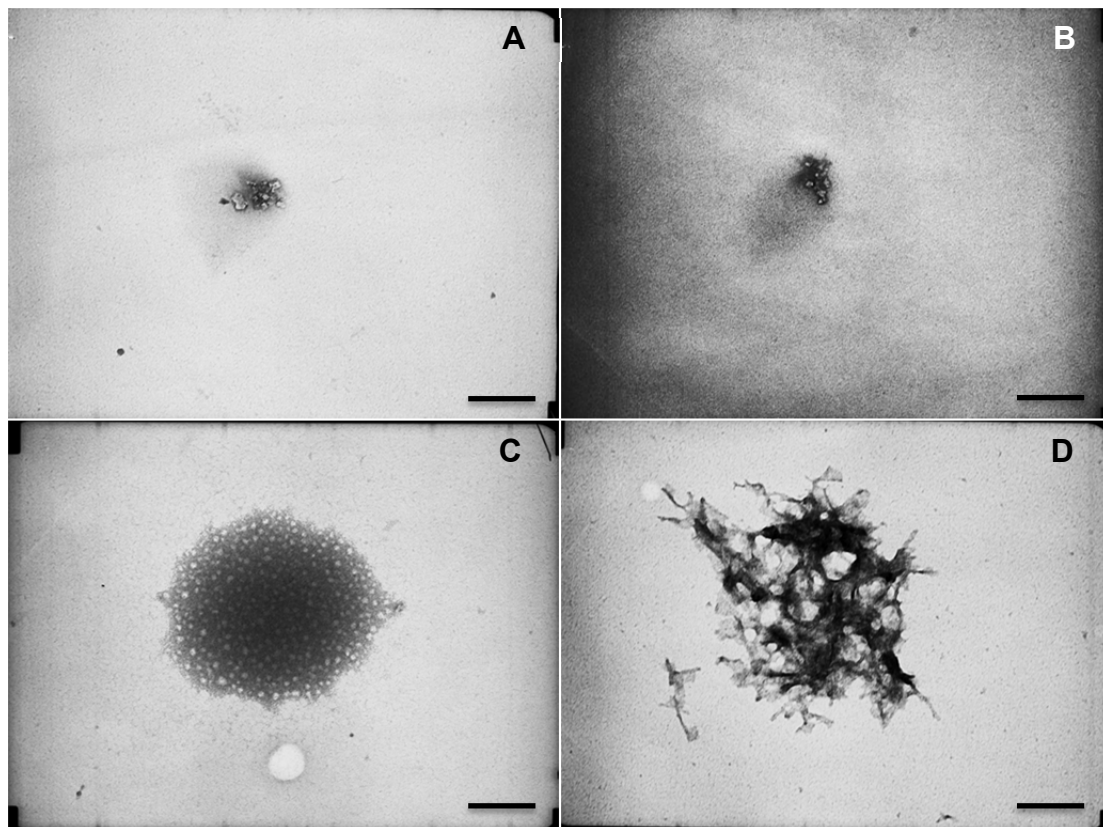


Abb. 65: TEM-Aufnahmen für 10 μM der Liganden Trimer-D3 43 (A), Trimer-Diamin 40 (B), Trimer-TEG-TEG-D1 42 (C) und Trimer-D3-Lys 45 (D) nach 5 d (Maßstabsskala: 216 nm).

3.3.6. Zusammenfassung

Der Einfluss substöchiometrischer Mengen von Aminopyrazolliganden auf die Aggregation des A β -Peptids wurde in diesem Abschnitt untersucht. Vorarbeiten von *März-Berberich* zeigten, dass nach Abtrennung größerer Aggregate von den Liganden durch Filtration und Zentrifugation immer noch inhibierende Effekte bezüglich der A β -Aggregation zu beobachten waren. Daraus konnte geschlossen werden, dass geringere Konzentrationen an Liganden ebenfalls aktiv gegen die A β -Agglomeration sind. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss substöchiometrischer Mengen von Aminopyrazolliganden auf die Aggregation des A β -Peptids untersucht.

Zunächst wurden die aktiven Konzentrationen der vorhandenen Liganden ermittelt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationsreihen hergestellt und über UV/Vis-Spektroskopie vermessen. Die Probe mit 60 μM Ligand wurde noch zentrifugiert und der Überstand vermessen. Anschließend wurden die ermittelten Ligandkonzentratio-

nen für ThT-Assays eingesetzt. Dabei waren Trimer-D3 **43**, Trimer-TEG-TEG-D1 **42** und Trimer-Diamin **40** die effizientesten Inhibitoren. 2 μM Trimer-D3 **43** zeigten letztlich die stärkste Aktivität gegen die A β -Aggregation. Die ermittelten IC₅₀-Werte lagen für Trimer-D3 **43** bei 2.2 μM und für Trimer-TEG-TEG-D1 **42** bei 6.3 μM .

Die Überprüfung der Konformationsänderung des A β -Peptids durch Inkubation mit 50mol% an Liganden wurde mittels CD-Spektroskopie beobachtet. Dabei zeigte A β (1-42) als Referenz eine charakteristische negative Bande bei 218 nm, was der Sekundärstruktur des Peptids zugeordnet werden kann. Durch den Einfluss der Liganden kam es im Verlauf der Zeit zu einer Abschwächung der Bande und dazu konnte ein positiver Cotton-Effekt zwischen 260 und 320 nm beobachtet werden, was auf eine Wechselwirkung der Liganden mit der KLVFF-Sequenz des A β -Peptids zurückzuführen ist. Im Gegenzug zeigten die Liganden alleine keine CD-Aktivität in diesem Bereich.

Mit den beiden wasserlöslichen Verbindungen Trimer-D3 **43** und Trimer-TEG-TEG-D1 **42** wurden PICUP-Experimente durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Trimer-D3 **43** keine signifikanten Effekte auf die oligomere Größenverteilung zeigte. Ein kleiner Effekt konnte nur in der Bildung von Tetrameren beobachtet werden. Trimer-TEG-TEG-D1 **42** hingegen beeinflusste die Größenverteilung in höherem Maße. Die Bildung von Monomeren war mit diesem Liganden bevorzugt stabilisiert, wohingegen höhere Oligomere nicht gebildet wurden.

TEM-Experimente gaben Aufschluss über die Morphologieänderung des A β -Peptids durch Einfluss substöchiometrischer Mengen an Ligand. Für A β (1-42) alleine als Referenz konnte ein Fibrillennetzwerk beobachtet werden. Die Inkubation mit den Liganden führte zu kleineren Agglomeraten anderer Morphologie. Ebenfalls zeigten TEM-Aufnahmen der Liganden alleine morphologisch andere Zusammenschlüsse, welche nicht mit der Referenz und den Inhibierungsversuchen der Liganden mit dem A β -Peptid zu vergleichen waren.

3.4. Hybridverbindungen in Kombination mit Antikörpern zur verbesserten Erkennung von A β

Durch die therapeutischen Limitierungen für symptomatische Behandlungen neurodegenerativer Krankheiten bietet der Zweig der Immunotherapie einen neuen Fokus in der Behandlung solcher Beschwerden. Der Ansatz liegt in der passiven Immunisierung durch Antikörper.^[111] Durch die Kombination von Antikörpern als Selektoren und Aminopyrazol-Derivaten als β -Faltblattbrecher-Einheit könnte eine gezielte Wirkungsweise bezüglich pathogener Proteinaggregationen erreicht werden. Die Überlegung bestand darin, dass ein Aminopyrazol-Chelator und ein His-getaggtter Antikörper über Ni²⁺-Ionen verknüpft werden könnten.

März-Berberich konnte das Aminopyrazoltrimer-Grundgerüst über einen Spacer mit einer mono-NTA-Einheit verknüpfen. Unter Verwendung der Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie konnte der verwendete Antikörper W226-scFv nachgewiesen werden, jedoch nicht der gewünschte Trimer-mono-Ni^{II}-NTA-W226-scFv Komplex. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Bindung des Trimer-mono-NTA Bausteins mit einem His-getaggtten Antikörper über Ni²⁺-Ionen Komplexierung nicht stark genug war.^[120]

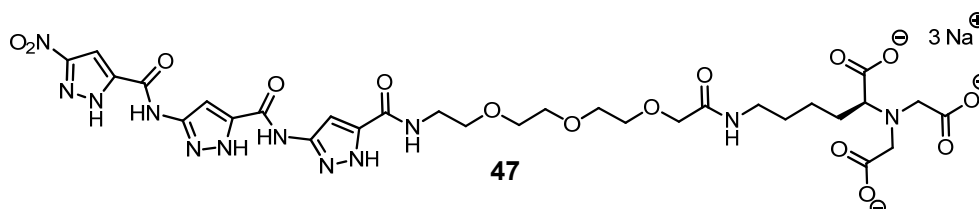


Abb. 66: Trimer-mono-NTA 47 nach März-Berberich.^[120]

Um eine stärkere Bindung zu erzielen wurde überlegt, das Trimer mit mehreren NTA-Einheiten auszustatten. Lata et al. entwickelten eine Synthese, in der drei NTA-Gruppen in einem Molekül vorhanden waren. Hierbei diente 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan (**52**, Cyclam) als Plattform für die Anbindung dreier NTA-Einheiten. Dieser multivalente Chelator zeigte in Bindungsexperimenten mit Oligohistidinen subnanomolare Affinitäten.^[133] Heeres et al. funktionalisierten das Tris(NTA)-Cyclam **53** an der vierten heteroatomaren Position mit einem Z-geschützten Aminohexyl-Linker, der nach Entschützung eine terminale Amino-Gruppe

aufwies, wodurch eine C-terminale Kupplungsmöglichkeit für die Trimer-Säure zur Verfügung steht.^[134]

3.4.1. Synthese des Trimer-tris(NTA)-Cyclam Chelators

Der erste Syntheseschritt begann mit einer zweifach orthogonal geschützten Glutaminsäure, welche mit einem vierfachen Überschuss an *tert*-Butylbromoacetat umgesetzt wurde, wodurch das Grundgerüst für den NTA-Chelator erhalten wurde. Die Benzylesterspaltung erfolgte unter reduktiven Bedingungen, und führte zur freien Carbonsäure, die den Kupplungspunkt mit dem Cyclam **52** darstellt.

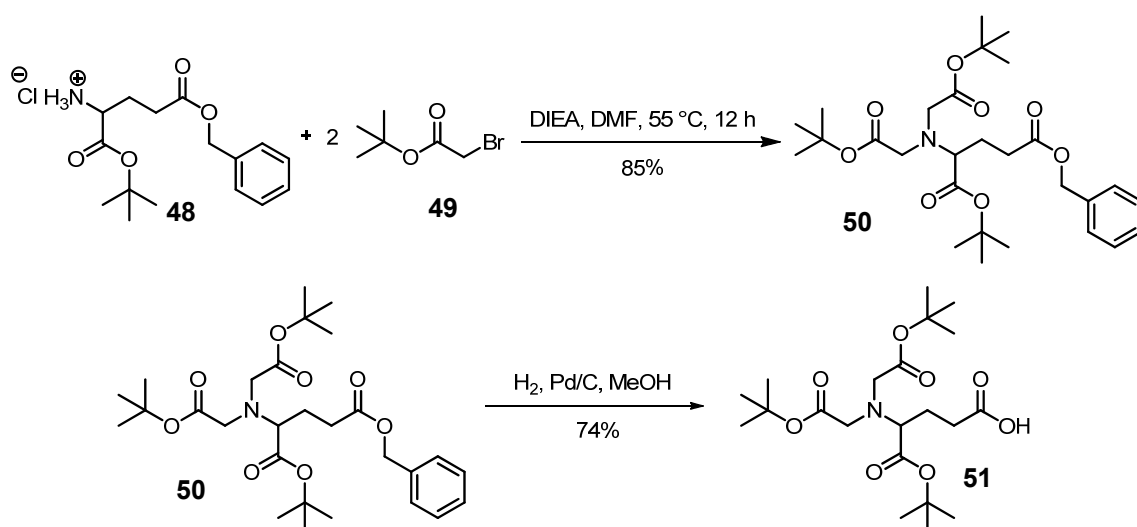


Abb. 67: Syntheschema zur Herstellung des Tris(*t*Bu-NTA)-Bausteins **51**.

Die Funktionalisierung des Cyclams **52** mit Tris(*t*Bu-NTA) **51** in dreifachem Überschuss erfolgte unter Peptidkupplungsbedingungen.

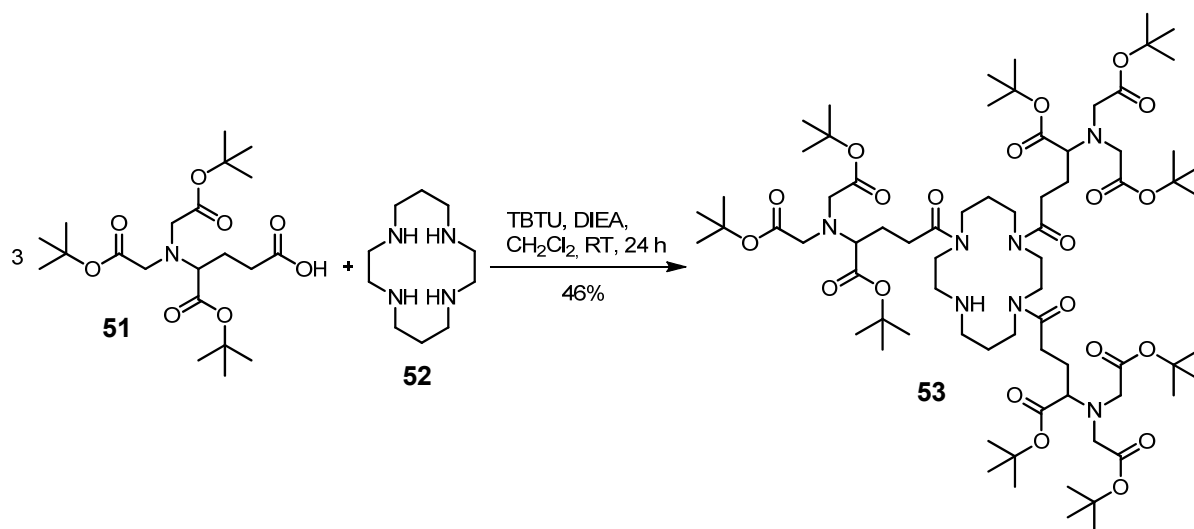


Abb. 68: Synthese von Tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam **53**.

Als Referenzsubstanz ohne β -Faltblattbrecher-Einheit wurde Tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam **53** mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ 7:1 entschützt und in das Natrium-Carboxylat **54** überführt.

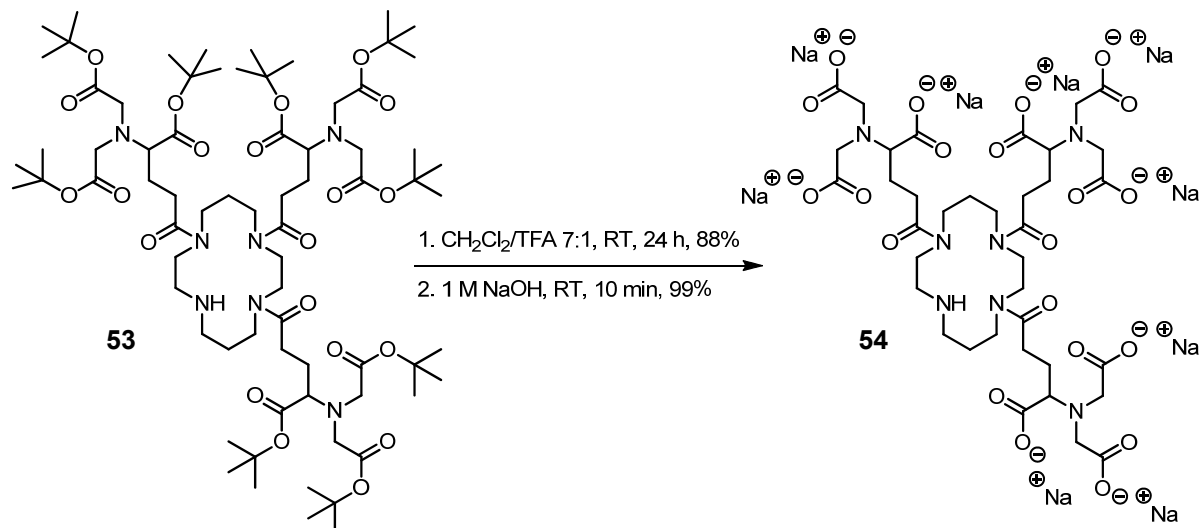


Abb. 69: Reaktionsstufen zur Herstellung des Tris(NTA)-Cyclam Natriumsalzes **54**.

Bei der Funktionalisierung der vierten Amino-Gruppe des Cyclam-Bausteins wurden drei unterschiedliche Spacerlängen verwendet. Für einen kurzen, mittellangen und langen Spacer wurden C_3 -, C_6 - und C_{12} -Linker ausgewählt.

Die Umsetzung eines kurzen Spacers mit Tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam **53** erfolgte mit Z-3-Aminopropionsäure unter den vorher verwendeten Kupplungsbedingungen.

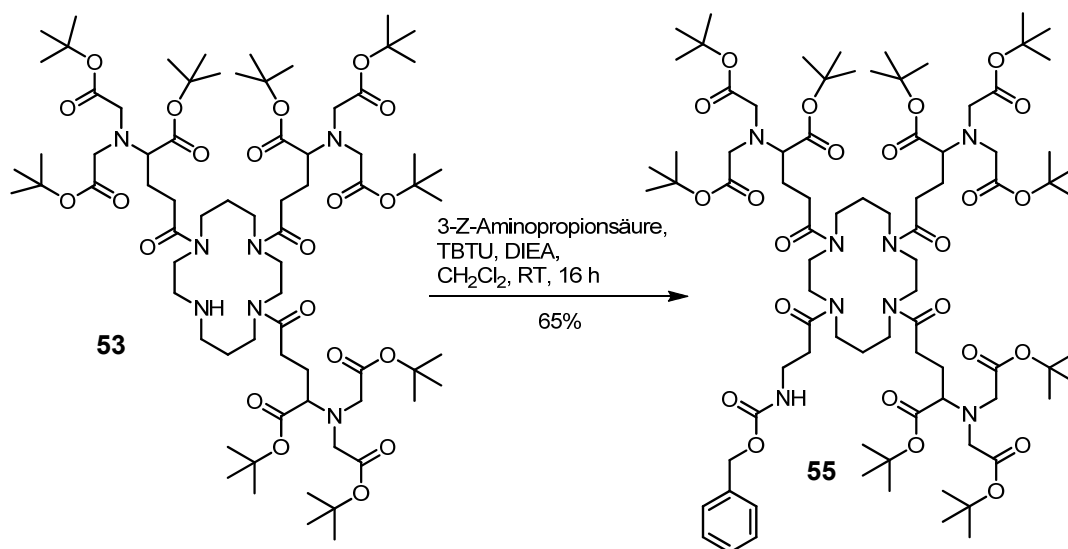


Abb. 70: Synthese des C_3 -funktionalisierten Cyclam-Derivates **55**.

Die Abspaltung der Z-Schutzgruppe unter reduktiven Bedingungen erfolgte nahezu quantitativ.

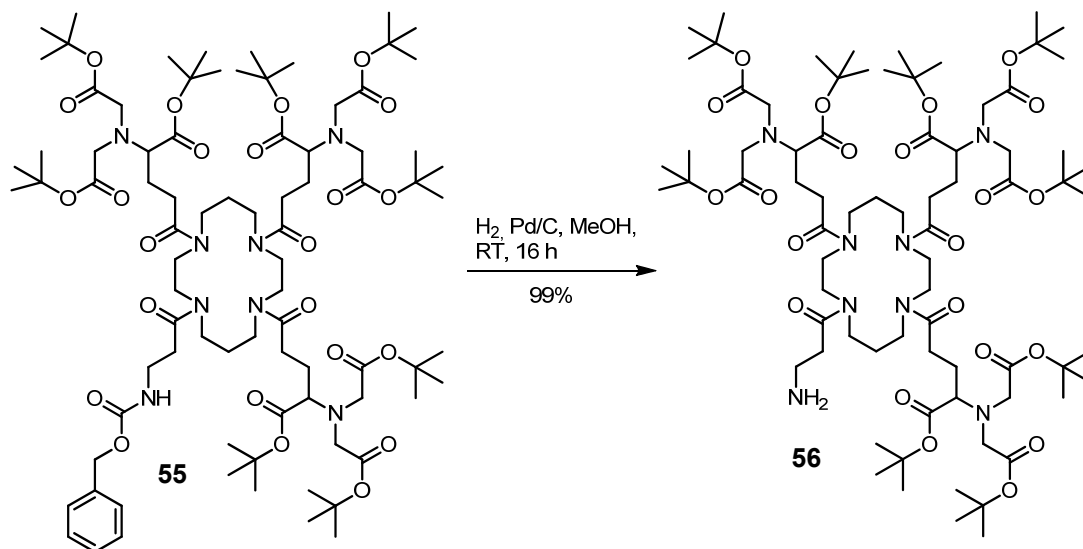


Abb. 71: Reaktionsgleichung zur Entschützung der terminalen Amino-Gruppe.

Durch die Entschützung der Amino-Gruppe ist diese nun für eine Peptidkupplungsreaktion mit der Trimer-Säure **57** verfügbar. Dieser wurde vorher durch Methylester-spaltung des Trimers **27** mit Lithiumhydroxid nach bekannter Vorschrift erhalten.^[15] Die Durchführung der Kupplung führte jedoch zu keinem erfolgreichen Ergebnis, da kein Umsatz während der Reaktion beobachtet werden konnte. Möglicherweise könnte aufgrund der kurzen Spacerlänge und der geschützten NTA-Chelatoren eine sterische Abschirmung, durch welche das Annähern der Carbonsäurefunktion an die freie Amino-Gruppe verhindert wird, vorliegen.

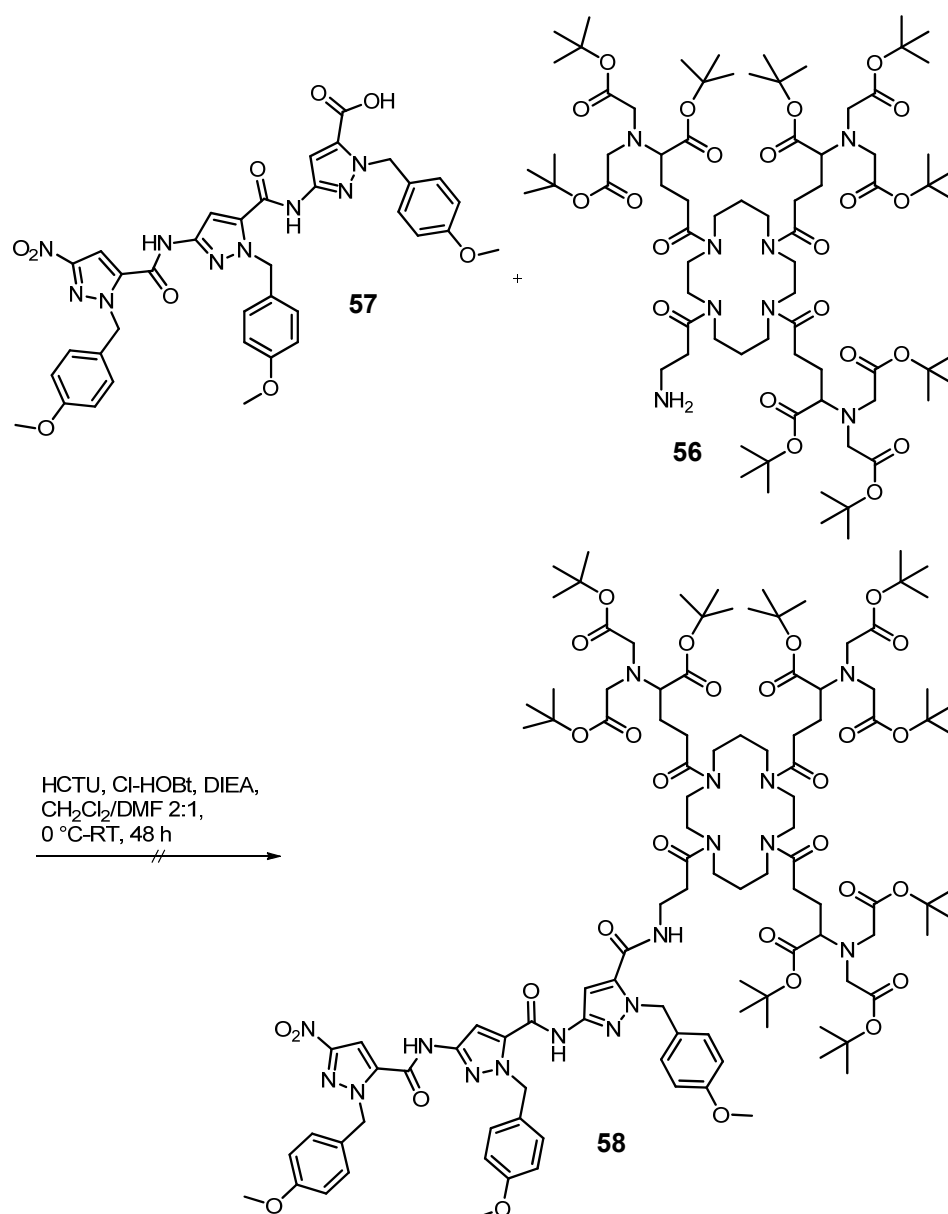


Abb. 72: Reaktionsschema zum Versuch der Funktionalisierung der Trimer-Säure **57 über einen C₃-Spacer mit dem Cyclam-Derivat **56**.**

Der nächste Ansatz war die Funktionalisierung von Tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam **53** mit einem C₆-Spacer. Dabei wurde analog zur vorherigen Vorgehensweise 6-Z-Aminohexansäure eingesetzt. Unter Peptidkupplungsbedingungen konnte 6-Z-Aminohexylcarbonyl-tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam **59** in guten Ausbeuten erhalten werden. Die anschließende Abspaltung der Z-Schutzgruppe unter reduktiven Bedingungen verlief ebenfalls ohne Probleme mit lohnenswerten Ausbeuten und stand nun für den Kupplungsschritt mit der Trimer-Säure **57** zur Verfügung.

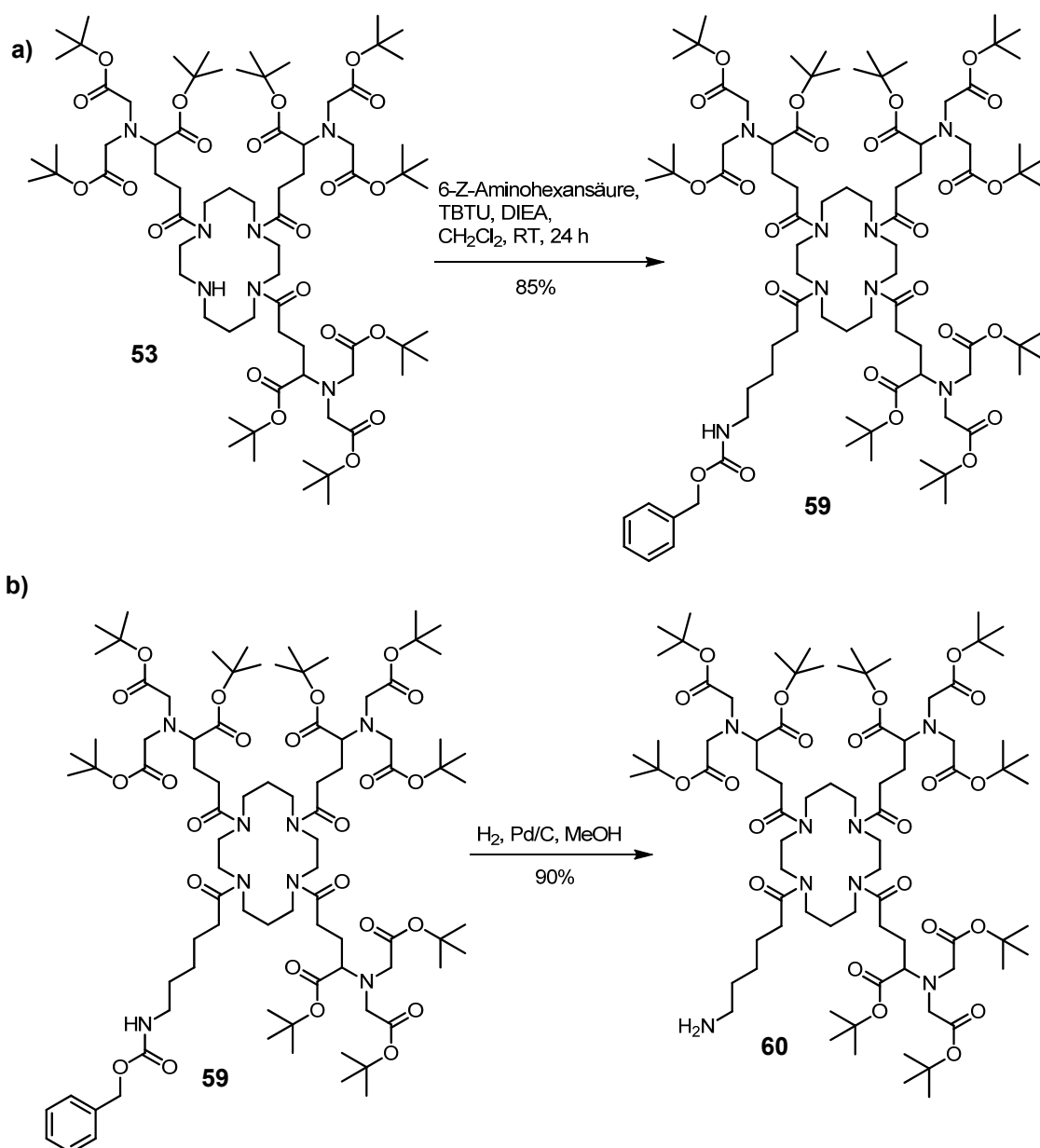


Abb. 73: a) Reaktionsgleichung zur C₆-Funktionalisierung des Cyclam-Derivates **59**. b) Reaktionsschema zur Abspaltung der Z-Schutzgruppe unter reduktiven Bedingungen.

Der nächste entscheidende Schritt war nun die Kupplung der Cyclam-Verbindung mit der Trimer-Säure **57**. Nach einer Reaktionszeit von 48 h konnte ein Umsatz via DC festgestellt werden. Nach Aufarbeitung und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung konnte die gewünschte Zielverbindung isoliert werden.

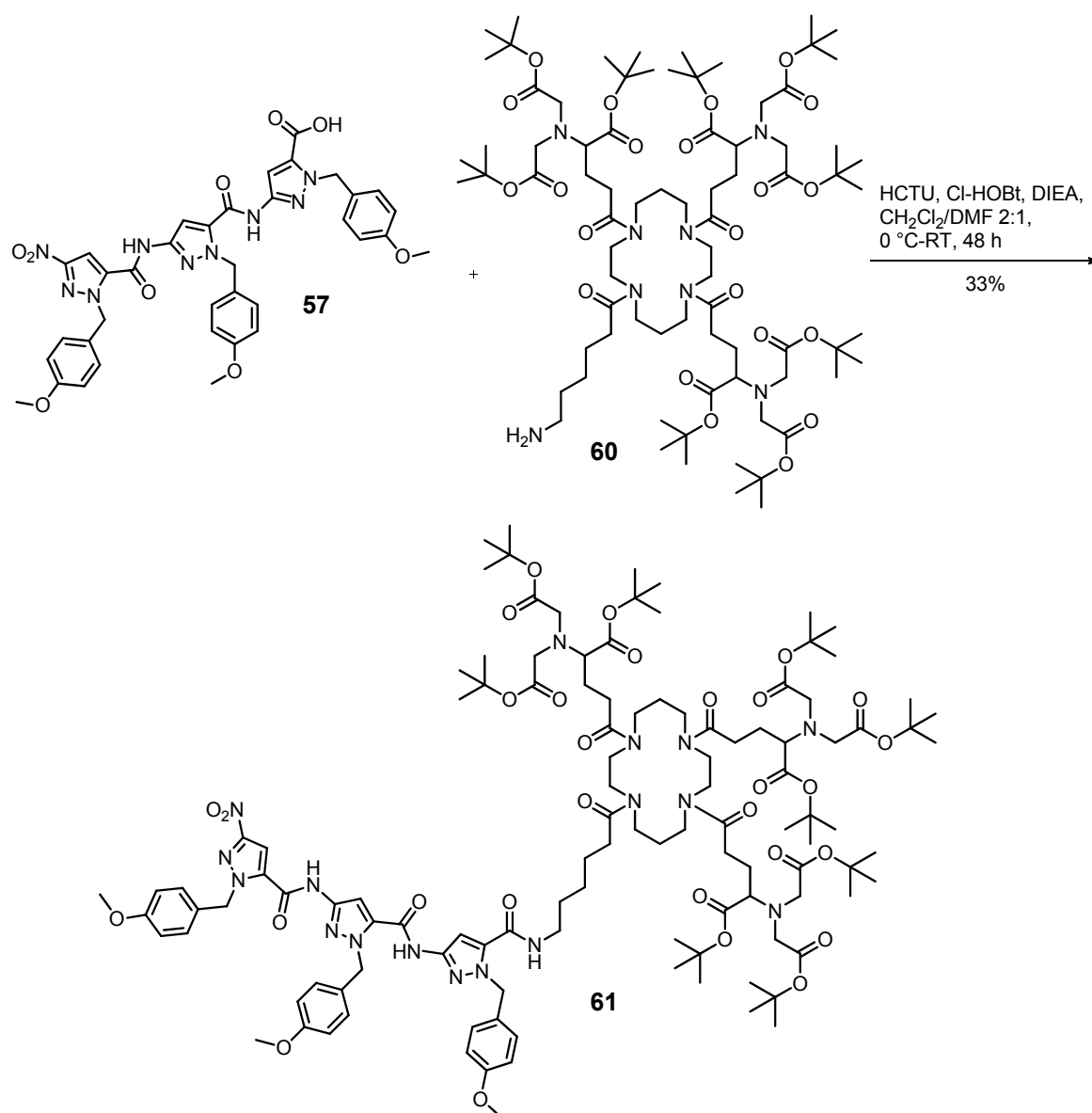


Abb. 74: Reaktionsschema zur Funktionalisierung der Trimer-Säure 57 mit dem C₆-funktionalisierten Tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam 60.

Der darauffolgende Schritt war die Abspaltung der PMB- und *t*Bu-Schutzgruppen mit TFA bei 70 °C für 5 h als extreme Bedingungen. Hierbei erfolgte die Reaktion in guten Ausbeuten. Die Hybridverbindung zeigte eine hohe Stabilität gegenüber stark sauren Bedingungen, bei erhöhter Temperatur und Druck.

Aufgrund der vorhandenen neun Carboxyl-Einheiten war die Zielstruktur jedoch nicht wasserlöslich, um diese für biologische Tests verfügbar zu machen. Daher wurde im nächsten Schritt versucht die Verbindung in das neunfache Natriumsalz zu überführen. In kleinen Ansätzen (5-10 mg) konnte das nun wasserlösliche Salz erhalten und für weitere Experimente verwendet werden.

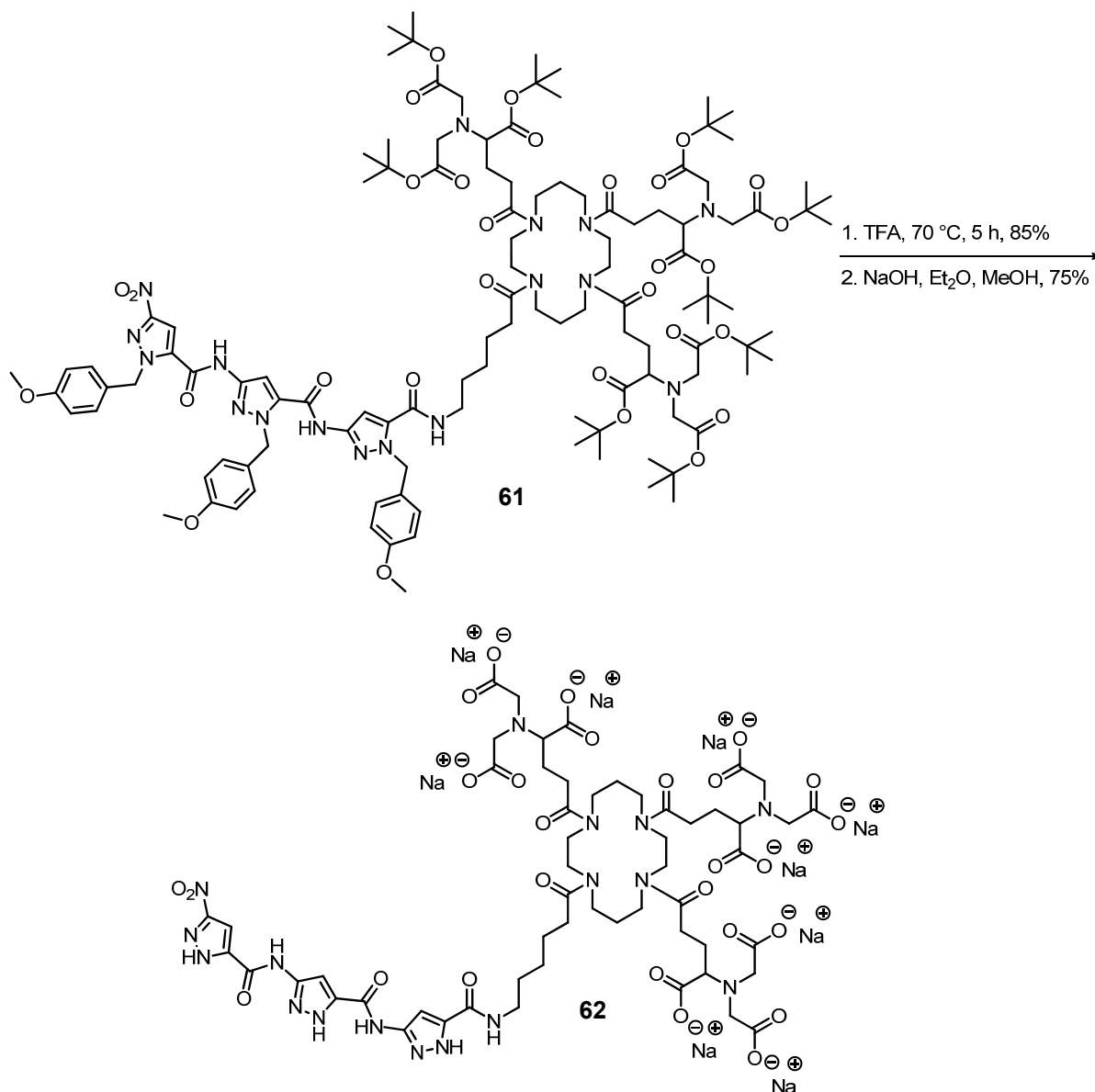


Abb. 75: Zweistufiges Reaktionsschema zur Herstellung des wasserlöslichen Trimer-tris(NTA)-Cyclam-Salzes 62. 1. Abspaltung der PMB- und *t*Bu-Schutzgruppen. 2. Überführung der neunfachen Carbonsäure in das korrespondierende wasserlösliche Natrium-Salz.

Als dritte Variante wurde eine C₁₂-Einheit als langer Spacer ausgewählt. Hierbei konnte jedoch nicht wie in den vorherigen Reaktionen auf das Z-geschützte Derivat zurückgegriffen werden. Daher wurde als weitere orthogonale Schutzgruppe eine Fmoc-Einheit verwendet. Unter den bekannten Peptidkupplungsbedingungen konnte das C12-funktionalisierte Cyclam Derivat **63** in guten Ausbeuten erhalten werden. Ein weiterer Vorteil des Fmoc-geschützten Derivats bestand darin, dass aufgrund der aromatischen Konjugation und der daraus folgenden UV-Aktivität eine bessere Erkennbarkeit des Produktes bei DC-Kontrollen erreicht wurde.

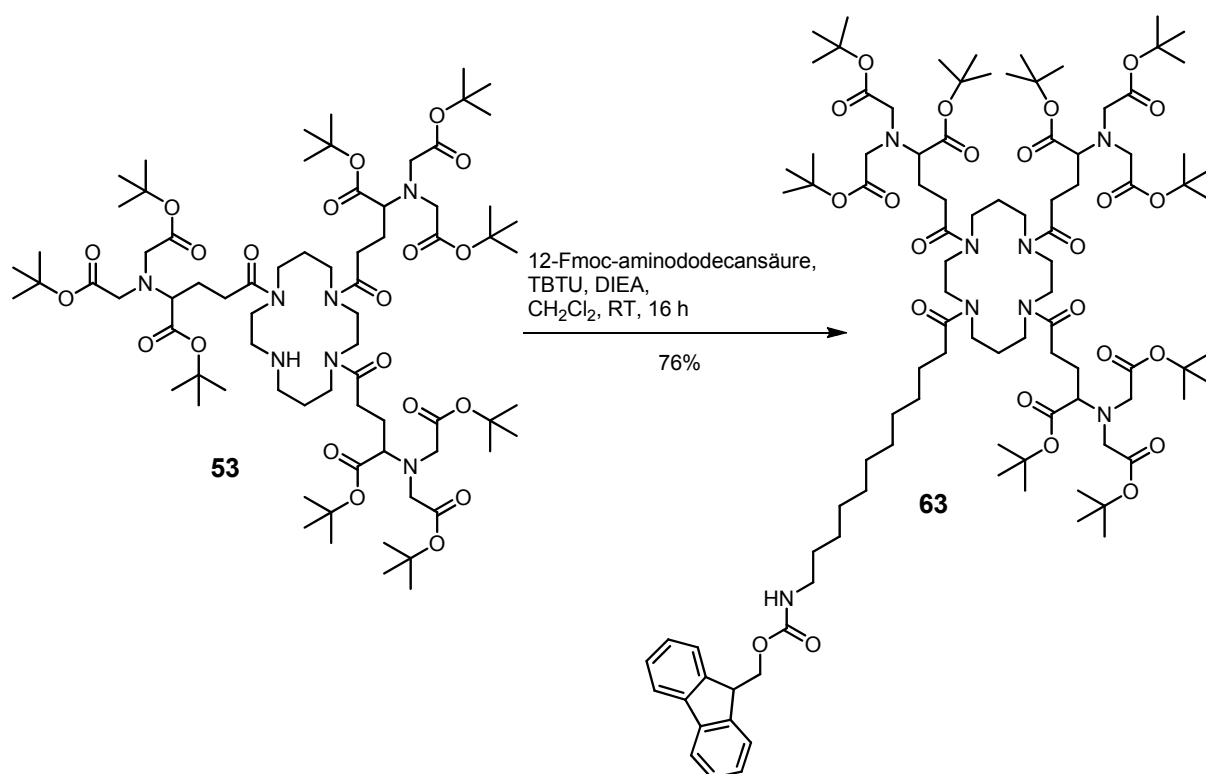


Abb. 76: Reaktionsschema zur C₁₂-Funktionalisierung von Tris(tBu-NTA)-Cyclam **53**.

Der darauffolgende Umsatz mit 20 vol% Piperidin erfolgte weitestgehend vollständig, jedoch wies die Reinigung und Isolierung der gewünschten Amino-Verbindung Probleme aufgrund ihrer Größe und Polarität auf. Letztlich konnte das Produkt in mäßigen Ausbeuten nur unter Verwendung von polaren Lösungsmitteln bis hin zu 100% Methanol erhalten werden.

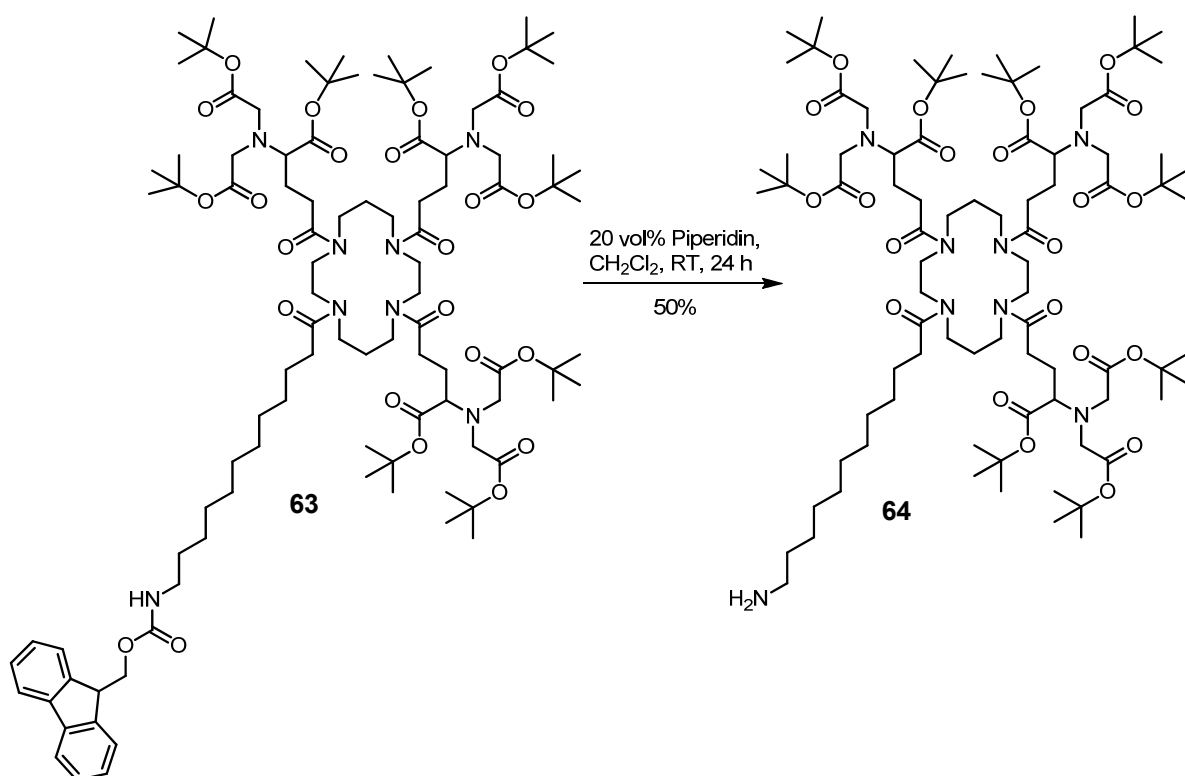


Abb. 77: Reaktionsgleichung für die Fmoc-Entschützung zum terminalen Amin **64.**

Der letzte Kupplungsschritt war erneut die Umsetzung der Cyclam-Verbindung mit der Trimer-Säure **57**, um ein weiteres Trimer-Chelator-Hybrid mit langem Spacer zu erhalten. Nach 48 h Reaktionszeit konnte mittels DC-Kontrolle kein Umsatz beobachtet werden. Die säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes lieferte nur das nicht umgesetzte Amino-Cyclam **64** sowie Derivate von den Kupplungsreagenzien.

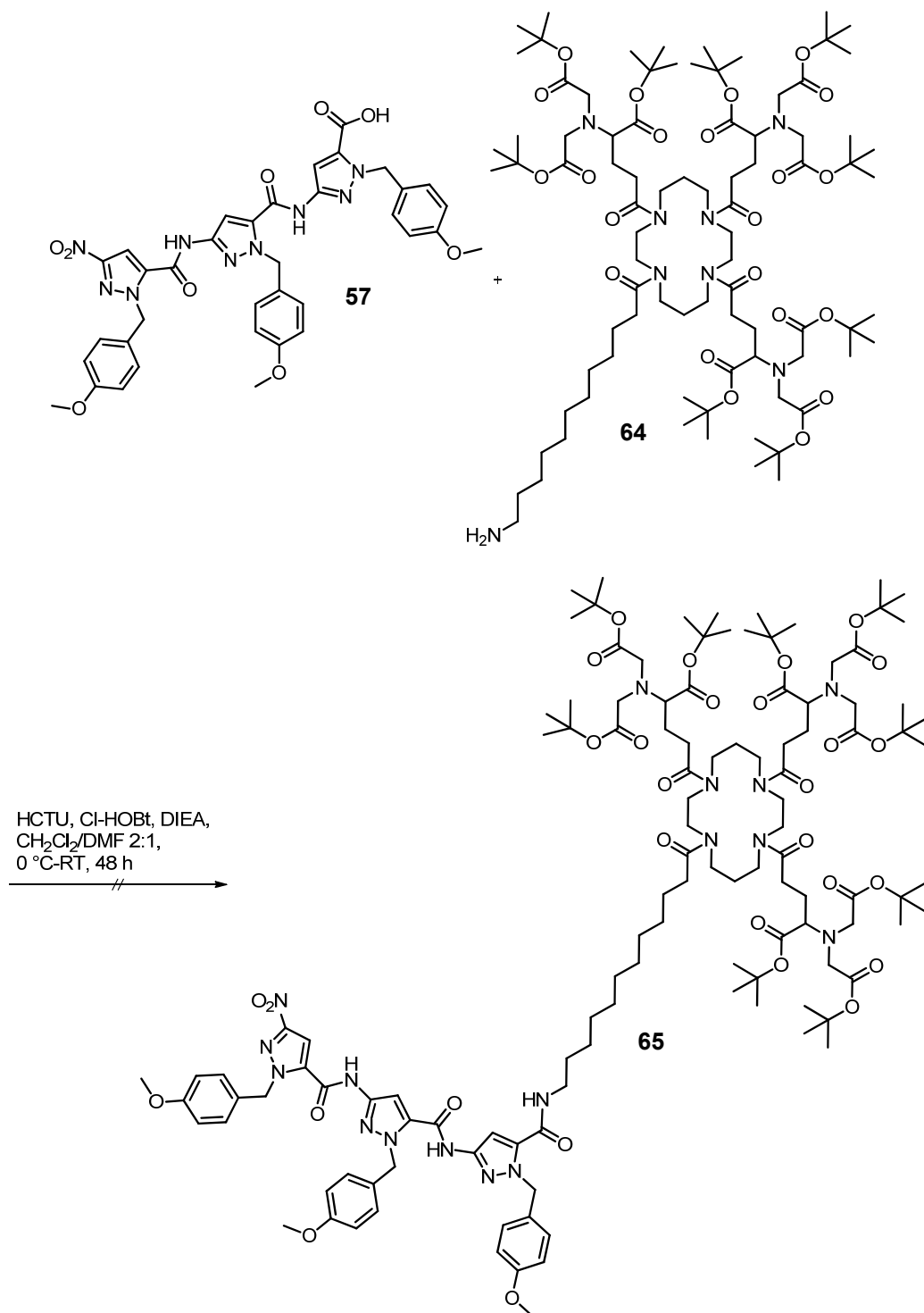


Abb. 78: Versuch zur Kupplung von Trimer-Säure **57** mit Aminododecyl-tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam **64**.

3.4.2. Biophysikalische Experimente mit dem Aminopyrazol-Chelator-Hybrid

Zunächst sollte überprüft werden, ob Trimer-tris(NTA)-Cyclam **62** ohne Komplexbildung mit einem Antikörper inhibierende und konformationsändernde Eigenschaften auf die pathologische Aggregation des A β -Peptids besitzt.

Thioflavin T-Assays sollten erstmals Auskunft über die Inhibierungseffizienz gegenüber A β zeigen.

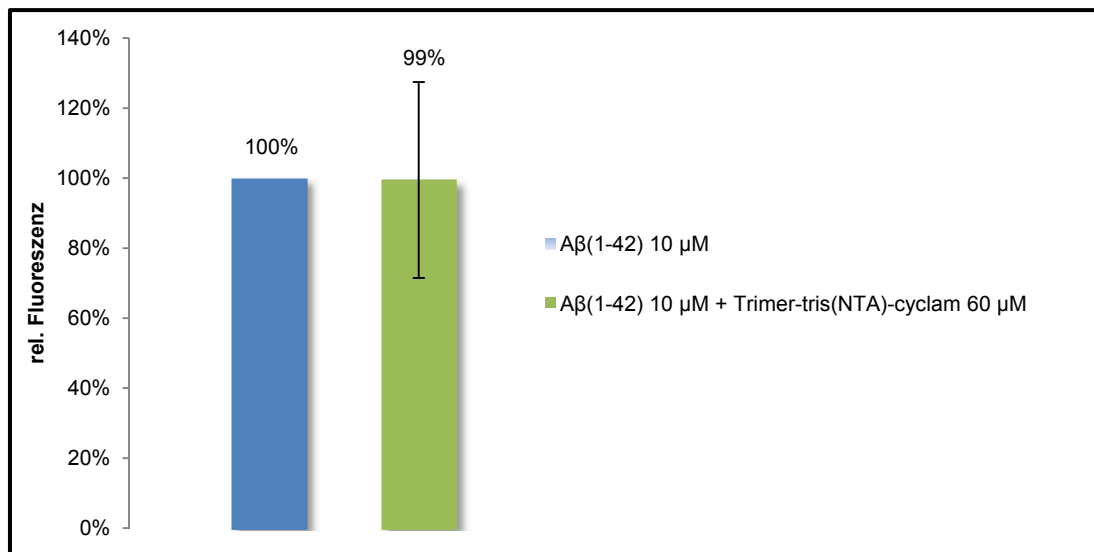


Abb. 79: ThT-Assay mit Trimer-tris(NTA)-Cyclam **62** als Ligand (37 °C, 650 rpm, 5 d).

Hierbei wurde der Ligand **62** im sechsfachen Überschuss eingesetzt. Die Ergebnisse besagten, dass im Vergleich zu A β (1-42) als Referenz (100%) im Mittel keine Fluoreszenzniedrigung durch den Chelator **62** beobachtet werden konnte.

Zur Überprüfung einer möglichen Konformationsänderung des A β -Peptids durch das Hybrid **62** wurden CD-spektroskopische Messungen durchgeführt. Hierbei wurden 5 μ M A β (1-42) mit 5 μ M Trimer-tris(NTA)-Cyclam **62** insgesamt 4 d bei RT mit 850 rpm inkubiert. Es wurden dabei stichprobenweise zu verschiedenen Zeitpunkten CD-Spektren aufgenommen. Als Vergleich wurde das Spektrum von 5 μ M A β (1-42) zu Beginn der Inkubation mit angegeben. Die Sekundärstruktur des A β -Peptids zeigt bei 218 nm ihre charakteristische negative Bande.^[127] Bei der Inkubation mit dem Liganden ist zunächst bei 0 h eine Destabilisierung der β -Faltblattkonformation sichtbar, wobei zwischen 250 und 310 nm ein positiver Cotton-Effekt beobachtet werden kann.

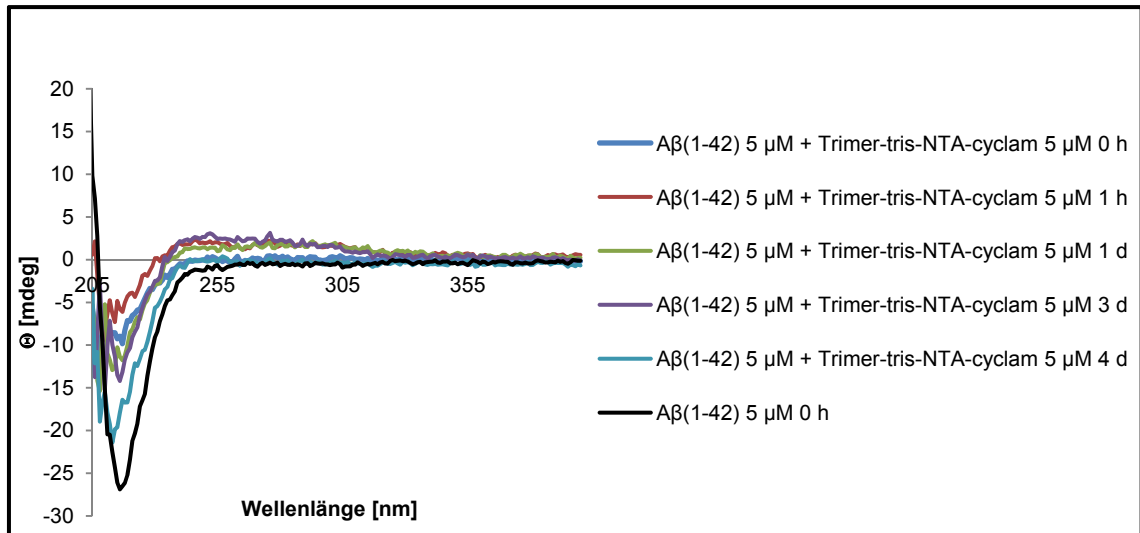


Abb. 80: CD-Spektroskopie von 5 µM Aβ(1-42) mit 5 µM Trimer-tris(NTA)-Cyclam 62 als Ligand (25 °C, 850 rpm, 4 d).

Aufgrund des Absorptionsbereichs von aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zwischen 260 und 320 nm^[128] und der CD-Inaktivität sowie der vorhandenen UV/Vis-Absorption des Liganden in diesem Bereich konnte gefolgert werden, dass eine Interaktion des Liganden mit dem Aβ-Peptid vorliegt. Dies bestärkt die Theorie der KLVFF-Affinität der Aminopyrazol-Einheit.

Im weiteren zeitlichen Verlauf wurde die negative Bande bei 218 nm jedoch immer weiter verstärkt und der oben genannte positive Cotton-Effekt zwischen 260 und 320 nm aufgelöst, was auf Destabilisierung des Ligand-Peptid-Konjugats und die Ausbildung der β -Faltblattkonformation im Aβ-Peptid zurückzuführen ist. Abb. 81 zeigt das UV/Vis-Spektrum von 5 µM Trimer-tris(NTA)-Cyclam 62.

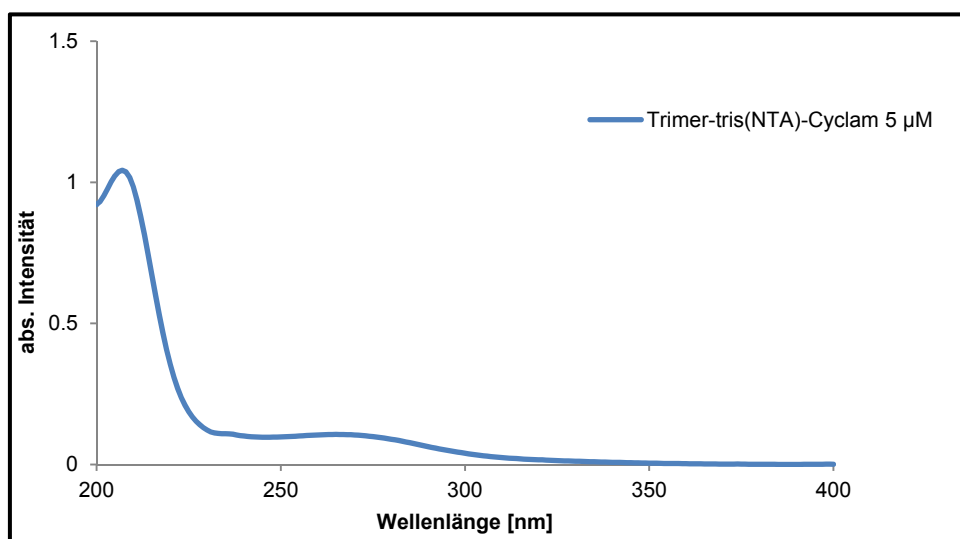


Abb. 81: UV/Vis-Spektrum von 5 µM Trimer-tris(NTA)-Cyclam 62 bei 25 °C.

3.4.3. Biologische Experimente des Ni²⁺-induzierten Trimer-Antikörper-Komplexes

In den biologischen Experimenten, welche im *AK Korth* von *Müller-Schiffmann* durchgeführt wurden, sollten die thermodynamische Stabilität des Trimer-Ni²⁺-Antikörper-Hybridkomplexes und die Affinitäten zum A β -Peptid untersucht werden. Zur Herstellung eines His₆-IC16-scFv wurden V_H- und V_L-Fragmente des IC16-Antikörpers in pET22b-Zellen mit C-terminalen His₆-Tags vervielfältigt. Nach periplasmatischer Expression in *E. coli* wurde der IC16-scFv via IMAC gereinigt. Die anfängliche Reinheit von unter 50% konnte mit A β -Affinitätsaufreinigungen durch Ab1-16-GB1 NHS sepharose verbessert werden.^[111]

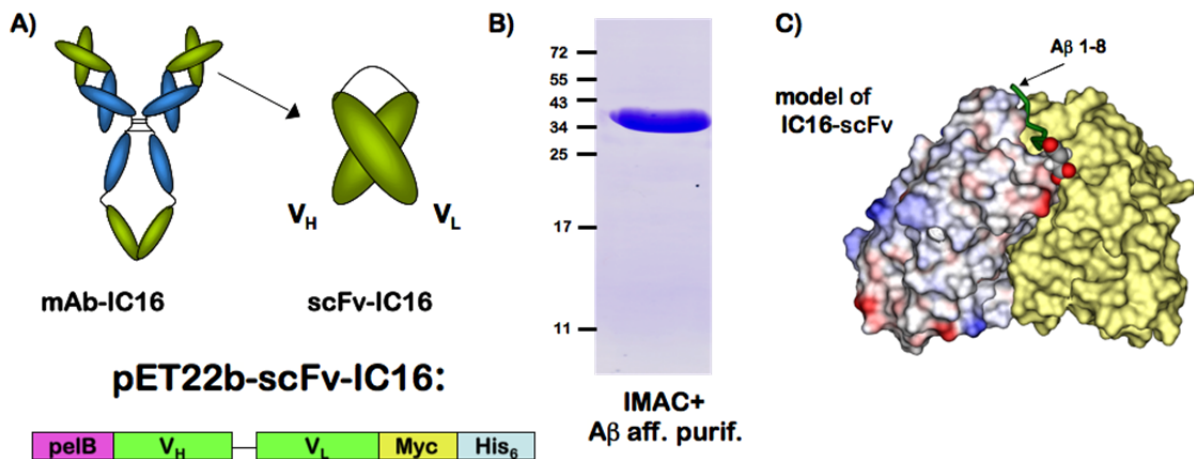


Abb. 82: A) Schematische Darstellung zur Herstellung des His₆-IC16-scFv. B) Reinheit des His₆-IC16-scFv durch IMAC und anschließender A β -Affinitätsaufreinigung. C) Modell zur Bindung des IC16-scFv an die A β (1-8)-Sequenz.

Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) sollte überprüft werden, ob der gewünschte Komplex entsteht und nachgewiesen werden kann.

Die Gel-Elektrophorese dient in der Molekularbiologie als Standardverfahren zur Identifizierung von Proteinen/Molekülen nach ihrer Größe. Dabei werden die zu analysierende Probe und ein Marker als Referenz auf ein Gel aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung werden die Moleküle aufgrund ihrer Masse und Ladung getrennt.

Der His₆-getaggte IC16-scFv wurde mit ansteigenden Konzentrationen Trimer-tris(NTA)-Cyclam **62** auf ein natives Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

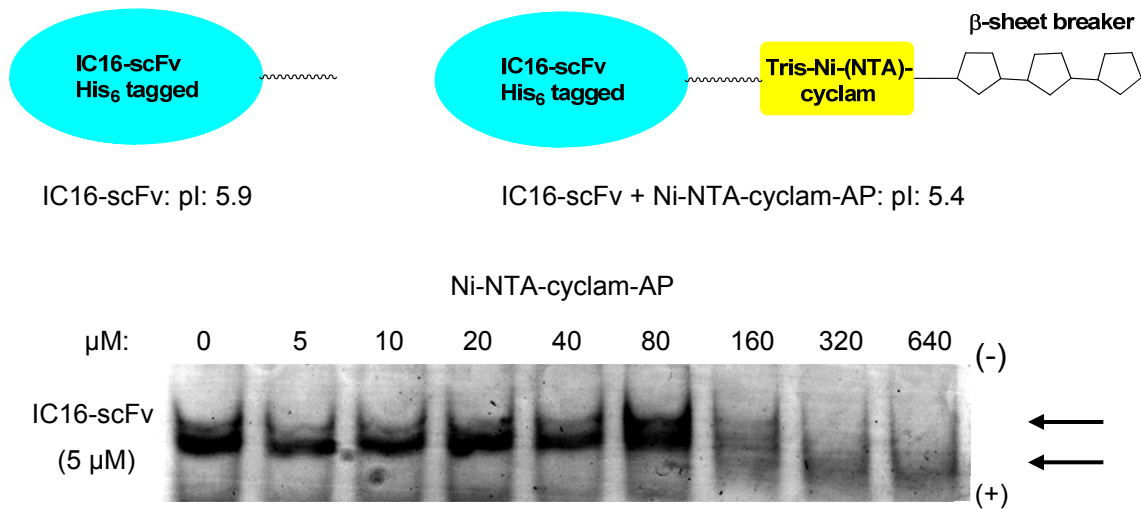


Abb. 83: Native PAGE zur Überprüfung der Komplexbildung von Trimer-Cyclam-tris-Ni^{II}-(NTA)-IC16-scFv (natives Gel, pH 6.7).

Bei dem His₆-IC16-scFv ohne Zugabe von Ni²⁺-Ionen und dem Trimer-Chelator **62** konnte ein isoelektrischer Punkt von 5.9 ermittelt werden. Die Zugabe des Trimer-Cyclam-tris-Ni^{II}-(NTA)-Komplexes zeigte ab einer Konzentration von 160 μM eine Veränderung des Wertes auf 5.4. Normalerweise ist zu erwarten, dass der gewünschte Komplex aufgrund seiner Größe im Vergleich zum IC16-scFv einen größeren pI-Wert annimmt. Da jedoch mit einem Unterschuss an Nickel gearbeitet wurde, wies der Komplex mehr Ladungen aufgrund freier Carboxylat-Gruppen auf und zeigte somit einen kleineren pI-Wert. Hierbei standen ladungsbedingte Einflüsse bei der Wanderung des Komplexes im Gel im Vordergrund.

Nach erfolgreicher Überprüfung der Komplexbildung wurden ELISA-Experimente durchgeführt, um die Aβ-Affinität zu untersuchen. Im ersten Schritt wurde der Konzentrationsbereich für die Bindung von IC16-scFv in Bezug auf Aβ(1-42) ermittelt.

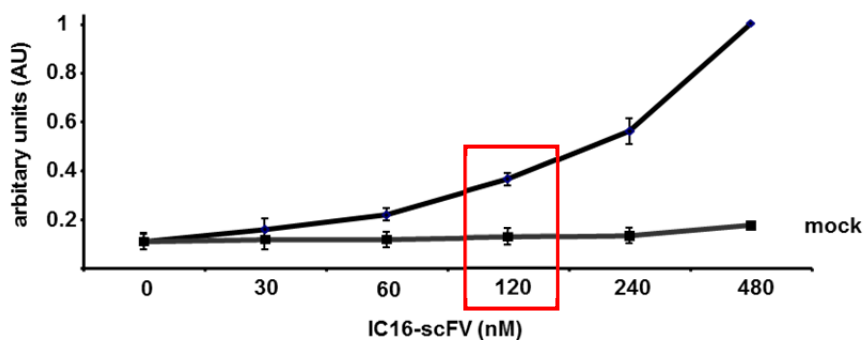


Abb. 84: ELISA zur Ermittlung des Konzentrationsbereiches der IC16-scFv-Aβ-Bindung (mit 0.5 ng Aβ(1-42)).

Ab einer Antikörperkonzentration von 60 nM bis hin zu 480 nM konnte ein exponentieller Anstieg in der Bindung zum A β -Peptid erreicht werden. Als Referenz bzw. Nulllinie diente die Inkubation von BSA mit A β (1-42). Aus diesen Erkenntnissen wurden 120 nM IC16-scFv für weitere Bindungsverstärkungsmessungen mit A β (1-42) als Standardwert für 100% ausgewählt.

Hierbei wurden 120 nM IC16-scFv 30 Minuten mit variablen Konzentrationen von Trimer-Cyclam-tris-Ni^{II}-NTA zusammen inkubiert. Ebenfalls wurden Kontrollmessungen mit IC16-scFv und Trimer-tris(NTA)-Cyclam **62** in Abwesenheit von Ni²⁺-Ionen sowie Tris(Ni^{II}-NTA)-Cyclam angesetzt (Abb. 85). Als Nulllinie diente der Umsatz von Trimer-Cyclam-tris(Ni^{II}-NTA) mit A β (1-42) ohne das Antikörperfragment. Die Kontrollexperimente zeigten, dass durch die Einzelkomponenten in Lösung sowie ohne Aminopyrazol-Einheit keine Verstärkung der Bindung an A β hervorgerufen wurde.

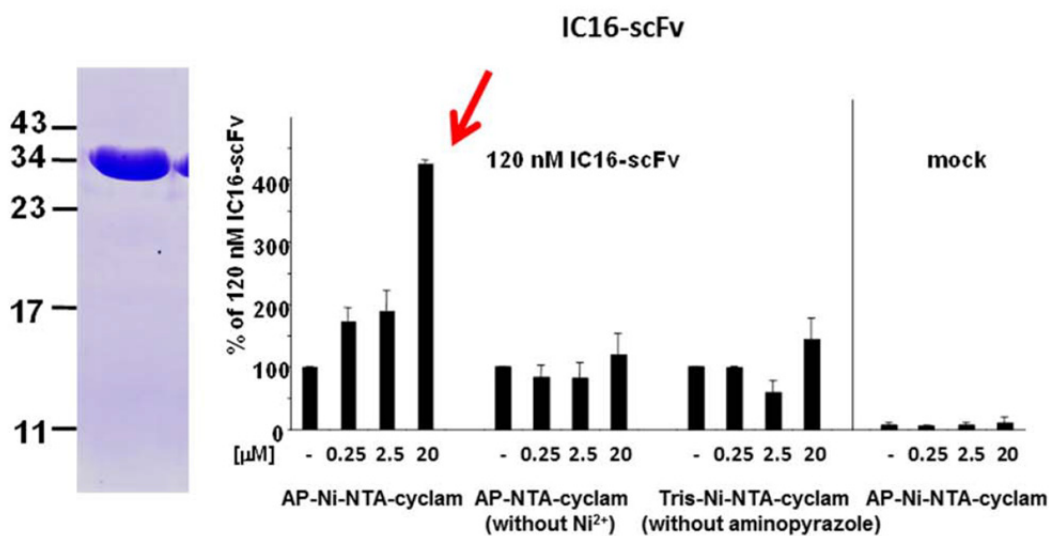


Abb. 85: ELISA-Experiment zur Überprüfung der A β -Affinität des Trimer-Cyclam-tris-Ni^{II}-NTA-IC16-scFv-Hybrids. Als 100% diente der vorher bestimmte Wert für die Bindung von IC16-scFv an A β (1-42) (30 min Inkubation, jeweils 60-facher Überschuss an Ni²⁺-Ionen).

Im Falle des Trimer-Cyclam-tris-Ni^{II}-NTA-IC16-scFv-Hybrids konnte eine sehr große Bindungsverstärkung auf 400% erreicht werden. Auffällig ist ebenfalls, dass bereits bei submikromolaren Konzentrationen an Hybrid die Bindungsaffinität fast verdoppelt werden konnte. Abb. 86 zeigt nochmals einen genaueren Ausschnitt der gewählten Konzentrationen an Chelator mit und ohne Ni²⁺-Ionen.

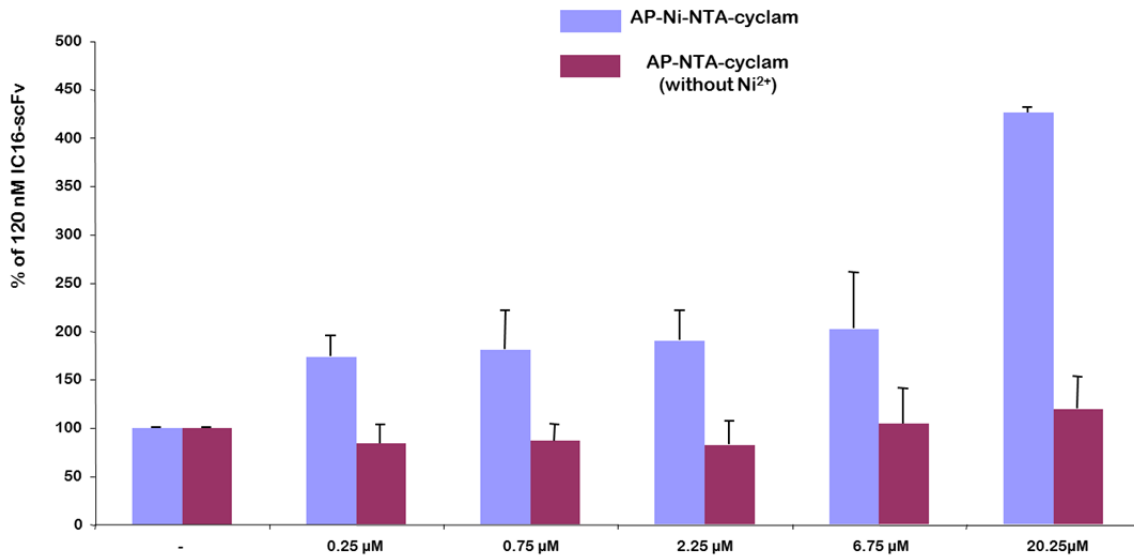


Abb. 86: Genauerer Ausschnitt des ELISAs mit IC16-scFv und Trimer-Cyclam-tris(Ni^{II}-NTA) (■ als Vergleich ohne Einsatz von Ni²⁺-Ionen).

Zu erkennen ist hier der schwach lineare Anstieg der Bindungsstärke bis hin zu 6.75 µM, bevor diese bei 20.25 µM verdoppelt wird.

Des Weiteren wurden ELISA Experimente mit dem cameliden His₁₀-VHH-E4 Antikörper durchgeführt.

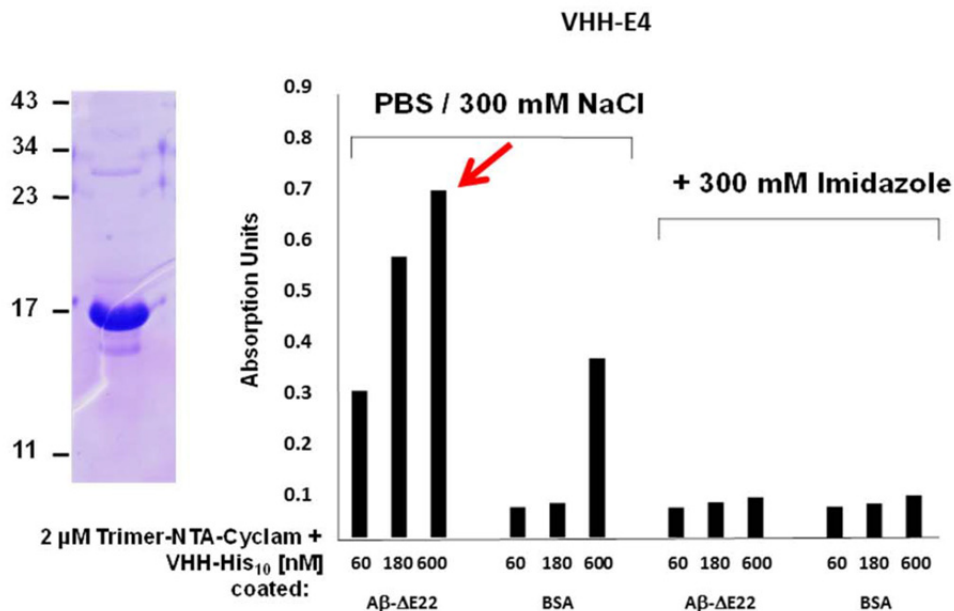


Abb. 87: ELISA zur Untersuchung der Aβ-Affinität des Trimer-Cyclam-tris(Ni^{II}-NTA)-VHH-E4-Hybrids.

Hierbei diene BSA als Referenzsubstanz für die Einordnung der Ergebnisse der Affinitätsexperimente des Trimer-Cyclam-tris(Ni^{II}-NTA)-VHH-E4 Hybrids. Der Einsatz von A β - Δ E22 hatte die Bedeutung, dass ausschließlich die Oligomerenbildung im Vordergrund stand.^[135] Bei einem konstanten Überschuss an Trimer-Cyclam-tris(Ni^{II}-NTA) (2 μ M) wurde His₁₀-VHH in drei verschiedenen Konzentrationen getestet (60 nM, 180 nM und 600 nM). Bereits bei 60 nM Antikörperkonzentration konnte eine Verstärkung der Bindung beobachtet werden. Bis hin zu einer zehnfach erhöhten Konzentration an VHH-E4 konnte die Affinität mehr als verdoppelt werden, wobei der Bezug zu BSA bei 600 nM Konzentration an Antikörper ebenfalls eine Erhöhung lieferte. Dennoch ist die Verstärkung der Bindungsaffinität zu A β bei 60 und 180 nM Konzentrationen an Antikörper im Vergleich zum BSA deutlich zu erkennen. Um den synergistischen Effekt zu betonen, wurde anschließend Imidazol hinzugegeben, um die Ni^{II}-Komplexierung zwischen β -Faltblattbrecher-Einheit und A β -Selektor zu unterbrechen. Daraufhin war keine Affinität zum A β - Δ E22 mehr zu beobachten.

3.4.4. Zusammenfassung

Die Kombination von Inhibitoren und Antikörpern bietet neue Ansätze im Bereich der Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten. Durch die schwache Bindung des Trimer-mono-NTA-Bausteins **47** über Ni²⁺-Ionen an den Antikörper gab es zwei Möglichkeiten, eine thermodynamische Stabilität dieses Komplexes zu erreichen, zum Einen die Funktionalisierung des Aminopyrazoltrimers mit einer multiplen Chelator-Einheit und zum Anderen die Verlängerung der His-Polypeptidkette des Antikörpers. Die erfolgreiche Synthese des Na₉-Trimer-tris(NTA)-Cyclam-Salzes **62** über 15 Stufen war zunächst die primäre Voraussetzung einer möglichen stabilen Metall-Ionen-induzierten Komplexbildung mit dem Antikörper.

Da biophysikalische Untersuchungen wie ThT-Assays und CD-Messungen keine Ansätze in der Inhibierung von A β (1-42) mit dem Aminopyrazol-Chelator alleine zeigten, konnte in Elektrophorese-Experimenten zunächst die Entstehung des Trimer-Cyclam-tris(Ni^{II}-NTA)-IC16-scFv-Komplexes nachgewiesen werden. Eine synergistische Bindungsverstärkung zum A β konnte in ELISA-Experimenten beobachtet wer-

den, wobei Messungen ohne den Einsatz von Ni^{2+} -Ionen und ohne Aminopyrazol als β -Faltblattbrecher-Einheit keine erhöhte Bindungsaffinität aufzeigten.

In weiteren Inhibierungsexperimenten mit der Komplex-Verbindung könnten somit mehr positive Ergebnisse bezüglich der $\text{A}\beta$ -Aggregation erzielt werden.

3.5. Aminopyrazol-Cyclen-Hybride als künstliche Proteasen

Künstliche Proteasen könnten in ihrer Hydrolysefunktion von Peptiden eine wichtige Rolle im Bereich der Alzheimer-Thematik spielen. Über die Verknüpfung einer solchen Spezies mit einer Erkennungseinheit könnte die Möglichkeit bestehen, das Alzheimer-Peptid in kleinere Peptidsequenzen zu spalten, um somit der toxischen Wirkung des Aggregationsprozesses entgegenzuwirken. Die Überlegung bestand darin, das Trimer mit einer Co^{III} -Cyclen-Proteasefunktion auszustatten, um die Selektivität der Proteolyse zu erhöhen.

Für die Herstellung des Trimer-Protease-Hybrids gibt es zwei retrosynthetische Ansätze (Abb. 88), da das Trimer **27** sowohl C- als auch N-terminal funktionalisiert werden kann. Für die C-terminale Verknüpfung sollte das Cyclen mit einem Linker, welcher eine endständige Amino-Gruppe trägt, ausgestattet werden, um die Entstehung einer Peptidbindung zu ermöglichen. Der geschützte Amino-Spacer sollte an der Kupplungsstelle über eine gute Abgangsgruppe für die Durchführung einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion verfügen (Abb. 88a).

Der N-terminale Ansatz der Funktionalisierung des Trimers **27** verläuft ähnlich zu dem vorher beschriebenen Weg der C-terminalen Funktionalisierung. Hierbei sollte der mit dem Cyclen verknüpfte Spacer mit einer Carbonsäure-Einheit ausgestattet werden, um eine Peptidkupplungsreaktion mit dem Aminotrimer **36** einzugehen. Der Linker sollte neben der Ester-Einheit eine gute Abgangsgruppe an der Stelle besitzen, wo der Linker mit der Cyclen-Einheit eine Substitution eingehen soll (Abb. 88b).

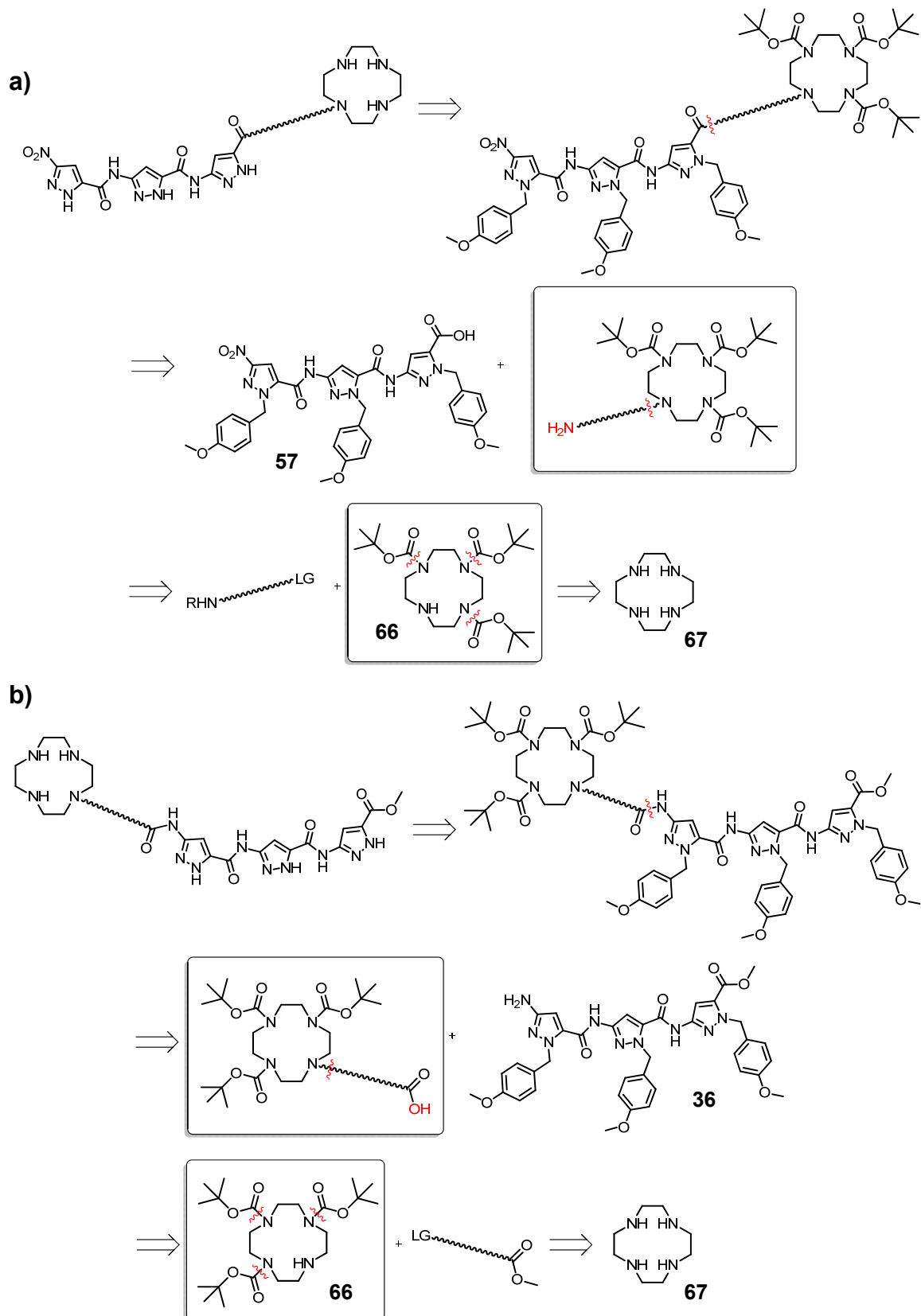


Abb. 88: Retrosynthetische Ansätze für die C-terminale Kupplung der Proteasefunktion mit der Trimer-Säure 57 (a) sowie für die N-terminale Kupplung mit dem Aminotrimer 36 (b).

3.5.1. Synthese von Trimer-Cyclen Hybriden

Beginnend beim freien Cyclen **67** fand die dreifache Boc-Schützung nach einer Vorschrift von *Wan et al.* statt, wobei die Literaturlausbeute nicht erreicht werden konnte.^[136] Jedoch ergaben sich bei der Reaktion keinerlei Probleme bei der Durchführung und Isolierung.

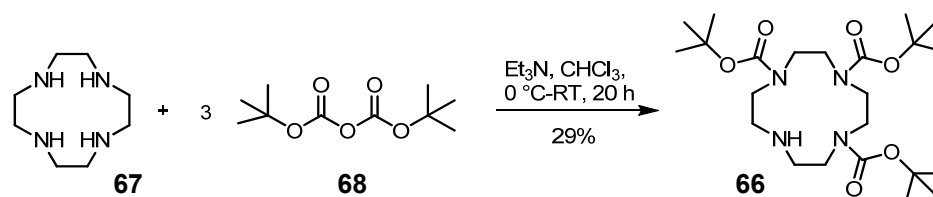


Abb. 89: Herstellung von Tris(*N*-Boc)-Cyclen **66** nach *Wan et al.*^[136]

Nach Erhalt dieses Grundbausteins wurde zunächst Bromacetonitril **69** eingesetzt, welches als kurzer Spacer fungieren sollte.^[137]

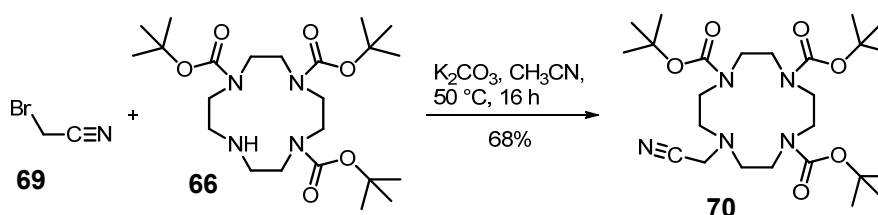


Abb. 90: Herstellung des Cyanomethyl-tris(*N*-Boc)-Cyclen-Derivates **70** nach *Reichenbach-Klinke et al.*^[137]

Die anschließende Reduktion der Cyano-Gruppe mit Raney-Nickel in ammoniakgesättigtem Ethanol unter Wasserstoffatmosphäre führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt, wie es in der Literatur erreicht werden konnte.^[137]

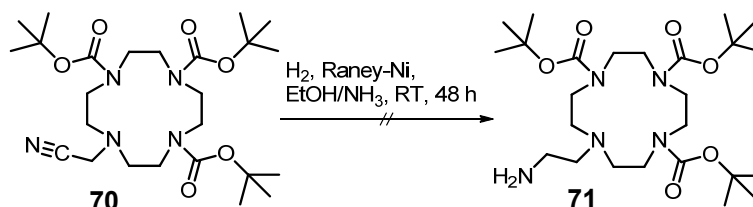


Abb. 91: Reaktionsschema zur Reduktion der Cyano-Gruppe nach *Reichenbach-Klinke et al.*^[137]

Der nächste Ansatz war die Substitution mit einem C₆-Spacer analog zum obigen Reaktionsweg, wobei als Reaktand 6-Bromohexylnitril (**72**) diente. Jedoch fand in

diesem Fall keine Umsetzung statt. Die Variation der Base durch Cäsiumcarbonat lieferte ebenfalls keine erfolgreichen Ergebnisse.

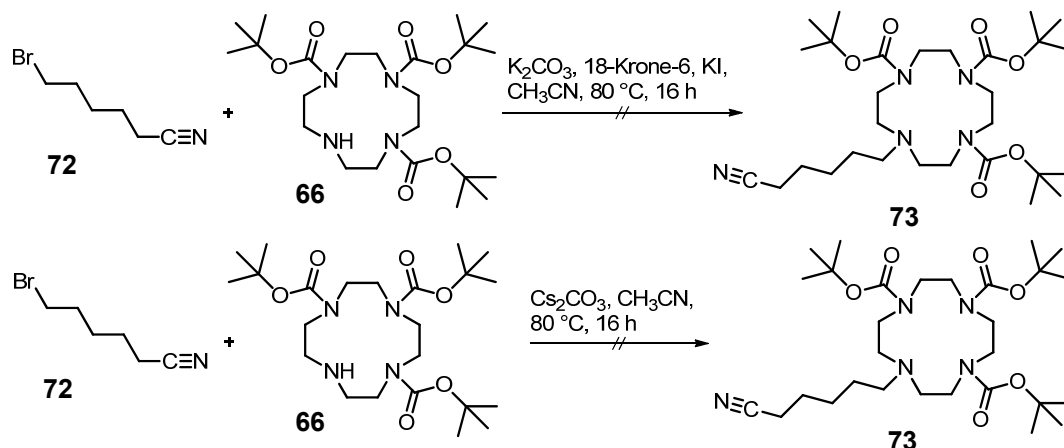


Abb. 92: Reaktionsschemata zur Herstellung des Cyanohexyl-tris(*N*-Boc)-Cyclen **73**. Durch den Einsatz verschiedener Basen konnte die Zielverbindung nicht erhalten werden.

Da die Umsetzungen und auch die Reduktion der Nitril-Einheit keine erfolgreichen Ergebnisse lieferten, wurde ein anderer Weg über *Z*-geschützte Aminoalkohole eingeschlagen. Hierbei wurde im ersten Schritt der freie Alkohol in eine Tosyl-Einheit als gute Abgangsgruppe überführt.

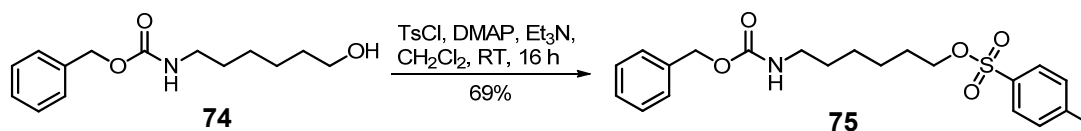


Abb. 93: Reaktionsgleichung zur Tosyl-Schätzung des *Z*-Aminoalkohols **74**.

Die weitere Umsetzung mit dem Tris(*N*-Boc)-Cyclen-Grundbaustein **66** führte ebenfalls nicht zum Erfolg. DC Kontrollen zeigten jedoch einen Umsatz, nach der Isolierung konnten allerdings nicht alle Protonen im ¹H-NMR-Spektrum zugeordnet werden. Massenspektrometrische Untersuchungen konnten ebenfalls keinen Hinweis auf das gewünschte Produkt liefern.

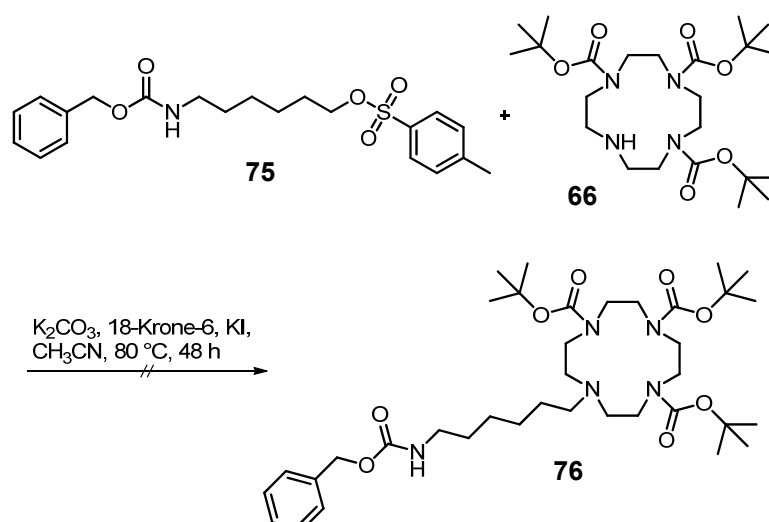


Abb. 94: Reaktionsschema für die Herstellung des 6-Z-Aminohexyl-funktionalisierten Cyclen-Derivates **76**.

Der Weg zur Herstellung eines Carboxyl-funktionalisierten Cyclens zur späteren Synthese eines *N*-terminal verknüpften Trimer-Cyclen-Hybrids verlief im Allgemeinen über einen Bromalkylmethylester.

Die Funktionalisierung mit einem mittellangen C_6 -Spacer erfolgte über 6-Bromhexansäuremethylester (**77**) unter ähnlichen Bedingungen wie in Abb. 92 und 94 genannt.

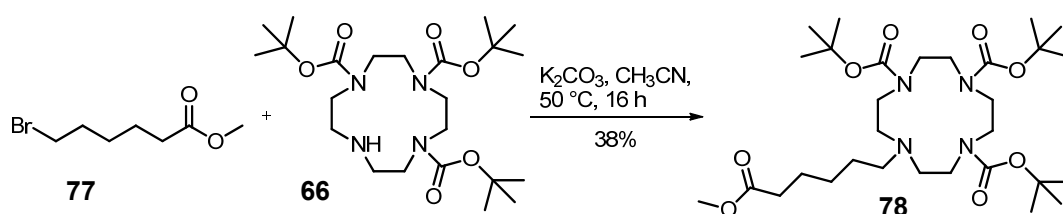


Abb. 95: Synthese des Tris(*N*-Boc)-Cyclenhexansäuremethylesters **78**.

Die darauffolgende Methylesterspaltung unter basischen Bedingungen verlief quantitativ.

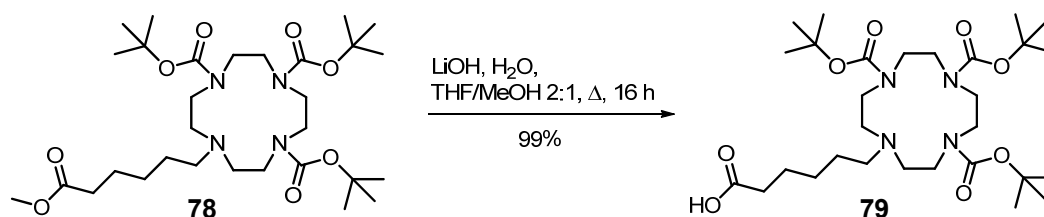


Abb. 96: Reaktionsgleichung zur Herstellung der Tris(*N*-Boc)-Cyclenhexansäure **79**.

Durch die erhaltene freie Carbonsäure-Einheit konnte im Anschluss die Peptidkuppelungsreaktion mit dem Aminotrimer **36** durchgeführt werden. Jedoch fand bei dieser Reaktion kein Umsatz zum gewünschten Produkt statt.

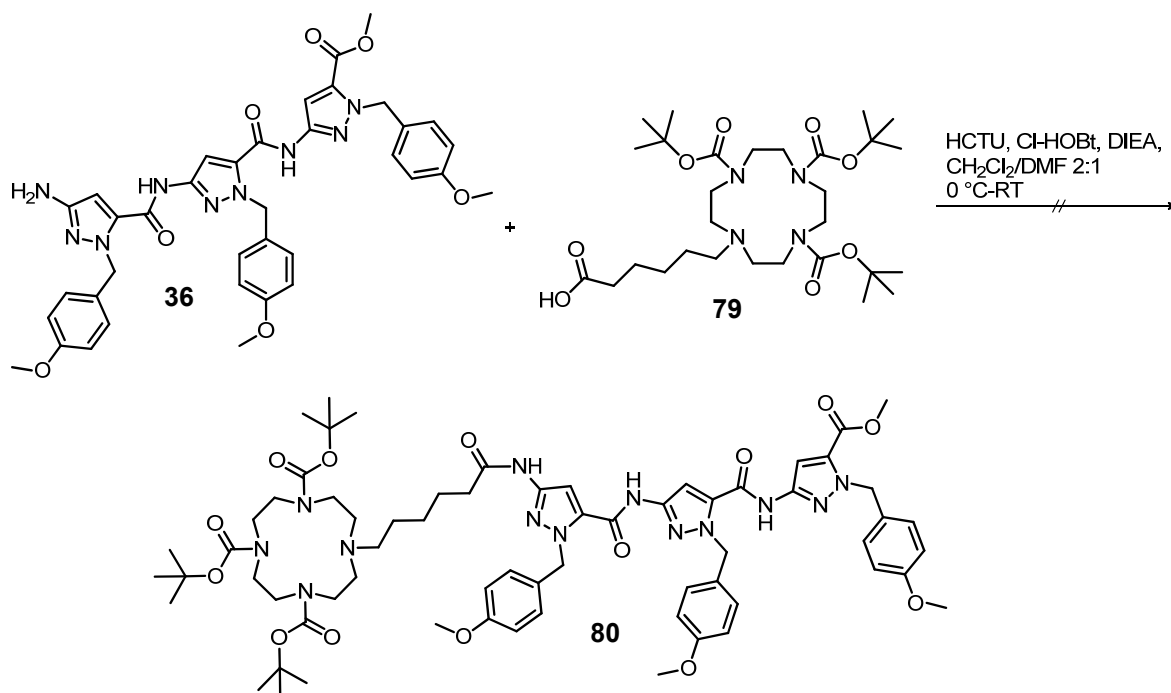


Abb. 97: Erfolgreicher Weg zur Synthese des Trimer-hexyl-Cyclen Hybrids **80**.

Als langer Spacer wurde ein C₁₂-Spacer gewählt. Hier wurde von 12-Bromdodecansäure (**81**) ausgegangen, welche zunächst verestert werden sollte.

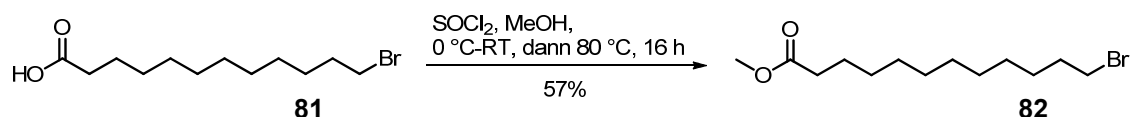


Abb. 98: Reaktionsschema zur Herstellung von 12-Bromdodecansäuremethyl ester (**82**).

Die Umsetzung des Esters **82** mit Tris(*N*-Boc)-Cyclen **66** erfolgte unter denselben Bedingungen wie in Abb. 95 gezeigt, jedoch mit etwas besserer Ausbeute.

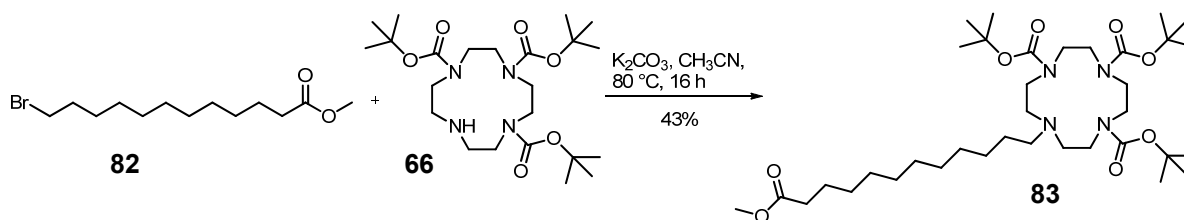


Abb. 99: Reaktionsgleichung zur Synthese von Tris(*N*-Boc)-Cyclendodecansäuremethyl ester **83**.

Unter basischen Standardbedingungen zur Methylesterspaltung konnte die freie Carbonsäure ohne große Probleme mit guten Ausbeuten erhalten werden.

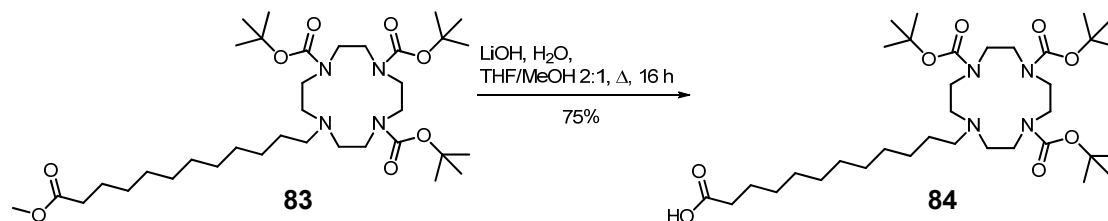


Abb. 100: Reaktionsgleichung zur Synthese von Tris(*N*-Boc)-Cyclen-dodecansäure 84.

Durch Variation der Kupplungsbedingungen im Hinblick auf die vorherige Synthese konnte das gewünschte erste Trimer-Cyclen-Hybrid hergestellt werden.

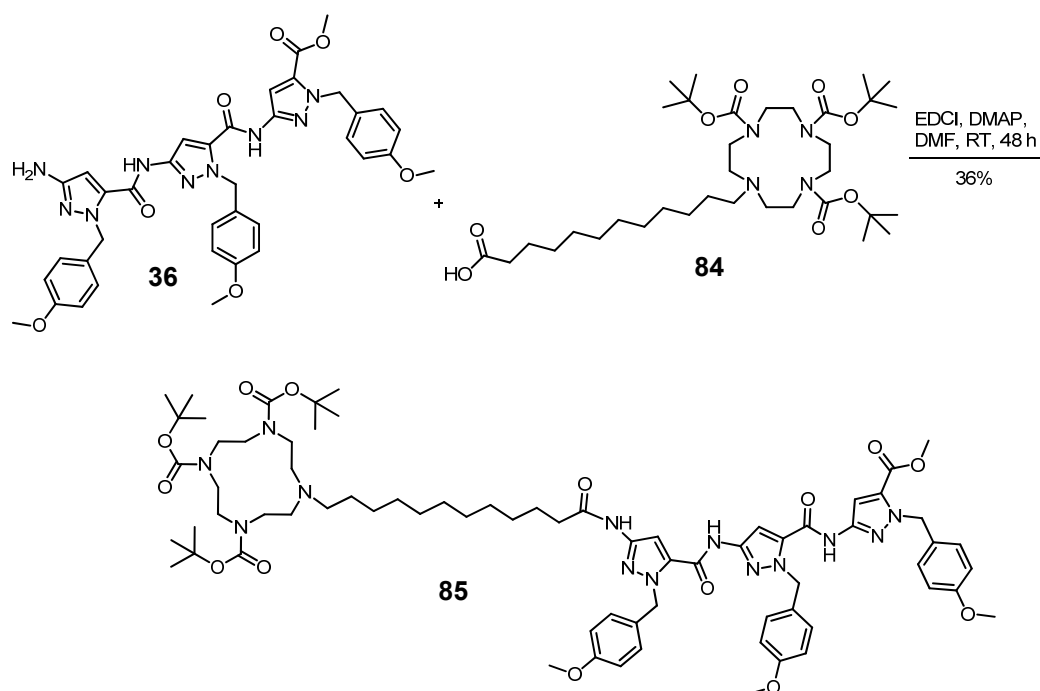


Abb. 101: Reaktionsgleichung der Peptidkupplung zum Trimer(PMB)-dodecyl-tris(*N*-Boc)-Cyclen-Hybrid 85.

Die Abspaltung der Boc- und PMB-Schutzgruppen erfolgte unter bekannten Bedingungen mit trockener TFA bei 70 °C unter Schutzgas sowie erhöhtem Druck und ergab mäßige Ausbeuten (Abb. 102).

Nach Durchführung der verschiedenen Synthesewege konnte letztlich eine Verbindung mit β -Faltblattbrecher-Protease-Funktion erhalten werden. Im nächsten Schritt

sollten Komplexierungsversuche durchgeführt werden, um darauffolgend die proteolytische Wirkung zu untersuchen.

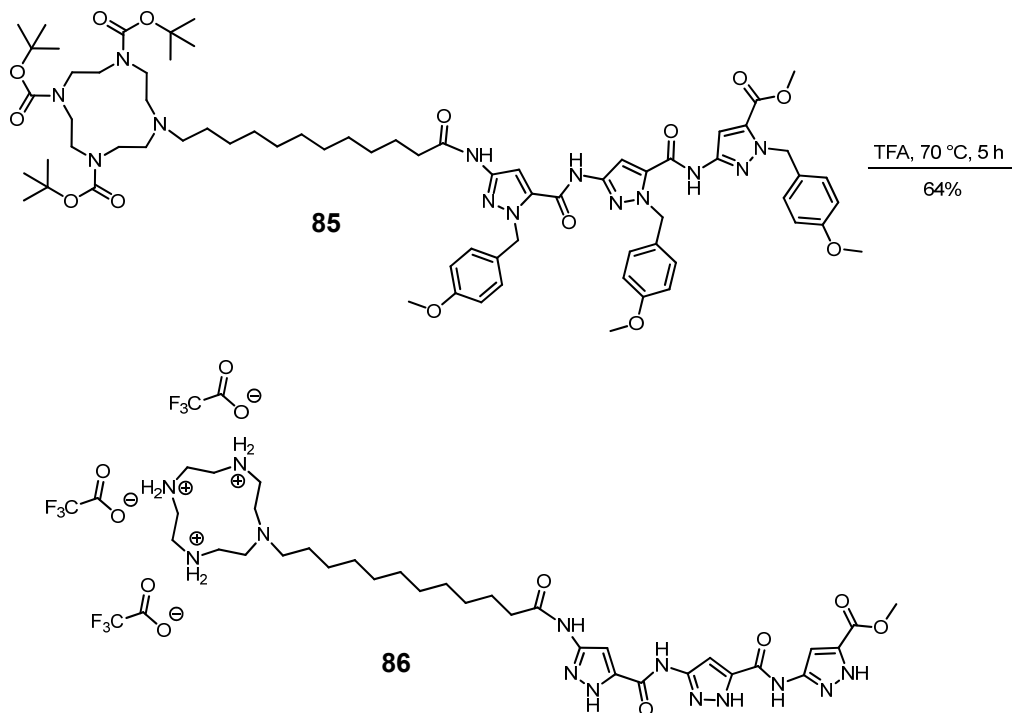


Abb. 102: Reaktionsgleichung der TFA-Abspaltung zum Cyclen-dodecyl-Trimer-Hybrid **86**.

3.5.2. Biophysikalische Experimente mit dem Trimer-Cyclen-Hybrid

Zunächst wurde überprüft, ob die Zielstruktur **86** inhibierende und konformationsändernde Eigenschaften bezüglich des A β -Peptids aufweist. ThT-Experimente zeigten folgendes Ergebnis in Bezug auf einem sechsfachen Überschuss an Ligand zu 10 μ M A β (1-42).

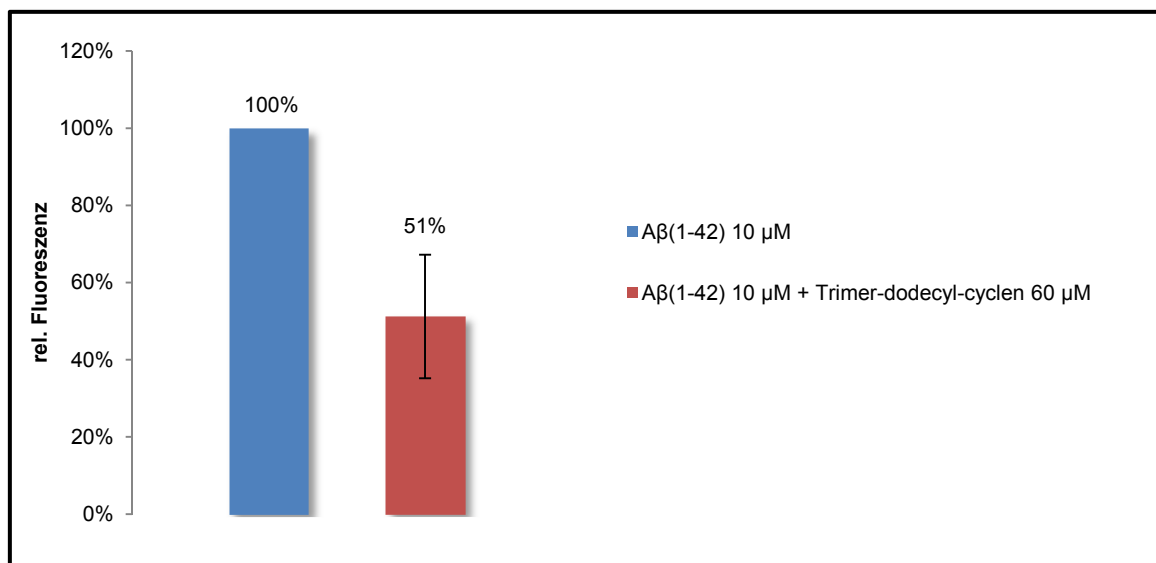


Abb. 103: ThT-Assay mit dem Hybrid **86** in sechsfachem Überschuss in Bezug auf A β (1-42) (37 °C, 650 rpm, 5 d).

Nach 5 d Inkubation sank die ThT-Fluoreszenz auf 51%, woraus die Erkenntnis gezogen werden konnte, dass mit Hilfe eines Überschusses des Liganden **86** circa die Hälfte der A β -Aggregation inhibiert werden konnte.

Die CD-Spektroskopie wurde hier ebenfalls wieder eingesetzt, um mögliche Konformationsänderungen des A β -Peptids zu beobachten. Hierbei wurden 10 μ M A β (1-42) mit 10 μ M Trimer-dodecyl-Cyclen **86** insgesamt 4 d bei RT mit 850 rpm inkubiert. Im Vergleich zu A β alleine war zu erkennen, dass im Verlauf der Zeit die negative Bande bei 218 nm nicht mehr zu erkennen war, was auf die Destabilisierung der β -Faltblattstruktur hinweist.^[127]

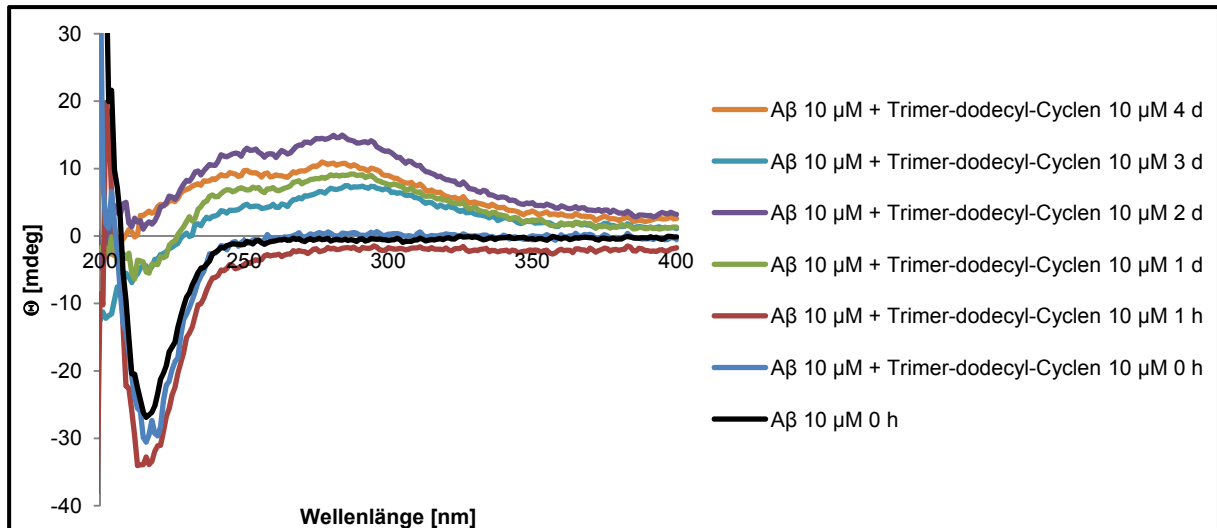


Abb. 104: CD-Spektroskopie von 10 µM Aβ(1-42) mit 10 µM Trimer-dodecyl-Cyclen 86 als Ligand (25 °C, 850 rpm, 4 d).

Der gleichzeitig auftretende positive Cotton-Effekt zwischen 250 und 310 nm ließ auch wieder auf die KLVFF-Affinität der Aminopyrazol-Einheit schließen (vgl. Abschn. 3.3 und 3.4)^[128], da auch hier in diesem Bereich keine CD-Aktivität aber eine schwache Absorption des Liganden im UV/Vis-Spektrum auftritt (Abb. 105).

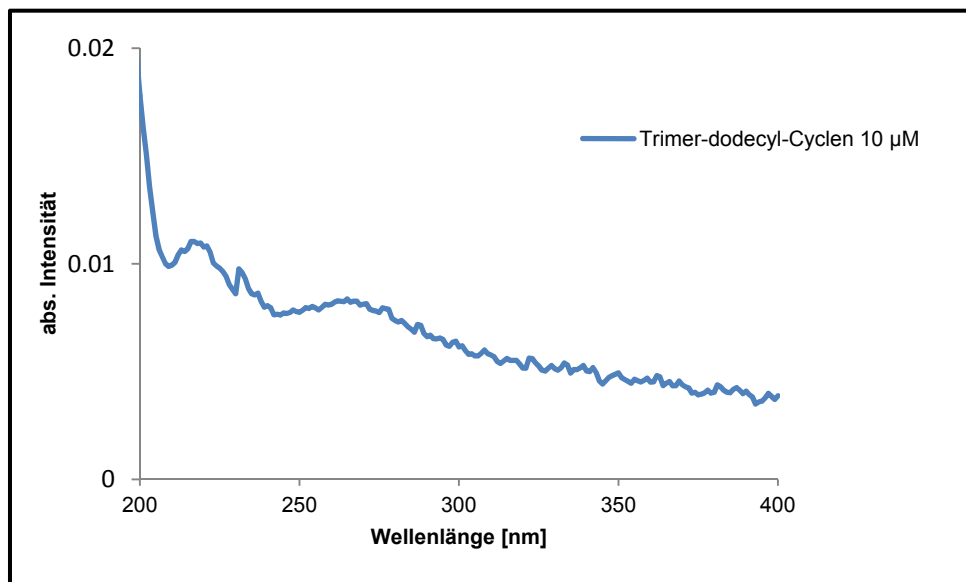


Abb. 105: UV-Spektrum von 10 µM Trimer-dodecyl-Cyclen 86 bei 25 °C.

3.5.3. Experiment zur Herstellung des Co^{III}-Cyclen-Trimer-Komplexes

Der Versuch den Co^{III}-Cyclen Komplex herzustellen, erfolgte nach einer Vorschrift von *Chei et al.*^[109] Hierbei wurde das Trimer-Cyclen-Hybrid **86** mit Cobalt(II)chlorid sowie Lithiumhydroxid in Methanol über Nacht unter Luftsauerstoff umgesetzt.

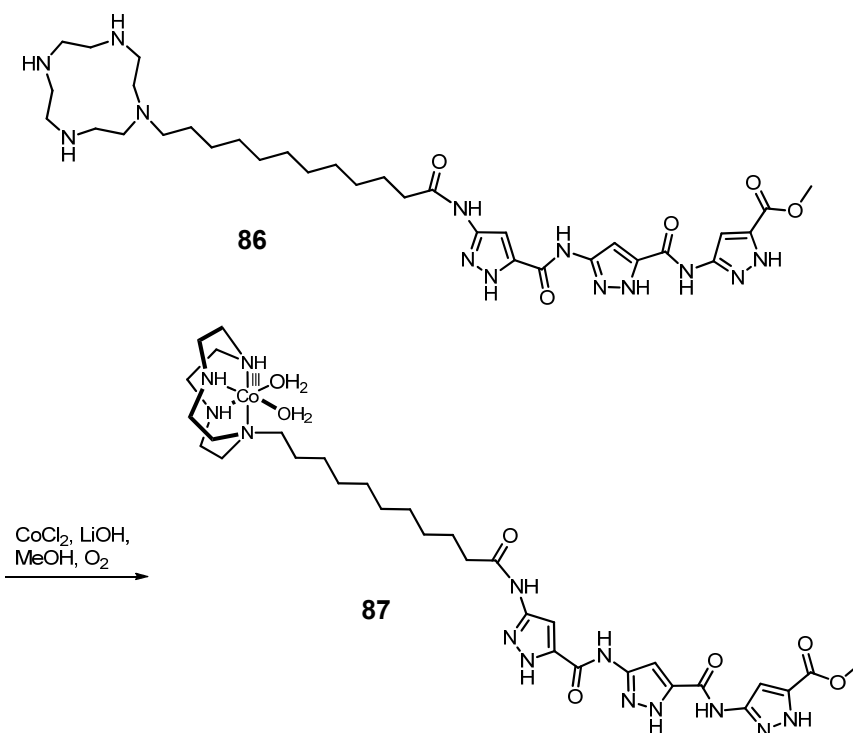


Abb. 106: Reaktionsgleichung zur Co^{III}-Cyclen-Komplexbildung.

Beim Start befanden sich alle Reaktionsteilnehmer in Lösung. Die Überprüfung der Reaktionslösung nach einer Stunde zeigte eine leichte Violettfärbung, was für die Entstehung einer Co^{III}-Spezies spricht.^[109] Nach weiterer Inkubation über Nacht war ein braunvioletter Feststoff ausgefallen, wodurch die Lösung entfärbt wurde. Nach Zentrifugation und Abtrennung des Feststoffes sollte dieser und auch die Lösung analysiert werden. Jedoch wurde festgestellt, dass der Feststoff eine Unlöslichkeit gegenüber jeglichen Lösungsmitteln besaß. Die Vermutung war, dass aufgrund der Co^{III}-Cyclen-Komplexbildung die Wasserlöslichkeit zunehmen sollte, was jedoch nicht der Fall war. Somit konnte nur die Reaktionslösung weiter untersucht werden. In der Lösung konnte mit Hilfe von HPLC-Messungen festgestellt werden, dass sich geringe Mengen einer Substanz durchaus in Lösung befanden. Dabei stimmte die Retentionszeit jedoch mit der des Trimer-dodecyl-Cyclens **86** überein. Theoretisch sollte

sich der Wert für die Retentionszeit vom Cyclen zum Co^{III} -Cyclen-Komplexes aufgrund ihrer unterschiedlichen Polaritäten ändern. Massenspektroskopische Messungen via MALDI-TOF ließen dennoch vermuten, dass sich der Co^{III} -Cyclen Komplex in Lösung befand (für $\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{N}_{13}\text{O}_5\text{Co}$, berechnet: 770.4, gefunden: 770.3). Aufgrund schlechter Löslichkeit des entstandenen Feststoffes und der geringen Menge des sich in Lösung befindlichen Teils konnten mit dieser Leitstruktur keine Peptidhydrolyse-Experimente durchgeführt werden.

3.5.4. Zusammenfassung

Durch mehrere Versuche zur Synthese eines Trimer-Protease-Hybrids auf Cyclenbasis konnte in 13 Stufen das *N*-terminal verknüpfte Trimer-dodecyl-Cyclen **86** hergestellt werden.

Im biophysikalischen Teil konnte bei ThT-Assays nach fünf Tagen Inkubationszeit eine $\text{A}\beta$ -Inhibierung von etwa 50% erreicht werden. Die CD-Messungen zeigten eine kontinuierliche Auflösung der β -Faltblattstruktur nach vier Tagen. Mit der Abschwächung der negativen charakteristischen Bande bei 218 nm konnte zusätzlich ein positiver Cotton-Effekt zwischen 250 und 300 nm beobachtet werden. Dieser Effekt ließ auf die Interaktion der β -Faltblattbrecher-Einheit mit den Phenylalanin-Resten des $\text{A}\beta$ -Peptids schließen.

In der Herstellung der künstlichen Protease wurde das Trimer-Cyclen-Derivat mit CoCl_2 unter oxidativen Bedingungen umgesetzt. Dabei konnte ein geringer Teil des gewünschten Komplexes in Lösung erhalten werden, was massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte. Jedoch konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit in wässrigem Medium keine Peptidspaltungsexperimente durchgeführt werden.

3.6. Einfluss der Aminopyrazol-Hybride auf die Sekretion von APP

Hohe synergistisch inhibitorische Effizienz zeigten Trimer-Spacer-D3-Hybride mit ihrem β -Faltblattbrecher-Element und einer $A\beta$ -disaggregierenden Erkennungseinheit sowohl in biophysikalischen als auch biologischen Experimenten. Modellberechnungen zeigten, dass Trimer-D3 **43** mit seiner peptidischen Einheit die Glutamat-Leiter in einer $A\beta$ -Fibrille erkennt.^[121,122] In Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass Hybrid **43** niederoligomere $A\beta$ -Aggregate vollständig auflösen konnte. Da diese Oligomere keine Glu₂₂-Leiter aufweisen, muss der Inhibitor **43** zusätzlich eine andere Bindungsstelle zu monomerem $A\beta$ aufweisen. Durch diese Überlegungen lag der Fokus schließlich auf dem Vorläuferprotein APP, welches die $A\beta$ -Sequenz beinhaltet und somit auch durch Trimer-D3 **43** erkannt werden sollte. Da könnten die β - und γ -Sekretasen beeinflusst werden.

Für die biologischen Experimente wurde Trimer-D3 **43** nach einer Vorschrift von *März-Berberich* hergestellt.^[120] Ebenso wurde dieser Inhibitor C-terminal mit einer zusätzlichen Lysin-Einheit funktionalisiert, um eine Immobilisierung mit NHS-Sepharose für Affinitätschromatographien zu ermöglichen. Die biologischen Experimente wurden von *Müller-Schiffmann* aus dem *AK Korth* durchgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob Trimer-D3 **43** das APP bindet.

3.6.1. Synthese von Trimer-D3 und Trimer-D3-Lys über SPPS

Im ersten Schritt wurde das D3-Peptid über einen Mikrowellen-Peptid-Synthesizer hergestellt. Dabei wurde die standardmäßige Fmoc-Strategie verwendet und von *Wöll* durchgeführt. Als Startmaterial diente ein Wang-Harz, welches mit der letzten Aminosäure Fmoc-*D*-Arginin(Pbf) für D3 und Fmoc-*D*-Lysin(Boc) für D3-Lys bereits beladen war. Anschließend konnte das gewünschte *D*-Peptid unter Kupplungsbedingungen mit HCTU und DIEA/NMP in DMF hergestellt werden. Durch das Lösungsmittel konnte die Verwendung wasserunlöslicher Komponenten eingeschlossen werden. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgte mit Piperidin in DMF. Nach Abspaltung vom Harz und anschließender Fällung konnten über HPLC und Massenspektrometrie die Reinheit und die richtige Peptidsequenz nachgewiesen werden.

Die Herstellung des Trimer-Hybrids erfolgte schließlich über manuelle Peptidfestphasensynthese. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppe konnte mit HCTU und DIEA in DMF die Trimer-Säure **57** mit dem Peptid gekuppelt werden. Nach Harzabspaltung und PMB-Entschützung konnten über fraktionierendes Fällen die gewünschten Hybridverbindungen erhalten werden. Abb. 107 und 108 zeigen die Reaktionsgleichungen zur Synthese der Hybride **43** und **45** über die manuelle Peptidfestphasensynthese.

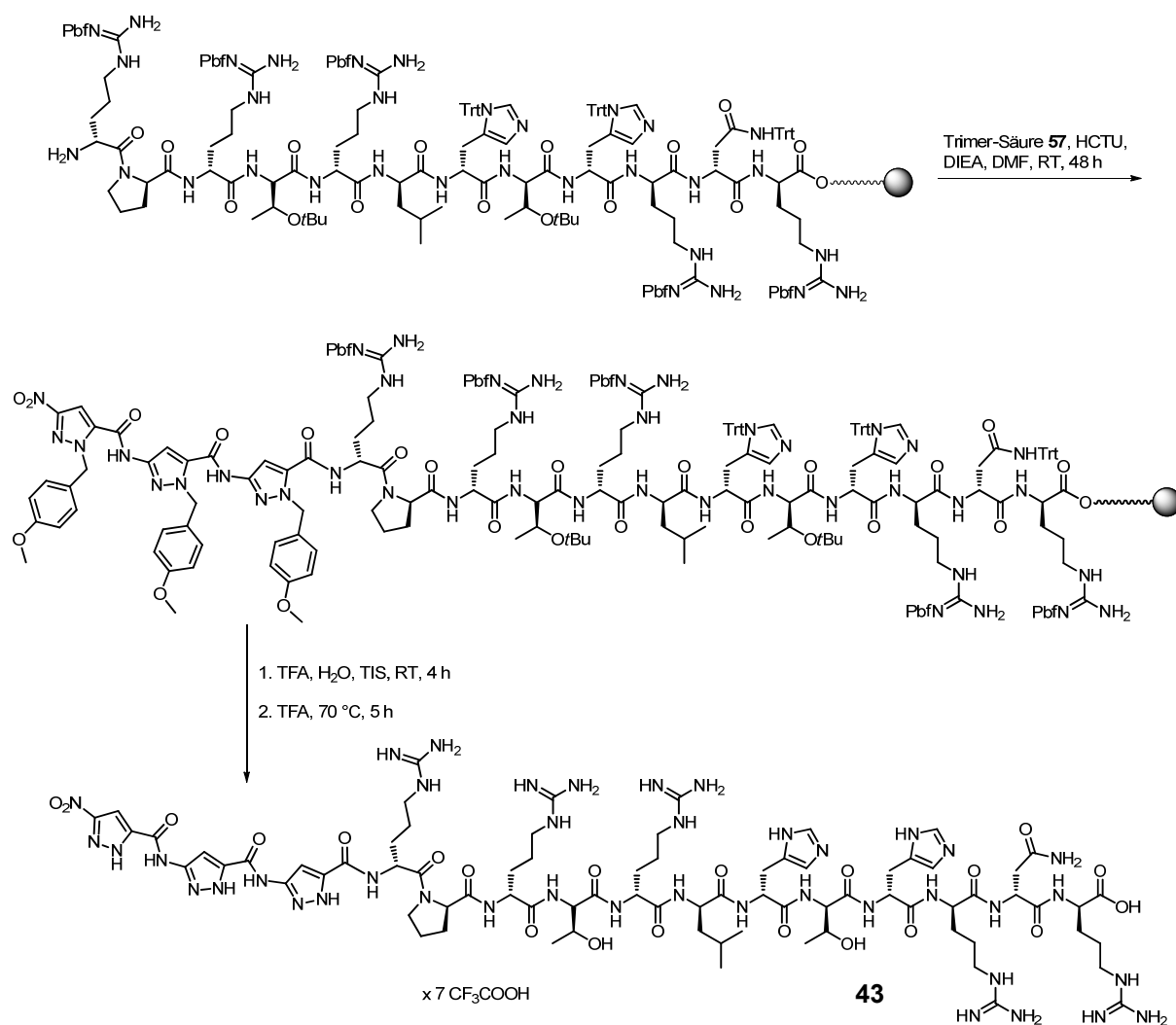


Abb. 107: Reaktionsschema zur Herstellung von Trimer-D3 **43**.

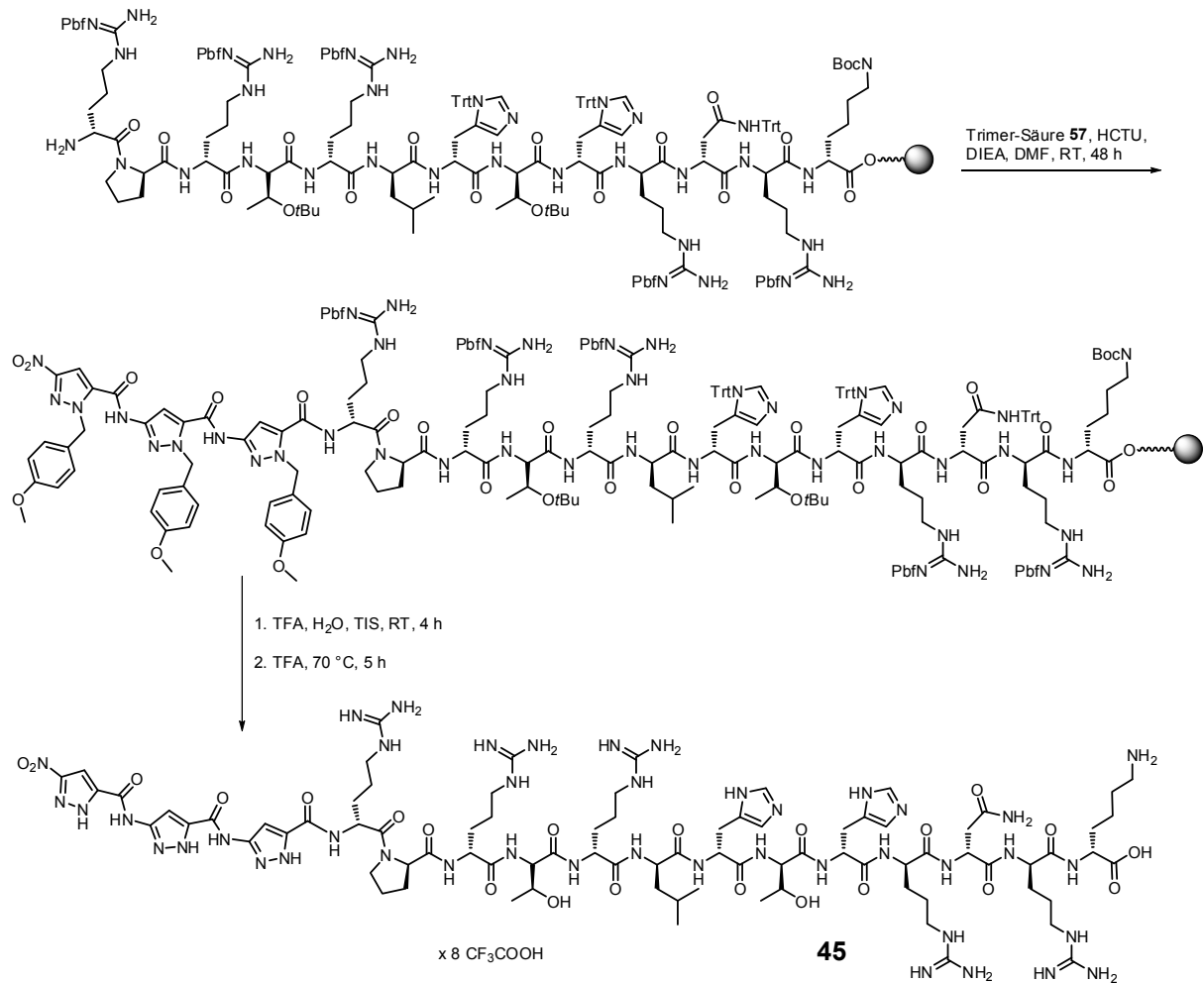


Abb. 108: Reaktionsschema zur Herstellung von Trimer-D3-Lys **45**.

3.6.2. Bindung von Trimer-D3 an APP und Beeinflussung der APP-CTF-Generierung

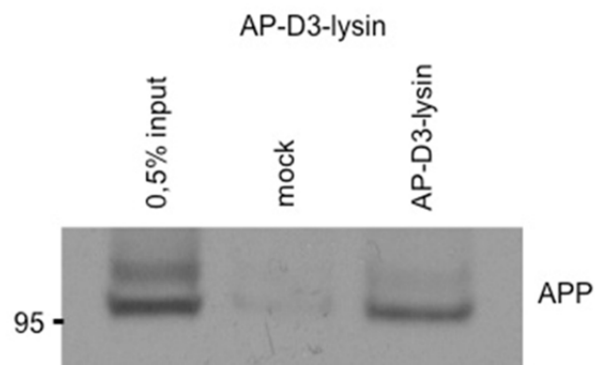


Abb. 109: Western Blot von abgeschiedenem APP von Lysaten der 7Pa2-Zellen (links). Die Verknüpfung von Trimer-D3-Lys **45** mit NHS-Sepharose zeigte eine Bindung zum APP (rechts) im Vergleich zur freien NHS-Sepharose (Mitte). 95 ist die Markerbande für die Größe von 95 kDa.

Laut der Intensitäten der erhaltenen Banden ließ sich in etwa ableiten, dass die Hälfte des abgeschiedenen APP durch Trimer-D3-Lys-Sepharose gebunden wurde, wohingegen die freie NHS-Sepharose keine Affinität zum APP zeigte.

Der Ausgangsschritt der A β -Generierung, welcher die sekretasebedingte Prozessierung des APP voraussetzt, kann durch sterische Wechselwirkungen von Trimer-D3 **43** mit der A β -Domäne im APP beeinflusst werden. Darauffolgend wurden die Konsequenzen in der Generierung von C-terminalen APP-Fragmenten (APP-CTF) durch α -, β - und γ -Sekretase im Hinblick auf die Behandlung von APP mit Trimer-D3 **43** untersucht. Western Blots zeigten aufgrund der Bildung von APP-CTFs in der Größenordnung von α -CTFs, dass Trimer-D3 **43** die APP-Prozessierung beeinflusst, wohingegen der Einsatz der Einzelkomponenten (Trimer + D3) keine Effekte beobachten ließ.

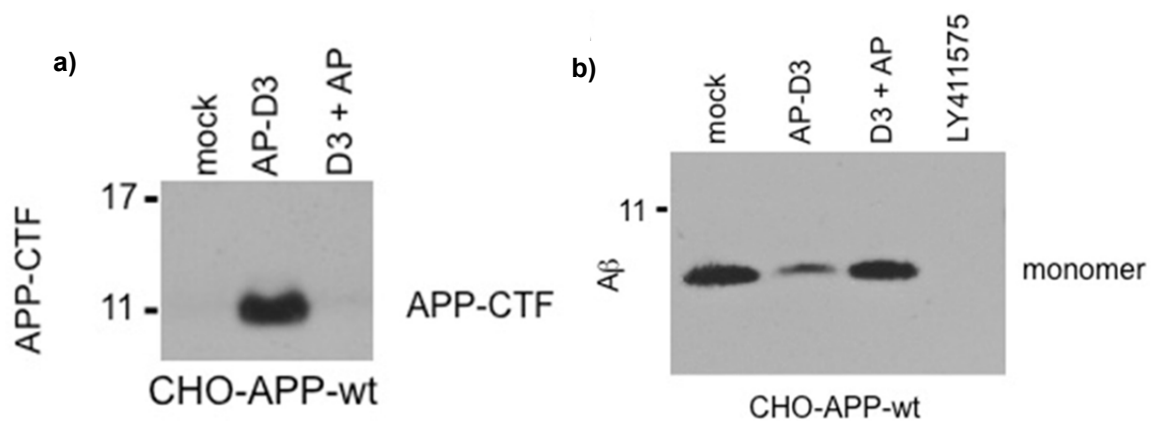


Abb. 110: a) Western Blot für den Nachweis von C-terminalen APP Fragmenten durch den Einfluss von Trimer-D3 **43** im Vergleich zu den Einzelkomponenten. b) Western Blot von immunopräzipitiertem A β mit Einfluss der Wirkstoffe auf seine Bildung.

Der Einfluss von Trimer-D3 **43** auf die APP-Prozessierung innerhalb der A β -Domäne würde die Produktion nicht amyloidogener A β -Fragmente zur Folge haben. Durch Einsatz des IC16-Antikörpers mit N-terminaler A β -Spezifität konnte eine reduzierte Menge von monomerem A β beobachtet werden, was bedeutet, dass der Inhibitor **43** die Prozessierung beeinflusst.

3.6.3. γ -Sekretase Modulierung

Zur Überprüfung einer γ -Sekretase Modulierung legten *Abramowski et al.* dar, dass die Inhibierung der γ -Sekretase zu einer Anreicherung von β - und zum Teil α -CTFs führt.^[138] Darauf aufbauend wurden APP-generierende Zellen mit 10 μ M Trimer-D3 **43** sowie zum Vergleich mit 30 nM des bekannten γ -Sekretase-Inhibitors LY-411575 behandelt.

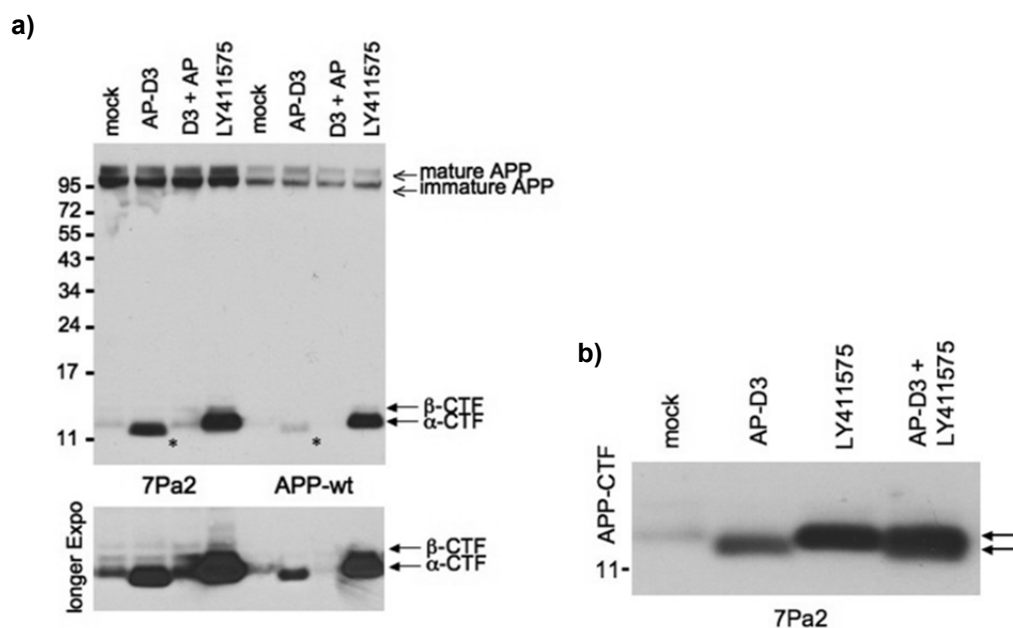


Abb. 111: a) Western Blot für die Überprüfung der γ -Sekretase-Inhibierung durch Trimer-D3 **43**. b) Western Blot zur Überprüfung der Inhibierung durch Kombination von Trimer-D3 **43** und LY-411575.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass durch Trimer-D3 **43** ein anderes C-terminales Fragment entstanden ist als das α -CTF, welches durch LY-411575 induziert wurde. Ebenfalls konnte ein reduziertes Signal des β -CTFs durch die Behandlung mit Trimer-D3 **43** gegenüber LY411575 festgestellt werden. Wie oben bereits erwähnt wurde, zeigten in diesem Experiment die Einzelkomponenten ebenso keine Effekte. Auch die Kombination aus Trimer-D3 **43** und LY-411575 lieferte kein verstärktes Signal für das C-terminale Fragment.

Da Trimer-D3 **43** nicht das typische Spektrum von C-terminalen APP-Fragmenten im Zusammenhang mit der γ -Sekretase-Inhibierung lieferte, wurde ein *in vitro* γ -Sekretase-Aktivitätsassay basierend auf AlphaScreenTM-Technologie^[139] durchge-

führt, um die Modulation durch den Inhibitor **43** auszuschließen. Hierbei wurde ein rekombinantes Fragment, welches den C-terminalen 100 Aminosäuren von APP (APP-C100) entspricht, mit einem γ -Sekretase-Komplex inkubiert. Das bei der Sekretase des APP-C100-Fragments freigesetzte $A\beta(1-40)$ wurde mit Antikörpern, welche den C- und N-Terminus des Peptids erkennen (BAP24 und IC16), detektiert.

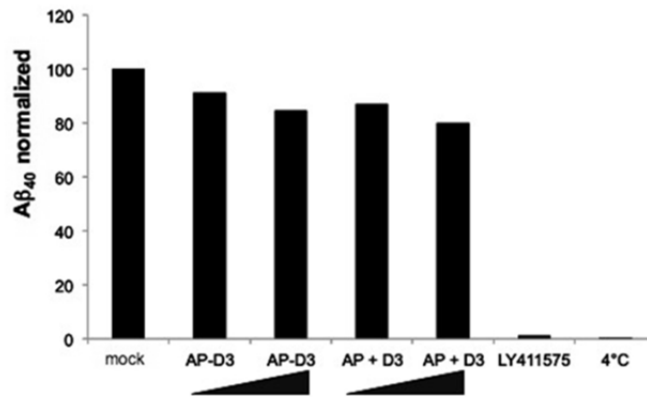


Abb. 112: γ -Sekretase-Aktivitätsassay. Als Nullwert wurde eine Probe bei 4 °C inkubiert.

Weder Trimer-D3 **43** noch die Einzelkomponenten veränderten auffällig die $A\beta(1-40)$ -Produktion. LY-411575 verhinderte nahezu vollständig die Spaltung des APP-C100-Fragments.

Um weiterführende Beeinflussungen in der γ -Sekretase-Aktivität auszuschließen, wurde Notch1^[140] als Substratvariante für die γ -sekretasebedingte Prozessierung ausgewählt. Über die Zelllinie HEK293-FNEXT wurde die FLAG- und Myc-getaggte extrazelluläre Domäne von Notch1 (FNEXT) überexprimiert. Die Prozessierung von FNEXT durch die γ -Sekretase resultiert in einer Myc-getaggten Notch1-Domäne (NICD).^[141]

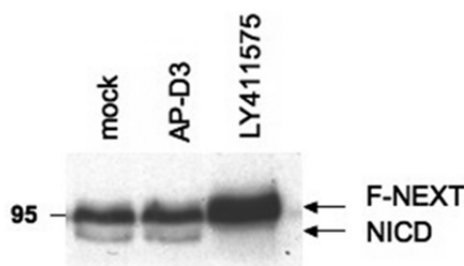


Abb. 113: Western Blot der Überprüfung des Einflusses von Trimer-D3 **43** auf die Notch1-Prozessierung. Als Vergleich diente der bekannte γ -Sekretase-Inhibitor LY-411575.

Die Inkubation solcher Zellen mit 30 nM LY-411575 führte zu einem starken Anstieg von unprozessiertem FNEXT, wobei zusätzlich das NICD Spaltungsprodukt nicht mehr detektiert werden konnte. Trimer-D3 **43** nahm keinen Einfluss auf die FNEXT-Prozessierung und zeigte somit kaum einen Unterschied zur Referenzprobe.

3.6.4. Identifizierung des APP-Fragments

Nachdem festgestellt worden war, dass sich das durch Trimer-D3 **43** hervorgerufene APP-CTF von dem α - und β -CTF unterschied, wurde nach der unbekanntenen neuen Schnittstelle gesucht.

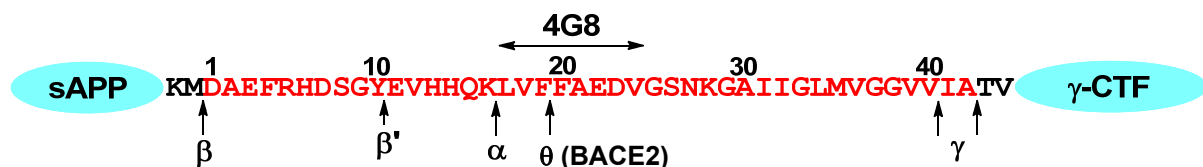


Abb. 114: Schematische Darstellung des APP mit dem Ausschnitt des A β -Peptids (rot) und den Schnittstellen der Sekretasen.

APP kann an mehreren Schnittstellen unterschiedlich prozessiert werden. BACE1 spaltet das Protein an Position 1 (β) und in geringerem Maße an Position 11 (β'), ADAM10 an Position 16 (α) und die γ -Sekretase an mehreren Stellen in der Nähe des C-Terminus von A β (γ). Als alternative α -Sekretase dient BACE2, ein Homolog von BACE1, und prozessiert APP zwischen den Positionen 19 und 20, wodurch das sogenannte θ -CTF gebildet wird.^[142,143] Es ist drei Aminosäuren kürzer als das α -CTF und könnte das APP-CTF darstellen, welches nach Behandlung mit Trimer-D3 **43** beobachtet wurde. Die unbekanntene Schnittstelle wurde durch einen Vergleich des Erkennungsmusters zweier überlappender Antikörper gesucht. Der anti-A β -Antikörper 4G8 erkennt die A β -Sequenz 17-24^[144], CT15 bindet hingegen den Abschnitt 10-23^[145]. Wenn die unbekanntene Spaltstelle zwischen 17 und 24 liegt, sollte CT15 immer noch binden, 4G8 jedoch nicht.

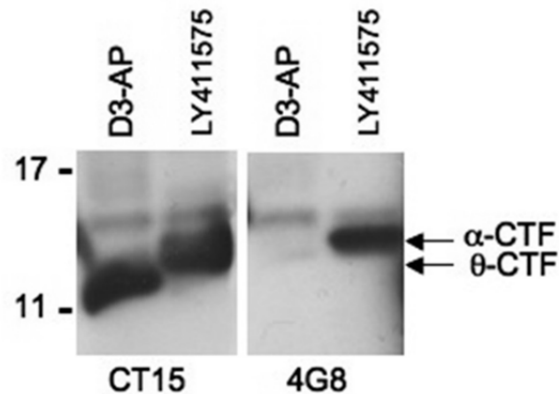


Abb. 115: Western Blot für die Detektierung der durch Trimer-D3 **43** und LY-411575 generierten APP-CTFs mit Hilfe zweier unterschiedlicher Erkennungseinheiten (CT15 und 4G8).

Aus den Western Blots geht eindeutig hervor, dass CT15 beide dominanten CTFs erkennt, welche durch die Behandlung mit Trimer-D3 **43** oder LY-411575 immunopräzipitiert wurden. Der Antikörper 4G8 wechselwirkte hingegen nur mit dem α -CTF, welches durch Behandlung mit LY-411575 generiert wurde, und konnte das durch Trimer-D3 **43** induzierte CTF nicht detektieren. Dieses Ergebnis für die APP-Prozessierung in Gegenwart von Trimer-D3 **43** legt nahe, dass die Spaltstelle in der Tat zwischen 17 und 24 liegt, also näher am C-Terminus als der α -Sekretase-Schnitt.

3.6.5. Einfluss der Spacerlänge auf die θ -CTF-Generierung

Müller-Schiffmann et al. zeigten bereits in vorangegangenen Arbeiten, dass die Länge des Spacers zwischen der Aminopyrazol-Einheit und dem D3-Peptid mit der Anti-Oligomerisierungseffizienz im Zusammenhang steht.^[121,122] In Bezug auf die APP-Prozessierung wurde nun auch Abhängigkeit der θ -CTF-Produktion von der Flexibilität und Länge der Spacer untersucht. Zusätzlich zum „zero-spacer“ **43** wurden ein kurzer GABA-, ein mittlerer TEG- und ein langer TEG-TEG-Spacer verwendet. In 7Pa2 Zellen war nur Trimer-GABA-D3 fähig die Bildung von θ -CTF zu induzieren. Mit größerer Spacerlänge waren θ -CTFs nicht detektierbar. Andererseits war zu erkennen, dass die Bildung des BACE1-Spaltungsprodukts (β -CTF) bei der Inkubation mit den kurzen Hybriden Trimer-GABA-D3 und Trimer-D3 **43** verringert wurde.

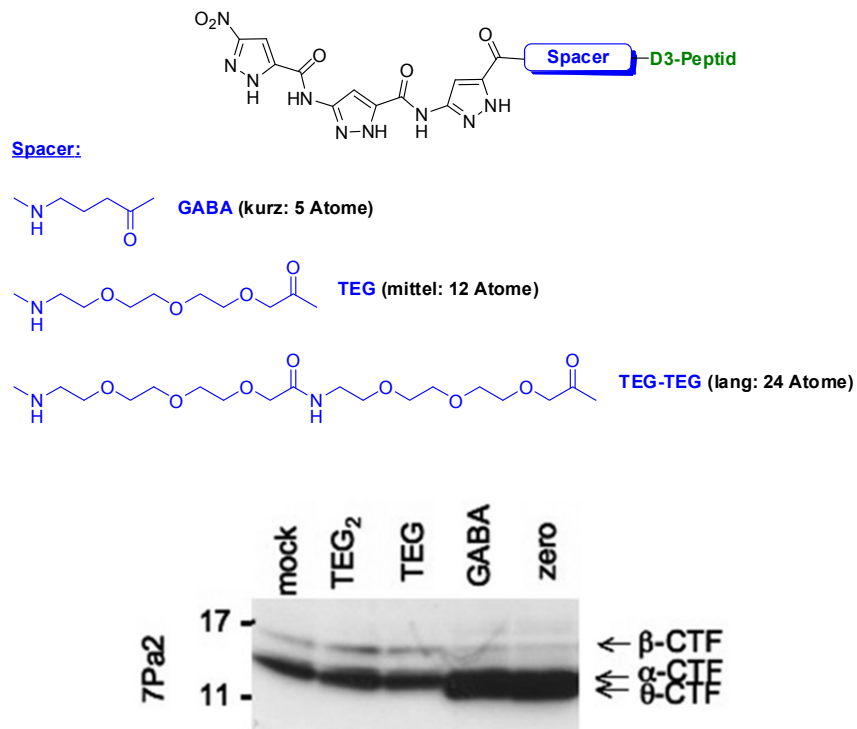


Abb. 116: Strukturaktivitätsbeziehung in der θ -CTF-Induktion mit unterschiedlichen Spacerlängen.

Fazit: Die Induktion von θ -CTF wird mit kurzen Linkern favorisiert. Gleichzeitig wird die Bildung von β -CTF unterdrückt.

3.6.6. Zusammenfassung

Der Einfluss von Trimer-D3 **43** auf die Sekretion des Amyloid Precursor Proteins (APP) wurde in unterschiedlichen biologischen Tests untersucht. In Western Blots konnte nachgewiesen werden, dass Trimer-D3-Lys **45**, welches nach Crosslinking mit NHS-Sepharose immobilisiert wurde, in der Lage ist APP zu binden. Im Folgenden wurde überprüft, ob sich dadurch die Sekretion von APP verändert.

Die Sekretion von APP lieferte in Anwesenheit von Trimer-D3 **43** überraschend C-terminale APP-Fragmente (APP-CTF), deren Größe sich von der unterscheidet, die durch α -, β - oder γ -Sekretase gebildet wird. Der Einsatz beider Einzelkomponenten (AP + D3) hatte dagegen keinen Einfluss auf die APP-Sekretion.

Im Einzelttest wurde bestätigt, dass Trimer-D3 **43** im Gegensatz zu dem bekannten γ -Sekretase-Inhibitor LY-411575 tatsächlich keinen Einfluss auf die γ -Sekretase ausübt.

Über die Identifizierung der Schnittstelle im APP wurde die mögliche Bildung von θ -CTFs durch Trimer-D3-Einwirkung überprüft (Beeinflussung von BACE2). Der CT15-Antikörper, welcher die A β (10-23)-Sequenz erkennt, konnte auch das vom Aminopyrazol-D3-Hybrid induzierte APP-CTF binden; das kleinere Epitop A β (17-24) von 4G8 reichte dazu nicht aus. Daraus lässt sich schließen, dass in Gegenwart von Trimer-D3 **43** die APP-Prozessierung näher am C-Terminus erfolgt als an der α -Sekretase-Spaltungsstelle. Das würde zu einer BACE2-Spaltung zwischen 19 und 20 gut passen. Endgültige Klarheit sollen hier massenspektrometrische Untersuchungen der gebildeten Fragmente ergeben.

3.7. Zellgängigkeit von Aminopyrazol-Derivaten

Nanopartikel werden großflächig im Bereich der Zellbiologie und Medizin für photodynamische Therapien und Wirkstofftransport verwendet.^[146,147] Da große Moleküle oftmals nicht die Zellmembran überqueren können, werden diese auf Nanopartikel adsorbiert, um den Zellübergang zu erleichtern.^[148,149] Es ist bekannt, dass Nanopartikel mit einem Durchmesser bis 120 nm durch Endocytose auf die intrazelluläre Seite gelangen.^[150] Ein Forschungszweig des *AK Eppe* befasst sich mit anorganischen Nanopartikeln, welche den Transport von organischen Substanzen über die Membran in den intrazellulären Raum ermöglichen. Als Beispiel dient die Transfektion in der Zellbiologie.^[149,151]

Calciumphosphatnanopartikel dienen als nonvirale Überträger in der Gentherapie und bieten beispielsweise orale Applikationen in der Aufnahme von Insulin.^[152,153,154] Durch einen geklärten Mechanismus in der Aufnahme von anionischen und kationischen Calciumphosphatnanopartikeln finden diese einen großen Anwendungsbereich in Knochenersatzmaterialien sowie beim Wirkstofftransport.^[149,151,155,156] Praktisch gesehen ist es nötig organische Verbindungen mit einem Fluoreszenzlabel auszustatten, um über Fluoreszenzmikroskopie Emissionen innerhalb der Zelle beobachten zu können, ob das Einliefern eines Wirkstoffes in die Zelle erfolgreich gewesen ist.

Da Trimer-D3 **43** bisher die potenteste Verbindung war, wurde überlegt, dieses mit Fluoreszenzfarbstoffen zu funktionalisieren und mit Calciumphosphat-Nanopartikeln zu verknüpfen, um die Möglichkeit für Fluoreszenzuntersuchungen zu gewährleisten.

3.7.1. Synthese fluoreszenzgelabelter Aminopyrazol-Hybride über SPPS

Wie auch im vorherigen Kapitel beschrieben, wurden zunächst die Peptide über SPPS hergestellt. Hierbei wurde ein mit Fluoreszenzlabel beladenes Harz als Startmaterial verwendet. Die beiden Harze waren Dansyl NovaTag™ Resin und Mca NovaTag™ Resin mit einer Coumarin-Einheit als Label. Unter gleichen Bedingungen wie im vorherigen Abschnitt zunächst das Peptid hergestellt, woraufhin schließlich die Trimer-Säure **57** manuell gekuppelt wurde. Durch die Harzabspaltung und die PMB-Entschützung mit anschließender fraktionierender Fällung konnten die gewünschten fluoreszenzgelabelten Hybridverbindungen erhalten werden. Abb. 117 und 118 zeigen die Reaktionsschemata zur Herstellung von Trimer-D3-Dansyl **88** und Trimer-D3-Coumarin **89**.

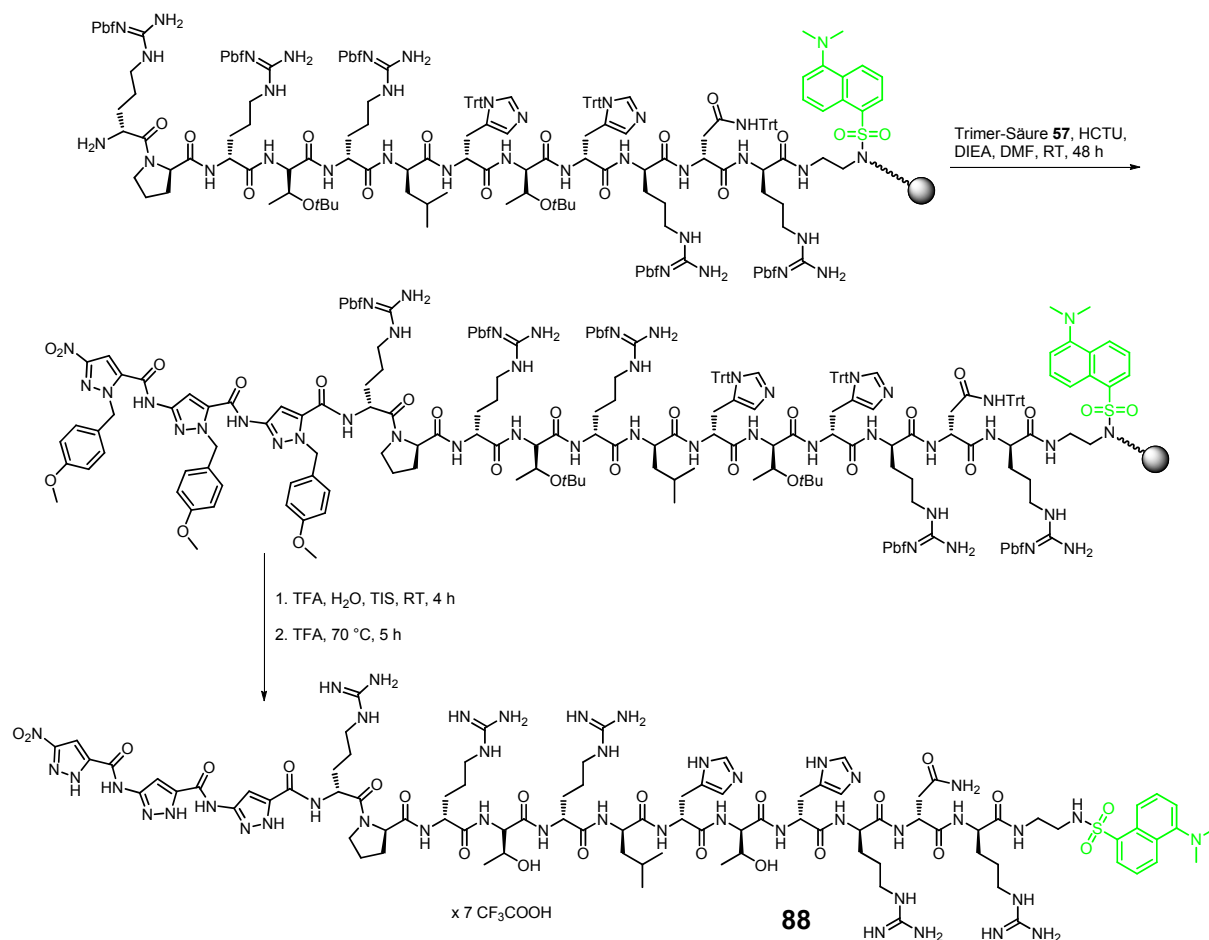


Abb. 117: Reaktionsschema zur Herstellung von Trimer-D3-Dansyl **88**.

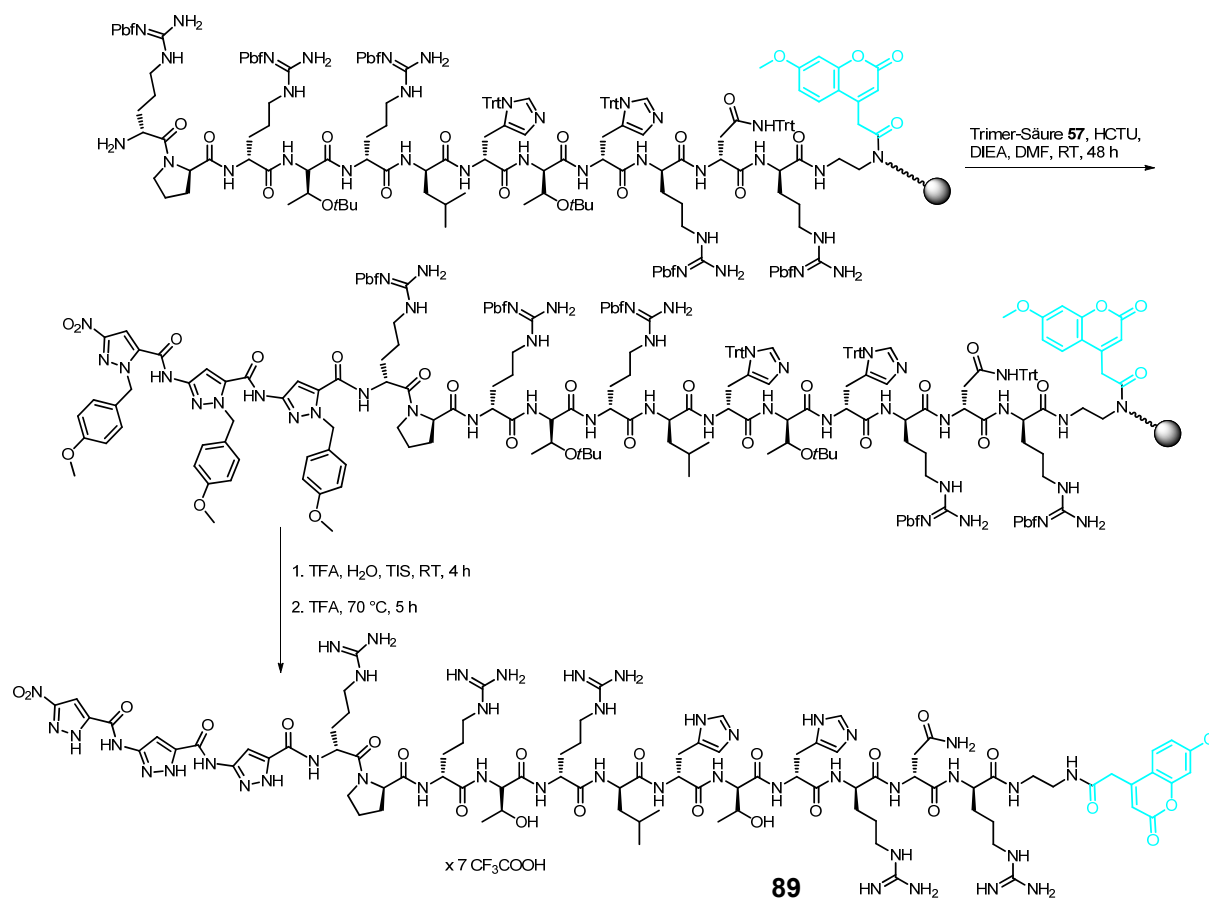


Abb. 118: Reaktionsschema zur Herstellung von Trimer-D3-Danysyl 89.

3.7.2. UV/Vis- und Fluoreszenzmessungen der gelabelten Trimer-Derivate

Um die Absorptionswellenlängen für Fluoreszenz-Experimente zu ermitteln, wurden UV/Vis-Spektren aufgenommen.

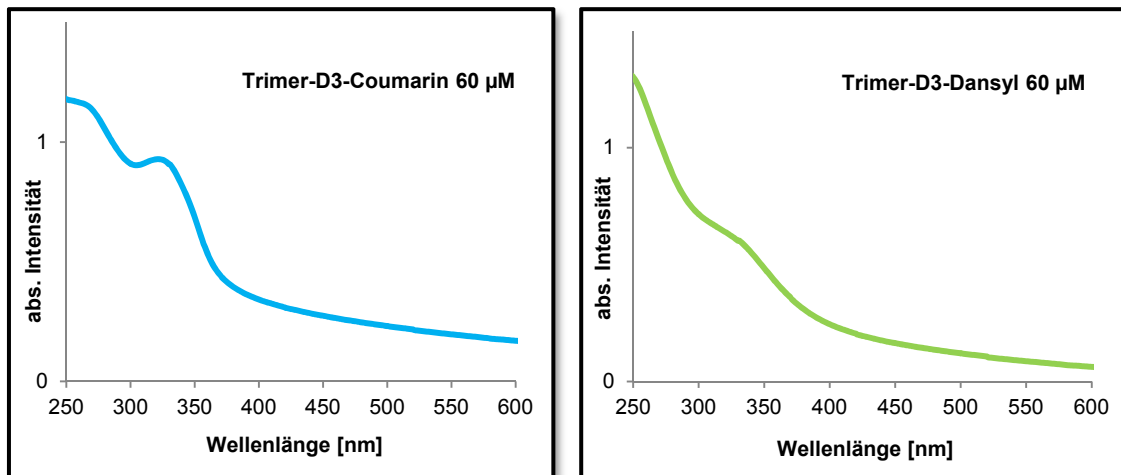


Abb. 119: UV-Spektren von Trimer-D3-Coumarin **89** (links) und Trimer-D3-Dansyl **88** (rechts) (jeweils 60 µM in PBS-Puffer).

Die ermittelten Absorptionsmaxima lagen für Trimer-D3-Coumarin **89** bei $\lambda = 322$ nm und für Trimer-D3-Dansyl **88** bei $\lambda = 315$ nm. Nach Einstrahlung der ermittelten Anregungswellenlängen konnten die jeweiligen Fluoreszenzspektren der Trimer-D3-Derivate erhalten werden.

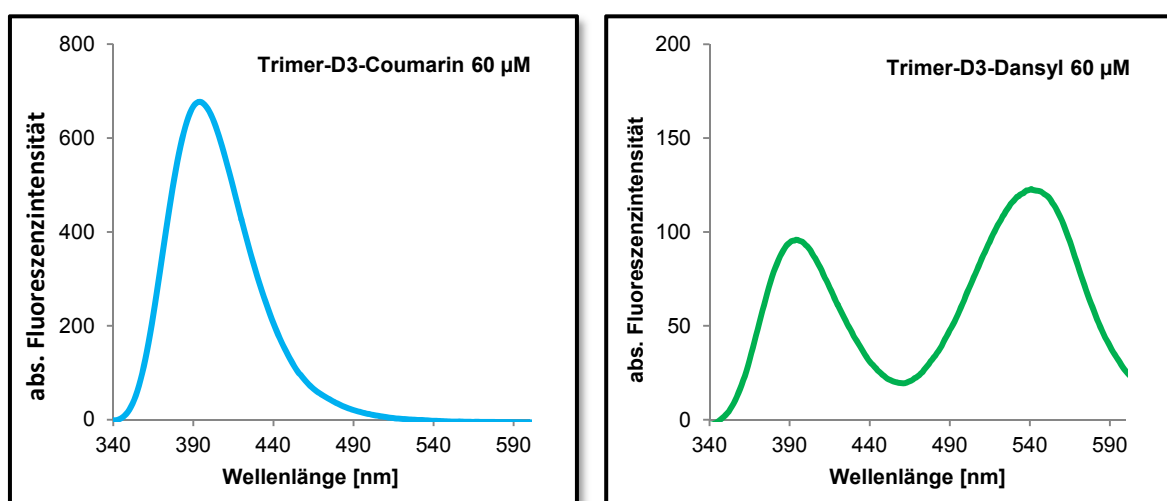


Abb. 120: Fluoreszenzspektren von Trimer-D3-Coumarin **89** (links, 60 µM in PBS, Excitationswellenlänge: 322 nm) und Trimer-D3-Dansyl **88** (rechts, 60 µM in PBS, Excitationswellenlänge: 315 nm).

Das Emissionsmaximum für Trimer-D3-Coumarin **89** lag bei 394 nm, für Trimer-D3-Dansyl **88** ergaben sich zwei Emissionsmaxima, wobei das erste mit dem Maximum vom Trimer-D3-Coumarin **89** übereinstimmt, ist dieser Wert auf die peptidische Sequenz vom D3 zurückzuführen, da Trimer-D3 **43** dieselbe Emissionsbande aufweist und hierbei nur durch die Coumarin-Einheit verstärkt wird. Da die Werte für die ThT-Absorption 446 nm und für die –Emission 490 nm betragen, kann eine Interferenz bei ThT-Assays ausgeschlossen werden. Diese wurden als nächstes durchgeführt, um die Inhibierungsaktivität der gelabelten Derivate zu überprüfen.

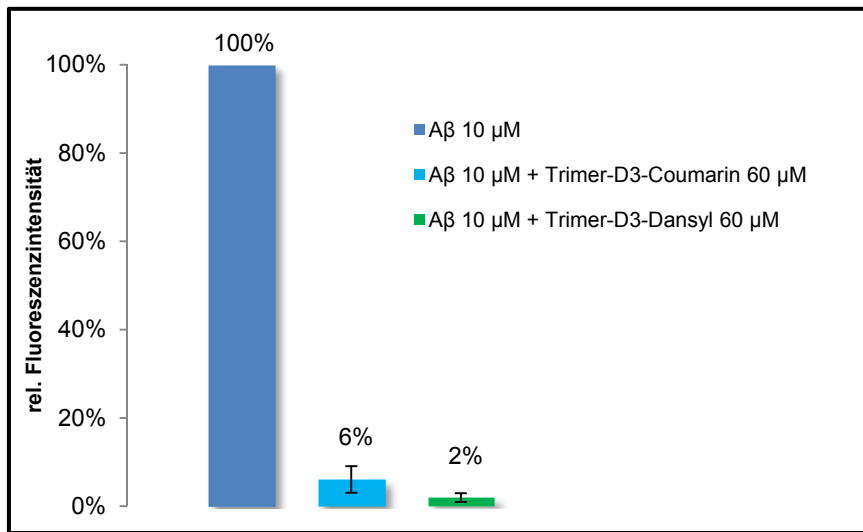


Abb. 121: ThT-Assay mit den fluoreszierenden Hybriden **88** und **89** in sechsfachem Überschuss in Bezug auf 10 μM Aβ(1-42) (37 °C, 650 rpm, 5 d).

Es ist zu erkennen, dass die beiden fluoreszenzgelabelten Trimer-D3-Hybride eine ähnlich gute Effizienz aufweisen wie Trimer-D3 **43**.^[120] Das einzige Problem, das hier auftrat, war die Wasserunlöslichkeit der beiden Komponenten. Ebenfalls konnten für CD-Messungen keine Stammlösungen in HFIP hergestellt werden, was somit weitere biologische/biophysikalische Experimente ausschloss.

3.7.3. Zelltransportexperimente

Die Herstellung und Charakterisierung der funktionalisierten Nanopartikel sowie die Durchführung der Zelltransportexperimente wurden von *Rotan* aus dem *AK Epple* übernommen.

Für die Synthese der funktionalisierten Nanopartikel wurden zunächst Calciumnitrat- und Diammoniumhydrogenphosphat-Lösung zusammengegeben. Anschließend wurde PSS- oder PEI-Lösung in einem Verhältnis von Ca:P:PSS 1:1:2 bzw. Ca:P:PEI 2.5:2.5:1 hinzugefügt. Darauffolgend wurden verschiedene Mengen an fluoreszenzgelabelten Trimer-Hybriden in einer DMSO-Stammlösung hinzupipettiert. Die präparierten Proben wurden über Nacht in der Dunkelheit stehen gelassen. Letztlich wurden die Proben zentrifugiert und im selben Volumen Wasser redispergiert. Die erhaltenen Nanopartikel wurden dann zunächst in ihrer Partikelgröße, Größenverteilung und Oberflächenladung charakterisiert.

Über die DLS konnte der PDI, die Partikelgröße sowie das Oberflächenpotential ζ ermittelt werden. Eine andere Methode zur Bestimmung der Partikelgrößen war die „nanoparticle tracking analysis“ (NanoSight Ltd).^[157] Beide Varianten messen die Brown'sche Molekularbewegung. Mit der bekannten Diffusionskonstante kann dann auf den hydrodynamischen Radius geschlossen werden. Als Maß für die Monodispersität wurde der PDI bestimmt. Bei einem PDI zwischen 0.1-0.2 liegen die Teilchen annähernd monodispers vor.^[158] In den Tab. 2-5 sind die Ergebnisse der Fluoreszenz-Hybride **88** und **89** mit den beiden unterschiedlichen Stabilisatoren (PSS und PEI) zusammengefasst.

Tab. 2: Charakterisierung von zweischaligen gereinigten CaP/PSS/Trimer-D3-Dansyl-Nanopartikeln.

Proben	PDI	Partikelgröße (DLS) [nm]	Partikelgröße (NS) [nm]	ζ -Potential [mV]	Konzentration von 88 [$\mu\text{g/mL}$]
1	0.475	408	131 \pm 57	-24	100
2	0.777	890	99 \pm 42	-21	200
3	0.509	614	101 \pm 46	-25	300
4	0.501	551	87 \pm 34	-24	500

Tab. 3: Charakterisierung von zweischaligen gereinigten CaP/PEI/Trimer-D3-Dansyl-Nanopartikeln.

Proben	PDI	Partikelgröße (DLS) [nm]	Partikelgröße (NS) [nm]	ζ-Potential [mV]	Konzentration von 88 [µg/mL]
1	0.260	115	134 ± 47	+24	100
2	0.457	142	136 ± 60	+23	200
3	0.314	224	148 ± 65	+23	300
4	0.430	232	154 ± 70	+20	500

Tab. 4: Charakterisierung von zweischaligen gereinigten CaP/PSS/Trimer-D3-Coumarin-Nanopartikeln.

Proben	PDI	Partikelgröße (DLS) [nm]	Partikelgröße (NS) [nm]	ζ-Potential [mV]	Konzentration von 89 [µg/mL]
1	0.286	160	118 ± 37	-18	100
2	0.219	110	136 ± 50	-22	200
3	0.285	142	99 ± 37	-26	300
4	0.190	152	77 ± 26	-21	500

Tab. 5: Charakterisierung von zweischaligen gereinigten CaP/PEI/Trimer-D3-Coumarin-Nanopartikeln.

Proben	PDI	Partikelgröße (DLS) [nm]	Partikelgröße (NS) [nm]	ζ-Potential [mV]	Konzentration von 89 [µg/mL]
1	0.389	185	140 ± 50	+28	100
2	0.300	221	113 ± 45	+27	200
3	0.301	167	115 ± 44	+23	300
4	0.432	264	125 ± 47	+22	500

Bei den DLS- und NS-Messungen wurden im Mittel Partikeldurchmesser von 100 nm bestimmt. Die DLS-Methodik lieferte prinzipiell größere Partikeldurchmesser als die der NS. Die DLS-Ergebnisse für die Partikeldurchmesser der CaP/PSS/Trimer-D3-Dansyl-Nanopartikel wichen von den anderen am stärksten ab. Jedoch zeigten die hohen PDI-Werte, dass vermutlich durch Bildung unterschiedlich großer Aggregate eine Polydispersität vorlag und somit die Resultate für die Größen unzureichend bestimmt werden konnten. Im Gegensatz dazu lieferten die NS-Messungen annähernd gleichgroße Partikel wie bei den anderen funktionalisierten Nanopartikeln. Die PDIs der anderen Konjugate zeigten im Mittel eine Monodispersität, wodurch die Partikel-

größen via DLS nur geringfügig größer waren als die der NS. Die ζ -Potentiale der hergestellten Nanopartikel lieferten die erwarteten Ergebnisse bezüglich ihrer formalen Oberflächenladung. Bei den Partikeln mit anionischen PSS-Stabilisatoren wurden negative und bei den kationischen PEI-Stabilisatoren wurden positive Potentiale gemessen.

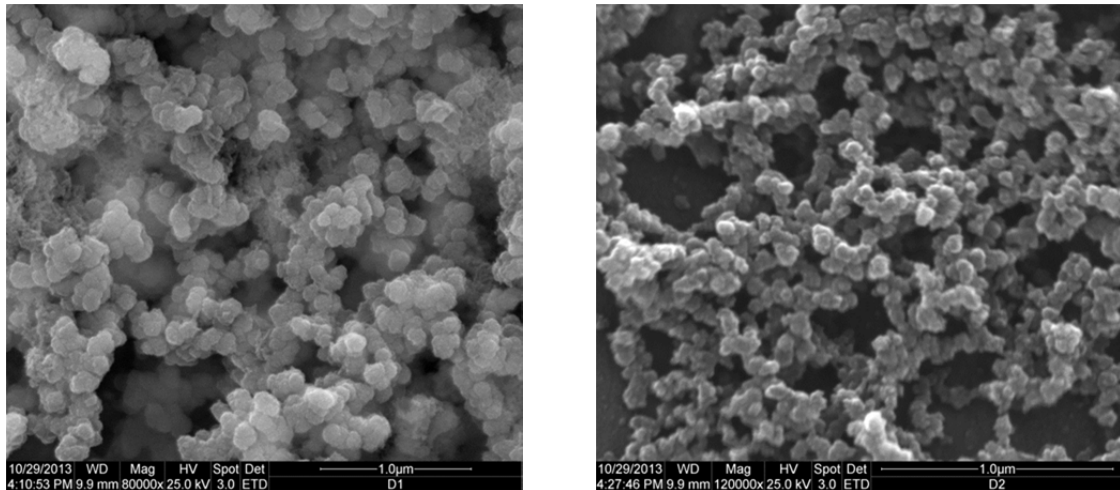


Abb. 122: REM-Aufnahmen der mit 500 µg/mL Trimer-D3-Dansyl-funktionalisierten NPs (links: CaP/PEI/88, rechts: CaP/PSS/88).

Die REM-Aufnahmen bestätigten die Partikelcharakteristika weitestgehend. Die Partikelgrößenbestimmung über NS stimmte dennoch besser mit den visuellen Ergebnissen der REM überein. Zu erkennen waren annähernd gleichgroße Partikel, welche im Mittel einen Durchmesser von 100 nm besaßen.

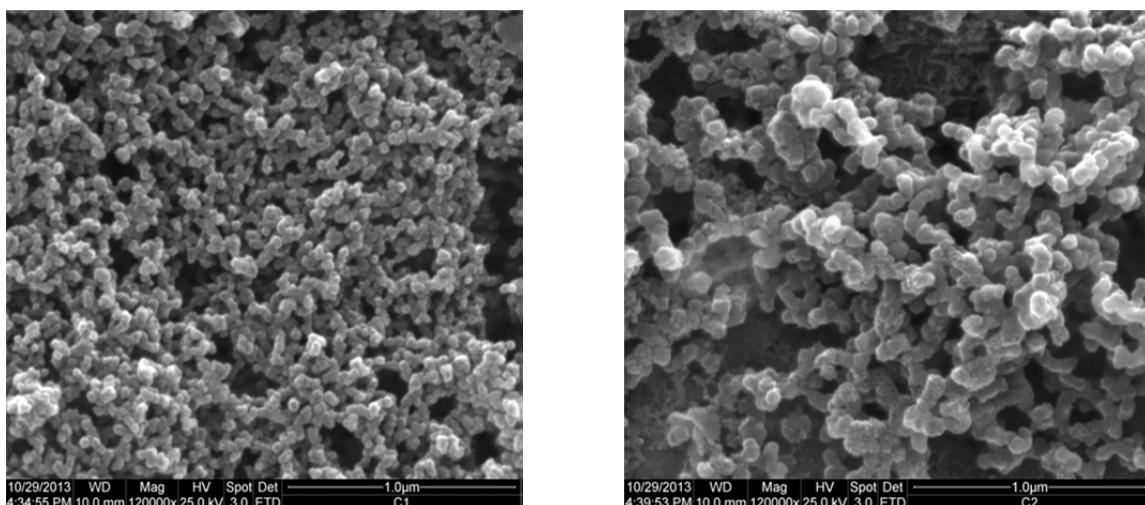
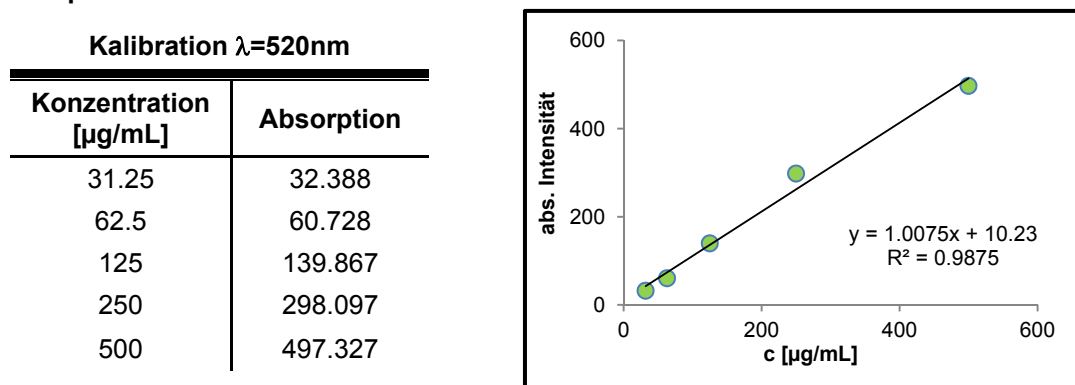


Abb. 123: REM-Aufnahmen der mit 500 µg/mL Trimer-D3-Coumarin-funktionalisierten NPs (links: CaP/PEI/89, rechts: CaP/PSS/89).

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Adsorptionseffizienz der Hybride auf die Nanopartikel war die Quantifizierung über UV/Vis-Spektroskopie. Hierbei wurde über die Lambert-Beer'sche Beziehung zunächst eine Kalibrationsgerade erstellt. Anschließend konnte mit Hilfe der Absorptionsintensität der Überstandslösung auf die adsorbierte Menge auf den Nanopartikeln geschlossen werden.

Tab. 6: UV/Vis-Quantifizierung zur Bestimmung der Konzentration von Trimer-D3-Dansyl 88 auf den Nanopartikeln.



Proben	Überstand		An den NPs		
	PEI	Absorption	Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Gehalt in %
1		11.904	1.66	98.34	98
2		31.746	21.36	178.64	89
3		75.39	64.67	235.33	78
4		172.622	161.18	338.82	68
	PSS	Absorption	Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Gehalt in %
1		0	0	100	100
2		97.773	86.89	113.11	57
3		142.177	130.96	169.04	56
4		270.046	257.88	242.12	48

Die Funktionalisierungen der Nanopartikel mit Trimer-D3-Dansyl 88 verliefen mit insgesamt guten Ausbeuten. Die Nanopartikel mit den kationischen Polymeren als Stabilisator zeigten bessere Adsorptionsergebnisse für das Hybrid 88 im Vergleich zu den anionisch stabilisierten NPs. Insgesamt sinkt der Hybrid-Gehalt auf den NPs mit höherer angesetzter Konzentration, was damit zu begründen sein könnte, dass ab einem gewissen Konzentrationswert der Sättigungsgrad immer näher erreicht wurde.

Zur Überprüfung der toxischen Wirkung der funktionalisierten NPs in Zellen wurden MTT-Tests durchgeführt. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (**90**)) ist ein Farbstoff, mit dessen Hilfe die Lebensfähigkeit von Zellen überprüft werden kann.^[159]

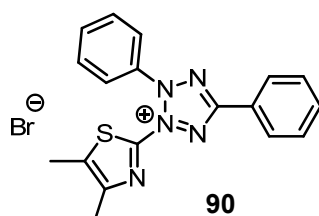


Abb. 124: Struktur von MTT (**90**).^[159]

MTT (**90**) liefert eine gelbe Lösung. Durch Dehydrogenase und Reduktase in den Zellen entsteht ein violette Formazan-Derivat, welches in Relation mit der Zellaktivität steht. Je mehr Formazan gebildet wird, desto aktiver sind die überprüften Zellen.^[160]

Tab. 7: MTT-Test zur Bestimmung der Vitalität von NP-behandelten HeLa-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (100%).

Proben	Trimer-D3-Dansyl-NPs		Trimer-D3-Coumarin-NPs	
	PEI	PSS	PEI	PSS
1	112 ± 1%	102 ± 2%	110 ± 1%	106 ± 1%
2	103 ± 2%	103 ± 3%	109 ± 2%	95 ± 2%
3	101 ± 3%	111 ± 1%	111 ± 2%	110 ± 2%
4	102 ± 2%	107 ± 2%	111 ± 2%	109 ± 1%

Die MTT-Assays mit den fluorophoregelabelten NPs zeigten keine Toxizität bei HeLa-Zellen, da im Vergleich zu unbehandelten Zellen die Zellaktivität mit den behandelten Zellen vergleichbar war.

Darauffolgend wurden die Transportuntersuchungen durchgeführt. In Abb. 125 sind oben die behandelten HeLa-Zellen mikroskopisch dargestellt. Unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie konnte festgestellt werden, dass die funktionalisierten NPs mit Trimer-D3-Dansyl **88** nicht von den Zellen aufgenommen wurden (Abb. 125 unten). Transportuntersuchungen mit Trimer-D3-Coumarin **89** konnten nicht durchgeführt werden, da das verwendete Fluoreszenzmikroskop keinen Filter für die entsprechende Emissionswellenlänge des Fluorophors besaß.

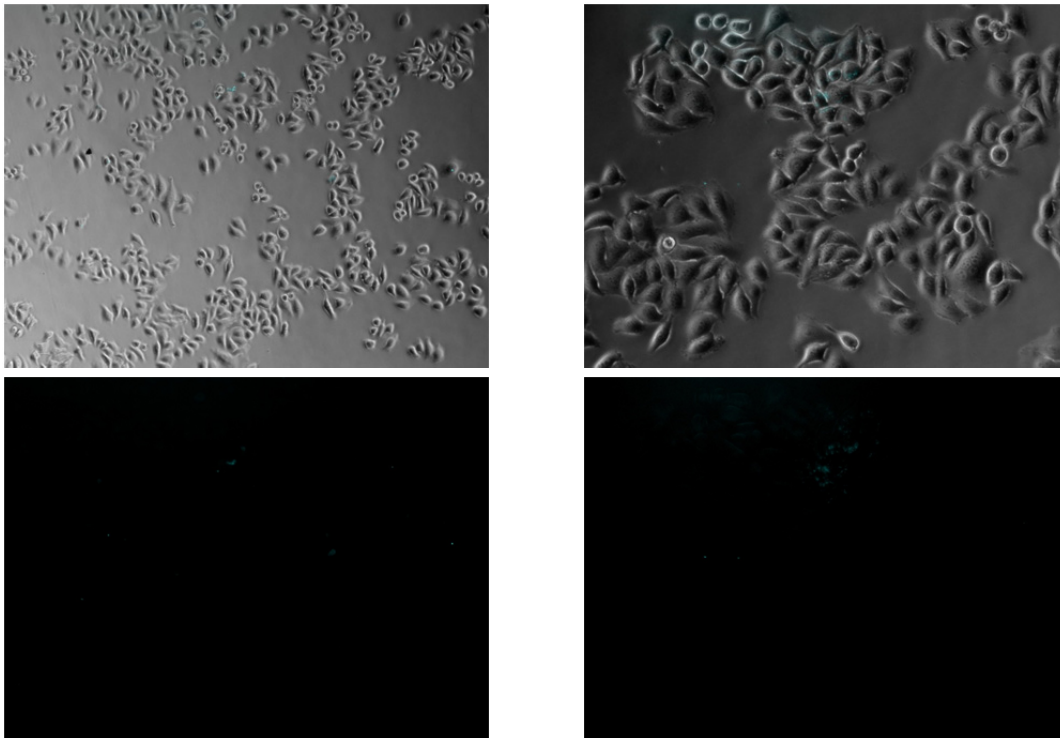


Abb. 125: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der mit 500 µg/mL Trimer-D3-Dansyl-funktionalisierten NPs (links: CaP/PEI/88, rechts: CaP/PSS/88) an HeLa-Zellen.

Des Weiteren wurde die Zellviabilität gegenüber den reinen Hybrid Komponenten überprüft. Dabei wurden HeLa-Zellen und MG-63-Zellen eingesetzt.

Tab. 8: MTT-Test zur Bestimmung der Vitalität von HeLa-Zellen durch die reinen Komponenten 88 und 89.

Menge in DMSO [µL]	Trimer-D3-Dansyl 88, Vitalität	Trimer-D3-Coumarin 89, Vitalität
50	9 ± 2%	29 ± 8%
25	42 ± 5%	70 ± 7%
10	77 ± 2%	88 ± 2%
5	84 ± 12%	88 ± 9%

Hierbei war zu erkennen, dass bei 50 µL Zugabe der DMSO-Stammlösung mit **88** und **89** eine hohe Zelltoxizität zu erkennen war. Je weniger Hybridkomponenten dazu gegeben wurden, desto höher war die Zellaktivität.

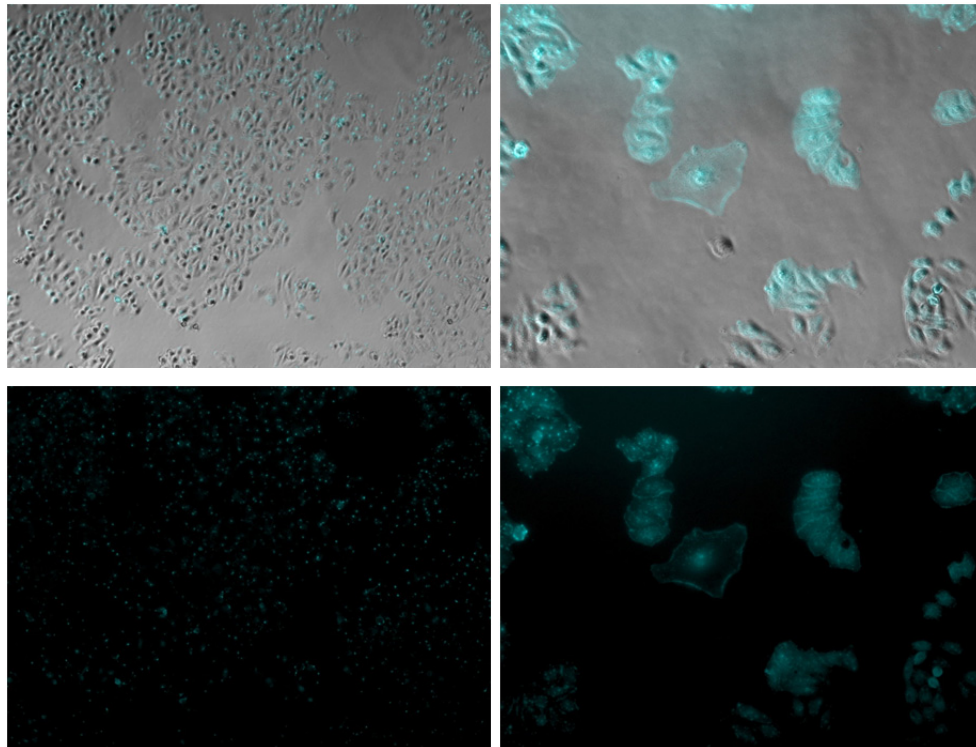


Abb. 126: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der mit 25 μL Trimer-D3-Dansyl **88** in DMSO zu $5 \cdot 10^5$ HeLa-Zellen.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der reinen Dansylkomponente **88** zeigte fluoreszierende Zellen, jedoch wird vermutet, dass sich das Label nur auf den Zelloberflächen anlagert.

Die Behandlung der MG-63-Zellen mit den reinen Hybridsubstanzen zeigte ähnliche Ergebnisse wie die der HeLa Zellen (Tab. 9). Bei 50 μL Zusatz von Trimer-D3-Dansyl **88** blieb circa die Hälfte der Zellaktivität vorhanden und ab 10 μL Zugabe war keine Zelltoxizität mehr zu beobachten. Die Viabilität der Zellen bei Behandlung mit Trimer-D3-Coumarin **89** zeigte ähnliche Ergebnisse wie bei denen der HeLa Zellen. Im Allgemeinen war festzustellen, dass bei immer geringer werdender Zugabe der Komponenten in DMSO die Zellviabilität verbessert wurde. Daraus konnte geschlossen werden, dass DMSO als Lösungsmittel den größten Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatte. Abb. 127 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MG-63-Zellen nach Behandlung mit Trimer-D3-Dansyl **88**.

Tab. 9: MTT-Test zur Bestimmung der Vitalität von MG-63-Zellen durch die reinen Komponenten 88 und 89.

Menge in DMSO [μL]	Trimer-D3-Dansyl 88, Vitalität	Trimer-D3-Coumarin 89, Vitalität
50	$57 \pm 8\%$	$17 \pm 1\%$
25	$79 \pm 9\%$	$47 \pm 8\%$
10	$106 \pm 9\%$	$82 \pm 4\%$
5	$110 \pm 5\%$	$97 \pm 2\%$

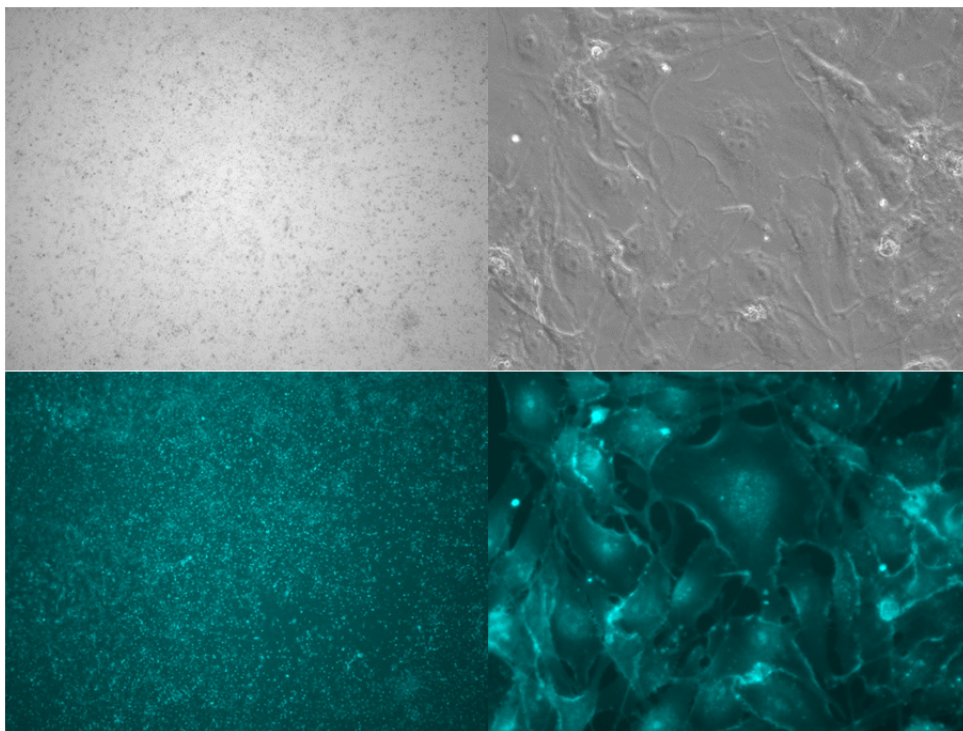


Abb. 127: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der mit 25 μL Trimer-D3-Dansyl 88 in DMSO an MG-63-Zellen.

3.7.4. Zusammenfassung

Für die Funktionalisierung von Calciumphosphatnanopartikeln mit fluoreszenzgelabelten Aminopyrazol-Hybriden konnten zwei Derivate über SPPS und anschließende Kupplung der Trimer-Säure **57** durch manuelle Peptidfestphasensynthese synthetisiert werden. Hierbei wurde mit dem jeweiligen Fluoreszenzlabel am Harz das D3-Peptid **15** an die feste Phase gekuppelt und schließlich mit dem Aminopyrazoltrimer verknüpft. Dabei konnten Trimer-D3-Dansyl **88** und Trimer-D3-Coumarin **89** erhalten werden.

Biophysikalische Untersuchungen ergaben eine sehr gute Inhibierungseffizienz in ThT-Assays. Da Trimer-D3 **43** durch vorherige Arbeiten als potentieller Inhibitor bekannt war, liegt diese Grundstruktur den erhaltenen Ergebnissen zugrunde.

Die erfolgreiche Funktionalisierung der Nanopartikel mit den Chromophoren konnte durch UV/Vis-Quantifizierungen nachgewiesen werden. Die Adsorptionen auf den Nanopartikeln erfolgten in einem Gehaltsbereich zwischen 50 und 100% in Bezug auf die unterschiedlichen Konzentrationen. DLS-, NS- und REM-Messungen zeigten einheitliche Partikeldurchmesser um die 100 nm. MTT-Tests zeigten keine Toxizität gegenüber HeLa-Zellen.

Transportuntersuchungen mit den Trimer-D3-Dansyl-funktionalisierten Nanopartikeln lieferten durch Fluoreszenzmikroskopie keine Aufnahme in die Zellen.

Die Überprüfung der Aufnahme von Trimer-D3-Dansyl **88** ohne Nanopartikel zeigte zwar fluoreszierende Zellen, jedoch wurde vermutet, dass sich die Hybrids substanz nur auf den Zelloberflächen anlagert. Hierbei wurden zum Teil toxische Wirkungen der Substanz in DMSO auf die Zellen ermittelt.

4. Zusammenfassung/Ausblick

Verschiedene Aminopyrazol-Trimer-Derivate wurden bereits in ihrer Aktivität gegen die Aggregation des A β -Peptids untersucht, jedoch wurden die Inhibierungsexperimente oftmals mit einem Überschuss an Ligand durchgeführt. In dieser Arbeit wurde überprüft, ob ebenfalls substöchiometrische Wirkungsweisen vorhanden sind. Hierbei konnten die drei Hybride Trimer-D3 **43**, Trimer-TEG-TEG-D1 **42** und Trimer-Diamin **40** erfolgreich untersucht werden.

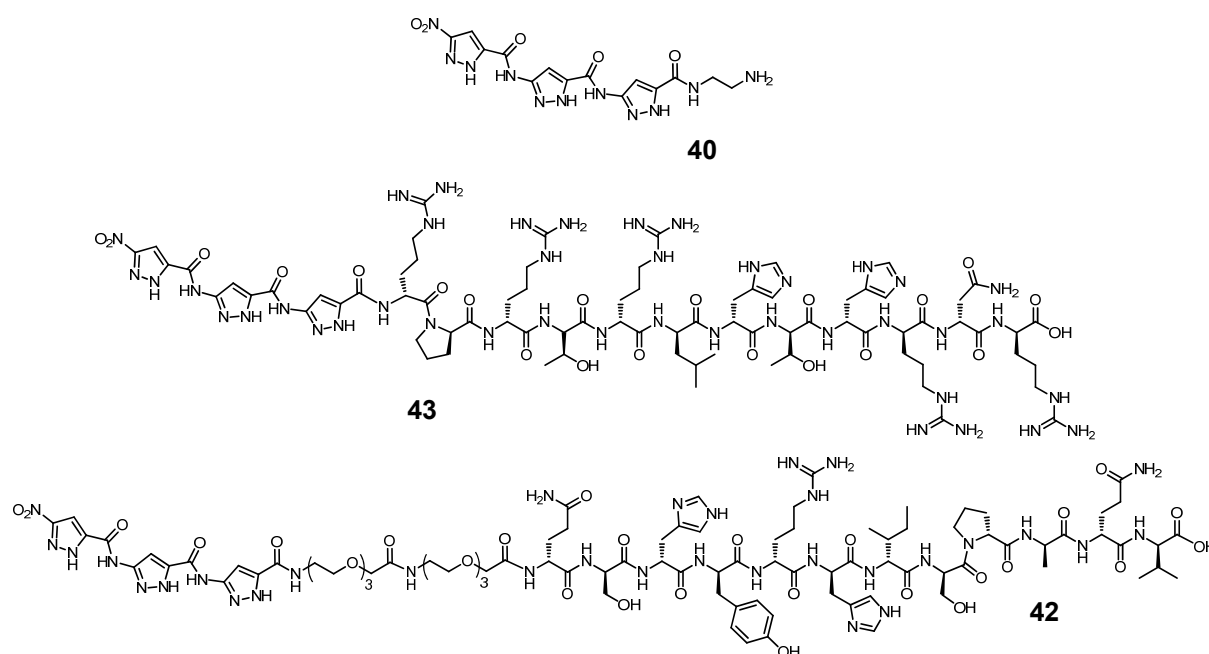


Abb. 128: Strukturen der Verbindungen Trimer-Diamin 40, Trimer-D3 43 und Trimer-TEG-TEG-D1 42.

Dosis-Wirkungsbeziehungen ergaben IC₅₀-Werte von 2.2 μ M für Trimer-D3 **43** und für 6.3 μ M Trimer-TEG-TEG-D1 **42**, welche unterhalb der eingesetzten A β -Konzentration von 10 μ M liegen.

Die Konformationsänderung des A β -Peptids durch Inkubation mit 50mol% an Liganden wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Durch den Einfluss der Liganden zeigte sich im Verlauf der Zeit eine Abschwächung der für das A β -Peptid charakteristischen negativen Bande bei 218 nm und dazu konnte ein positiver Cotton-Effekt zwischen 260 und 320 nm beobachtet werden, was auf eine Wechselwirkung des Liganden mit der KLVFF-Sequenz des A β -Peptids zurückzuführen ist. Mit den beiden

wasserlöslichen Verbindungen Trimer-D3 **43** und Trimer-TEG-TEG-D1 **42** wurden PICUP-Experimente durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Trimer-D3 **43** keine signifikanten Effekte auf die oligomere Größenverteilung zeigte. Ein kleiner Effekt konnte nur in der Bildung von Tetrameren beobachtet werden. Trimer-TEG-TEG-D1 **42** hingegen beeinflusste die Größenverteilung in höherem Maße. Monomere wurden mit dem Liganden bevorzugt stabilisiert, wohingegen höhere Oligomere nicht gebildet wurden. TEM-Experimente gaben Aufschluss über die Morphologieänderung des A β -Peptids durch Einfluss substöchiometrischer Mengen an Ligand. Für A β (1-42) als Referenz konnte ein Fibrillennetzwerk beobachtet werden. Die Inkubation mit den Liganden führte zu kleineren Agglomeraten anderer Morphologie. Ebenfalls zeigten TEM-Aufnahmen der Liganden ohne A β (1-42) morphologisch andere Zusammenschlüsse, welche nicht mit der Referenz und den resultierenden Inhibierungsversuchen der Liganden mit dem A β -Peptid zu vergleichen waren.

Für die nicht kovalente Bindung eines Trimer-Derivates mit einem A β -spezifischen Antikörper konnte in der Arbeit von *März-Berberich* keine ausreichend starke Verknüpfung über Ni²⁺-Ionen erzielt werden, wobei als Grund auf die mono-NTA-Einheit hingewiesen wurde. Basierend darauf war das Ziel in dieser Arbeit die Synthese einer Trimer-Hybrid-Verbindung, welche über eine Tris-NTA-Einheit verfügt und somit die nicht kovalente Bindung zum Antikörper verstärkt. Nach der erfolgreichen Synthese von Trimer-tris(NTA)-Cyclam **62** über 15 Stufen konnte im Arbeitskreis *Korth* via nativer Gelelektrophorese gezeigt werden, dass der Trimer-tris(NTA)cyclam-IC16scFv Komplex eine thermodynamische Stabilität aufweist.

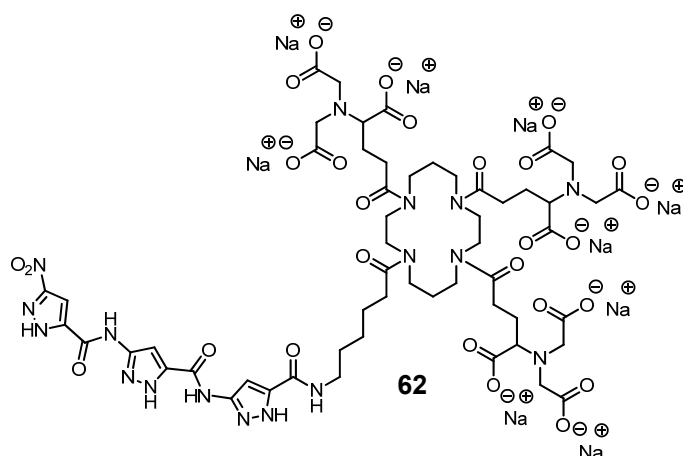


Abb. 129: Strukturformel des multiplen Chelators Trimer-tris(NTA)cyclam **62.**

Des Weiteren konnten über ELISA starke Affinitäten des Hybrid-Komplexes sowohl mit dem IC16-scFv- als auch VHH-E4-Antikörper gegenüber A β festgestellt werden, wobei die einzelnen Substanzen nur schwache bis gar keine Affinitäten zeigten. Da eine Stabilität des Komplexes und eine Affinitätserhöhung mit dem A β -Peptid gezeigt wurden, könnte in zukünftigen Arbeiten überprüft werden, ob dieser Komplex ebenfalls die Aggregation von A β beeinflusst. Die Verwendung von ThT-Assays zur Überprüfung der Fibrillenbildung, CD-Spektroskopie für Konformationsänderungen, TEM-Messungen für die Visualisierung und analytische Ultrazentrifugation zur Bestimmung der Bindungskonstante und Ermittlung der Wechselwirkung mit A β -Oligomeren könnten weiteren Aufschluss über die Effizienz des Hybrid-Komplexes geben.

Die Herstellung künstlicher Proteasen zur Peptidspaltung findet immer mehr Bedeutung im Bereich der pathogenen Proteinaggregation. Eine potentielle wasserlösliche Protease-Einheit ist der Co^{III}-Cyclen-Komplex, welcher in dieser Arbeit mit dem Aminopyrazol-Trimer als Erkennungseinheit für A β funktionalisiert wurde. Es wurden mehrere Synthesestrategien erarbeitet, die ebenfalls die C- und N-terminale Funktionalisierung des Trimers einschloss. Das Aminopyrazoltrimer konnte N-terminal erfolgreich über einen Dodecyl-Spacer mit dem Cyclen verknüpft werden. Jedoch konnten keine Proteolyse-Experimente durchgeführt werden, da die Substanz für die Metallkomplex-Bildung nicht im wässrigen Medium löslich war. Da die Aminopyrazol-Einheit hydrophob und der Co^{III}-Cyclen-Komplex wasserlöslich ist, könnte in zukünftigen Arbeiten der Fokus auf wasserlösliche Spacer gelegt werden, um die Hydrophilie des Trimer-Cyclen-Hybrids zu gewährleisten.

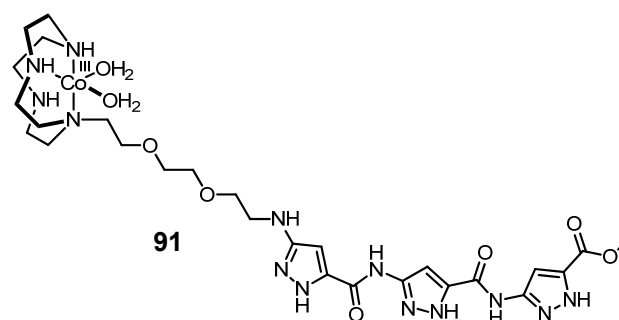


Abb. 130: Vorschlag für eine Zielstruktur des Trimer-Cyclen-Hybrids mit wasserlöslichem Spacer.

Der Einfluss von Trimer-D3 **43** auf die Sekretion des Amyloid Precursor Proteins (APP) wurde in unterschiedlichen biologischen Tests untersucht. In Western Blots konnte nachgewiesen werden, dass Trimer-D3-Lys **45**, welches nach Crosslinking

mit NHS-Sepharose immobilisiert wurde, in der Lage ist APP zu binden. Im Folgenden wurde überprüft, ob sich dadurch die Sekretion von APP verändert.

Die Sekretion von APP lieferte in Anwesenheit von Trimer-D3 **43** überraschend C-terminale APP-Fragmente (APP-CTF), deren Größe sich von der unterscheidet, die durch α -, β - oder γ -Sekretase gebildet wird. Der Einsatz beider Einzelkomponenten (AP + D3) hatte dagegen keinen Einfluss auf die APP-Sekretion.

Im Einzeltest wurde bestätigt, dass Trimer-D3 **43** im Gegensatz zu dem bekannten γ -Sekretase-Inhibitor LY-411575 tatsächlich keinen Einfluss auf die γ -Sekretase ausübt.

Über die Identifizierung der Schnittstelle im APP wurde die mögliche Bildung von θ -CTFs überprüft (Beeinflussung von BACE2). Der CT15-Antikörper, welcher die A β (10-23)-Sequenz erkennt, konnte auch das vom Aminopyrazol-D3-Hybrid induzierte APP-CTF binden; das kleinere Epitop A β (17-24) von 4G8 reichte dazu jedoch nicht aus. Daraus lässt sich schließen, dass in Gegenwart von Trimer-D3 **43** die APP-Prozessierung näher am C-Terminus erfolgt als an der α -Sekretase-Spaltungsstelle. Das würde zu einer BACE2-Spaltung zwischen 19 und 20 gut passen. Endgültige Klarheit sollen hier massenspektrometrische Untersuchungen der gebildeten Fragmente ergeben.

Für die Funktionalisierung von Calciumphosphatnanopartikeln mit fluoreszenzgelabelten Aminopyrazol-Hybriden konnten zwei Derivate über SPPS und anschließende Kupplung der Trimer-Säure **57** durch manuelle Peptidfestphasensynthese synthetisiert werden. Hierbei wurde mit dem jeweiligen Fluoreszenzlabel am Harz das D3-Peptid **15** an die feste Phase gekuppelt und schließlich mit dem Aminopyrazoltrimer verknüpft. Dabei konnten Trimer-D3-Dansyl **88** und Trimer-D3-Coumarin **89** erhalten werden.

Biophysikalische Untersuchungen ergaben eine sehr gute Inhibierungseffizienz in ThT-Assays. Da Trimer-D3 **43** durch vorherige Arbeiten als potentieller Inhibitor bekannt war, liegt diese Grundstruktur den erhaltenen Ergebnissen zugrunde.

Die erfolgreiche Funktionalisierung der Nanopartikel mit den Chromophoren konnte durch UV/Vis-Quantifizierungen nachgewiesen werden. Die Adsorptionen auf den Nanopartikeln erfolgten in einem Gehaltsbereich zwischen 50 und 100% in Bezug auf die unterschiedlichen Konzentrationen. DLS-, NS- und REM-Messungen zeigten

einheitliche Partikeldurchmesser um die 100 nm. MTT-Tests zeigten keine Toxizität gegenüber HeLa-Zellen.

Bei fluoreszenzmikroskopischen Transportuntersuchungen mit den Trimer-D3-Dansyl funktionalisierten Nanopartikeln konnte keine Aufnahme in die Zellen beobachtet werden.

Die Überprüfung der Aufnahme von Trimer-D3-Dansyl **88** ohne Nanopartikel zeigte zwar fluoreszierende Zellen, jedoch wurde vermutet, dass sich die Hybrids substanz nur auf den Zelloberflächen anlagert. Hierbei wurden zum Teil toxische Wirkungen der Substanz auf die Zellen ermittelt. Aufgrund der Hydrophobie der gelabelten Hybridverbindungen lag die Toxizität vermutlich am Lösungsmittel DMSO, womit die Hybride zunächst gelöst werden mussten. Um diese Problematik zu umgehen, könnte in zukünftigen Arbeiten versucht werden ein wasserlösliches Fluorophor mit dem Aminopyrazol-Hybrid zu verknüpfen. Eine Strategie, Fluorescein an ein Harz zu kuppeln, ist bereits in der Literatur beschrieben.^[161] Darauf aufbauend könnte das gelabelte Harz mit dem D3-Peptid **15** automatisiert verknüpft werden, woraufhin das Trimer manuell an das Peptid gekuppelt wird. Hierbei würde ein fluoreszenzgelabeltes Trimer-Hybrid entstehen, welches hydrophilere Eigenschaften besitzt.

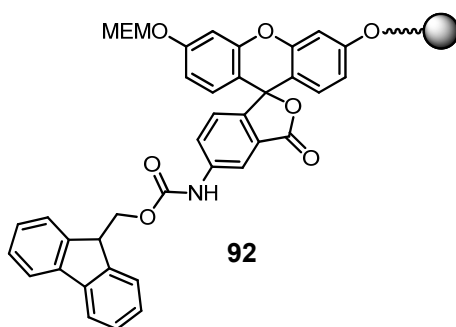


Abb. 131: Vorschlag von Fluorescein 92 an der festen Phase für Peptidsynthese nach Uryga-Polowy et al.^[161]

Aktuell liegt der Fokus auf dem Einsatz von Nanopartikeln, denn diese zeigen immer mehr die Möglichkeit als starke Werkzeuge neue Wege im Bereich der Diagnostik und lokal selektiven Behandlungen zu öffnen, was für den Bereich der Medizin ein großer Vorteil wäre.^[162] Die Funktionalisierung von Nanopartikeln mit einzelnen Bausteinen, zum Beispiel mit dem Aminopyrazoltrimer, als β -Faltblattbrecher, dem Co^{III} -Cyclen-Komplex als künstliche Protease und das D3-Peptid sowie ein $\text{A}\beta$ -spezifischer Antikörper über Ni^{2+} -Ionen an Tris(NTA)-Cyclam koordiniert als Erken-

nungseinheit könnte eine A β -Aggregation selektiv verhindern. Ein weiterer Vorteil wäre, dass die einzelnen Funktionsklassen nicht kovalent miteinander verknüpft werden müssen, was eine einfachere Synthese bedeuten würde. Die Kombination all dieser Klassen kann hierbei durch Funktionalisierung auf dem Nanopartikel erreicht werden.

5. Experimenteller Teil

5.1. Verwendete Chemikalien und Analysemethoden

5.1.1. Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *Acros Organics*, *Bachem*, *Fluka*, *Carbolution Chemicals*, *Riedel de H en* und *Sigma-Aldrich* bezogen und ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Die verwendeten Lösungsmittel wurden kommerziell aus dem Chemikalienlager der Universität Duisburg-Essen bezogen. Zur Durchführung von Dünnschicht- und S ulenchromatographien wurden technisch hergestellte Lösungsmittel destilliert sowie p.a.-Ware verwendet. Absolutierte Lösungsmittel wie Acetonitril, Dichlormethan, Diethylether und *N,N*-Dimethylformamid über Molekularsieb wurden von *Acros Organics* und *Sigma Aldrich* erworben.

5.1.2. Verwendete Puffer

Für die ThT-Experimente wurde der PBS-Puffer verwendet. Dieser besteht aus folgenden Zusammensetzungen: 137 mM NaCl, 2.70 mM KCl, 1.40 mM KH₂PO₄, 4.30 mM Na₂HPO₄. Der pH-Bereich dieses Puffers liegt bei 7.3.

Bei den CD-Messungen wurde ein KaPi-Puffer bestehend aus 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ mit pH 7.0 verwendet.

5.1.3. Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Zur Durchführung der Dünnschichtchromatographie wurden ALUGRAM und POLYGRAM DC-Platten (Kieselgel: SIL G/UV₂₅₄, 0.2 mm) der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Bei einer Wellenlänge von 254 nm erfolgte die Detektion.

Für die Säulenchromatographie wurde „Kieselgel 60“ (40-63  m, 230-400 mesh) von der Firma *Macherey-Nagel* eingesetzt.

5.1.4. Magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die gemessenen ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden unter Verwendung eines *Bruker Advance DMX300* (^1H (300 MHz) und zur genaueren Auswertung mit einem *Bruker Advance DRX500* (^1H (500 MHz), ^{13}C (125.8 MHz)) sowie mit einem *Bruker Advance III HD* (^1H (600 MHz), ^{13}C (150.9 MHz)) erhalten. Die Verschiebungen der Signale der deuterierten Lösungsmittel dienen als Standardverschiebung. Die Einheit der chemischen Verschiebung δ wird in ppm angegeben.

Die folgenden Abkürzungen wurden für die Auswertung der NMR-Spektren verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), quart (Quartett), m (Multiplet), dd (Dublett vom Dublett), bs (breites Signal).

5.1.5. Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit einem *Bruker amaZon SL* Flugzeit-Massenspektrometer mit ESI-Ionenquelle für Niederauflösung aufgenommen. Hochauflösende Massenspektren wurden mit einem *Bruker maXis 4G* erhalten. Hierfür wurden 1.0 bis 5.0 μM Lösungen der Proben in Methanol hergestellt. Für den Massenbereich von 700 bis 15000 Da wurde ein *Bruker autoFlex Speed* MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer verwendet. Die Matrix Lösung war eine gesättigte Lösung von HCCA in Acetonitril/0.1% TFA 1:2 und die Probenlösung war 10 fmol/ μL bis 1 pmol/ μL in 500 μL 0.1% TFA. Von diesen beiden Lösungen wurde ein 1:1-Gemisch hergestellt, wovon 0.5 μL auf die Messplatte aufgetragen wurden. Es wurden immer Vierfachbestimmungen durchgeführt.

5.1.6. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden unter Verwendung einer *384-Well PP Black* Mikrotiterplatte der Firma *NUNC* für die ThT-Messungen und einer *96-Well Assay* Platte der Firma *FALCON* für die Fluoreszenzmessungen mit einem Spektrofluorometer *Tecan InfiniTe 200* durchgeführt.

5.1.7. UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden mit einem *Jasco V-550*-Spektrometer unter Verwendung einer Präzisionsküvette aus Quarzglas der Firma *HELLMA* mit einer Schichtdicke von 10 mm in einem Wellenlängenbereich von 200-500 nm aufgenommen

5.1.8. HPLC-Messungen

Die HPLC-Analytik wurde mit einer Anlage der Firma *Jasco* mit UV/Vis-Detektor und einer Trennsäule der Firma *Macherey-Nagel* (Modell EC 250/4 NUCLEOSIL 100-3 C18) durchgeführt. Der Gradient wurde mit einem Wasser/Acetonitril-Gemisch mit 0.1% TFA gefahren.

5.1.9. Gel-Permeations-Chromatographie-Messungen

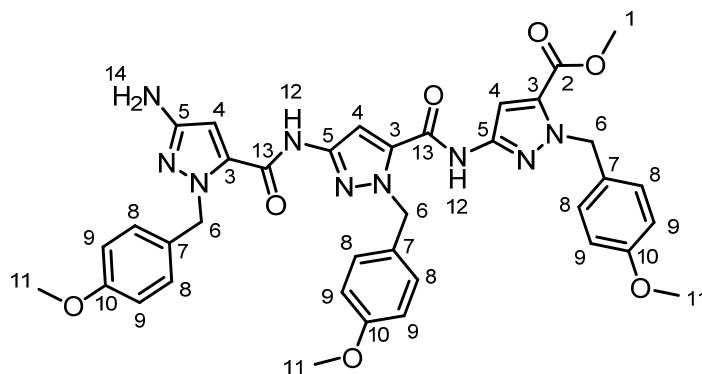
Die GPC-Analytik wurde mit einem Gerät der Firma *Jasco* mit einer PU-980 Pumpe und einem RI-930 Detektor durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde eine 0.01 M NaN_3 -Lösung eingesetzt. Da es sich bei der Messung um ein anionisches Salz handelte, wurden zwei *HEMA-Bio-Linear* 300 x 80 mm Säulen verwendet. Die Flussrate des Eluenten betrug 1.0 mL/min.

5.1.10. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm mit einem *Jasco J-815* CD-Spektrometer in wässrigem Puffer vermessen.

5.2. Funktionalisierung des Aminopyrazoltrimers

5.2.1. Synthese von 3-(3-(3-Amino-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carbox-amido)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester (36)



0.200 g (0.27 mmol, 1.0 eq.) des Trimers **27** wurden in 30 mL Tetrahydrofuran und 10 mL Methanol gelöst. Nach der Zugabe einer katalytischen Menge von Palladium auf Aktivkohle (10 mol%) wurde die Reaktion für 16 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck eingeeengt. Nach weiterer Zugabe von 30 mL Methanol wurde die Reaktionslösung nochmals über Nacht gerührt. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 169.0 mg (0.24 mmol) eines weißen Feststoffes erhalten werden.

Ausbeute: 88%. **R_F:** 0.08 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **3.70-3.72** (3s, 9H, H-11), **3.85** (s, 3H, H-1), **4.83** (s, 2H, H-14), **5.44** (s, 2H, H-6), **5.59** (s, 2H, H-6), **5.63** (s, 2H, H-6), **6.37** (s, 1H, H-4), **6.83-6.90** (m, 6H, H-8, H-9), **7.12-7.20** (m, 7H, H-4, H-8, H-9), **7.65** (s, 1H, H-4), **10.90** (s, 1H, H-12), **11.37** (s, 1H, H-12). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **52.21**, **53.09**, **53.30**, **55.01**, **55.03**, **55.06**, **94.88**, **101.11**, **102.94**, **113.62**, **113.82**, **113.90**, **128.60**, **128.77**, **128.79**, **129.06**, **129.67**, **130.65**, **131.21**, **133.90**, **134.12**, **145.48**, **145.67**, **154.16**, **157.21**, **157.48**, **158.39**, **158.63**, **158.77**, **159.33**. **HRMS** (ESI): für C₃₇H₃₈N₉O₇: berechnet: 720.2889, gefunden: 720.2945, für C₃₇H₃₇N₉O₇Na: berechnet: 742.2708, gefunden: 742.2724.

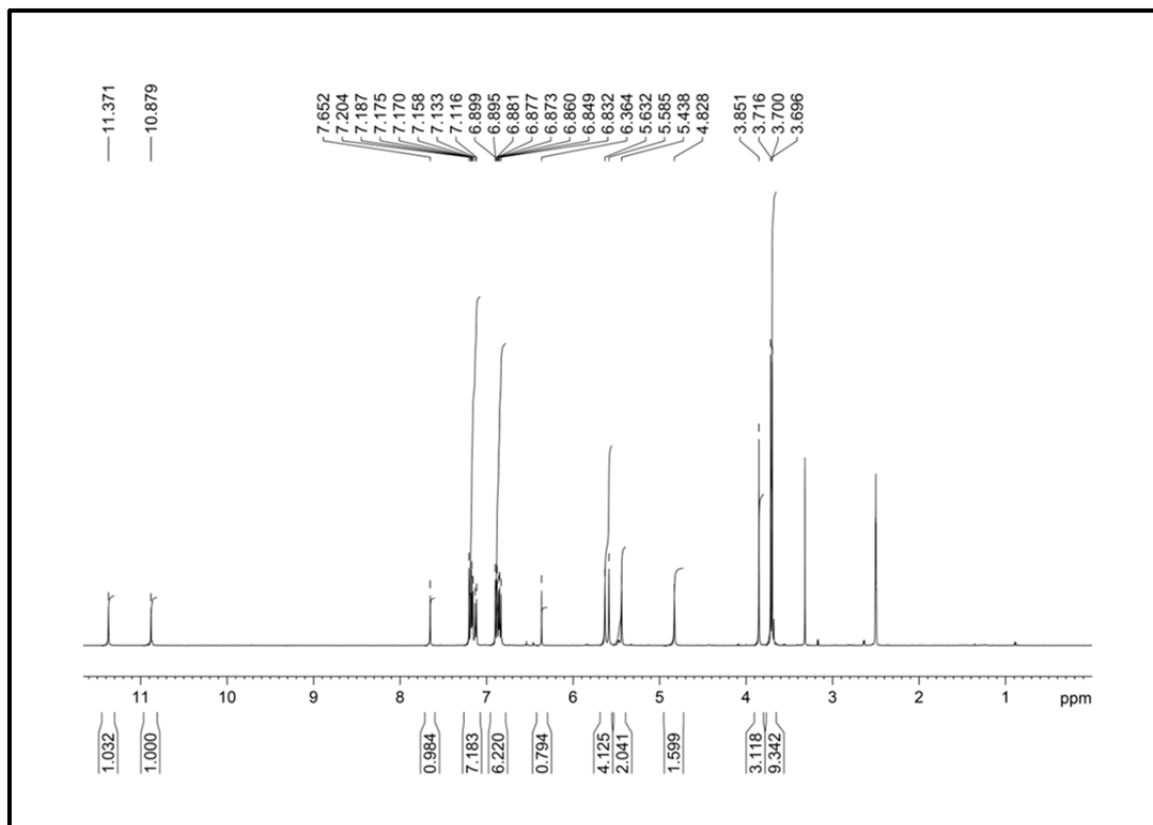


Abb. 132: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 36 (500 MHz, DMSO-d_6).

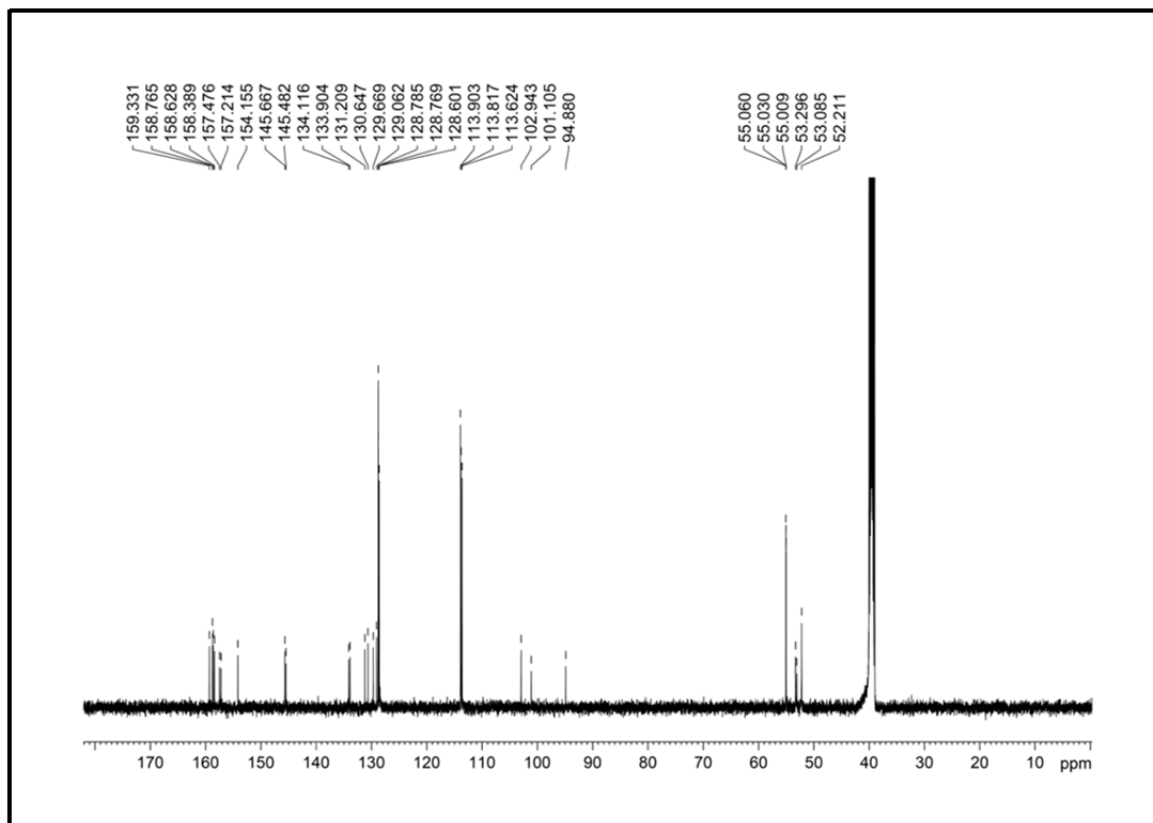
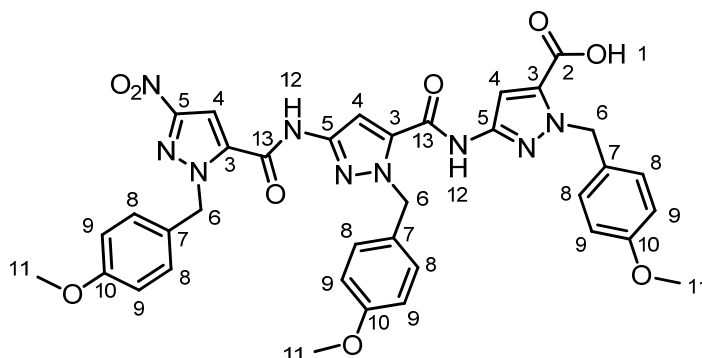


Abb. 133: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung 36 (125.8 MHz, DMSO-d_6).

5.2.2. Synthese von 1-(4-Methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-3-nitro-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1H-pyrazol-5-carbonsäure (57)



0.200 g Trimer **27** (0.27 mmol, 1.0 eq.) wurden in 10 mL THF und 5 mL Methanol gelöst. Anschließend wurden 0.034 g LiOH · H₂O (0.80 mmol, 3.0 eq.) und 1 mL bidest. Wasser hinzugegeben und die Reaktionslösung 18 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittelgemisch unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand mit bidest. Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde mit 1 M HCl auf pH 1 angesäuert und der ausfallende Feststoff abfiltriert und mit 1 M HCl gewaschen. Letztlich wurde der Feststoff in bidest. Wasser suspendiert und gefriergetrocknet. Es wurden 0.172 mg (0.23 mmol) eines gelben Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 85%. ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **3.70-3.72** (3s, 9H, H-11), **5.60** (s, 2H, H-6), **5.66** (s, 2H, H-6), **5.81** (s, 2H, H-6), **6.87-6.91** (m, 6H, H-8, H-9), **7.15-7.19** (m, 5H, H-4, H-8, H-9), **7.27-7.28** (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 2H, H-8/ H-9), **7.71** (s, 1H, H-4), **7.98** (s, 1H, H-4), **11.37** (s, 1H, H-12), **11.51** (s, 1H, H-12), **13.57** (bs, 1H, H-1). ¹³C-NMR (150.9 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **53.04, 53.19, 54.99, 55.04, 55.06, 55.08, 100.93, 102.97, 105.06, 113.84, 113.87, 114.02, 127.94, 128.73, 128.88, 129.34, 129.39, 129.53, 132.66, 134.21, 136.75, 144.87, 145.42, 153.55, 155.44, 157.03, 158.68, 158.70, 159.05, 160.40**. HRMS (ESI): für C₃₆H₃₂N₉O₉Na₂: berechnet: 780.2113, gefunden: 780.2089, für C₇₂H₆₄N₁₈O₁₈Na₃: berechnet: 1537.4334, gefunden: 1537.4305, für C₃₆H₃₂N₉O₉: berechnet: 734.2328, gefunden: 734.2171, für C₃₆H₃₁N₉O₉Na: berechnet: 756.2148, gefunden: 756.1980.

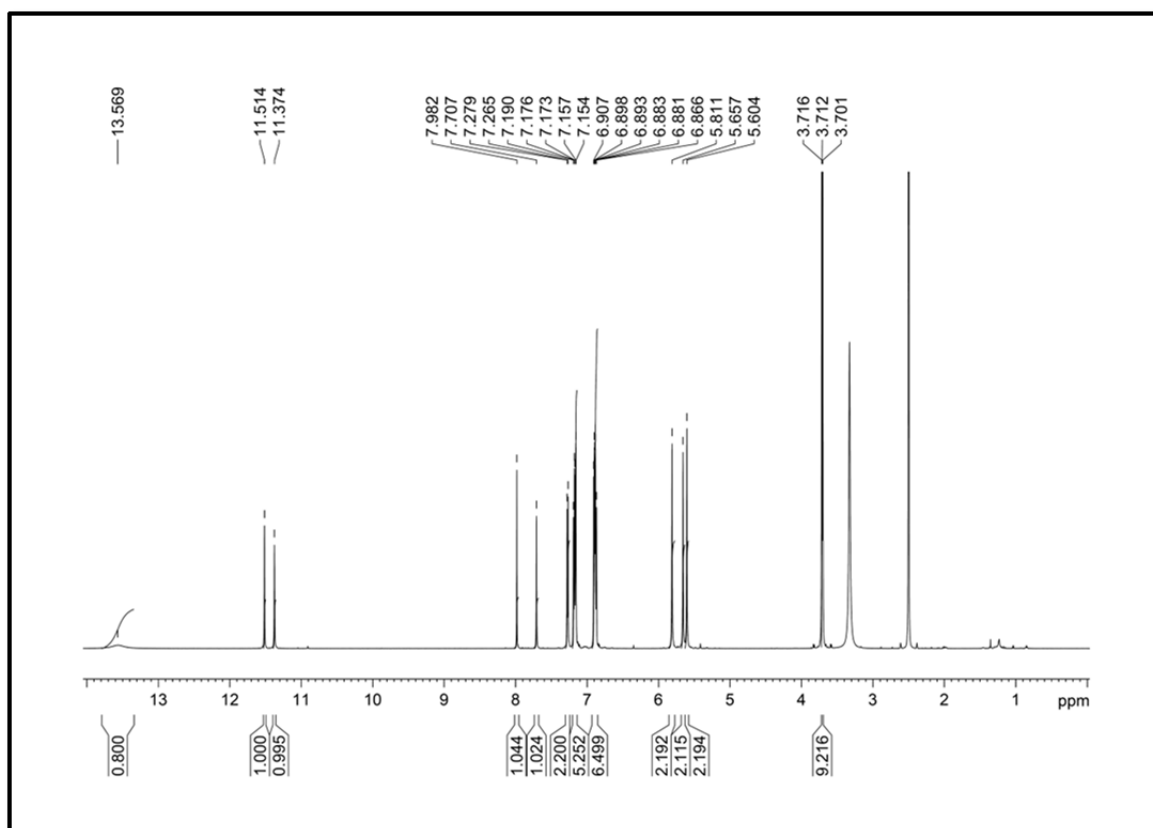


Abb. 134: ^1H -NMR-Spektrum der Trimer-Säure 57 (600 MHz, DMSO-d_6).

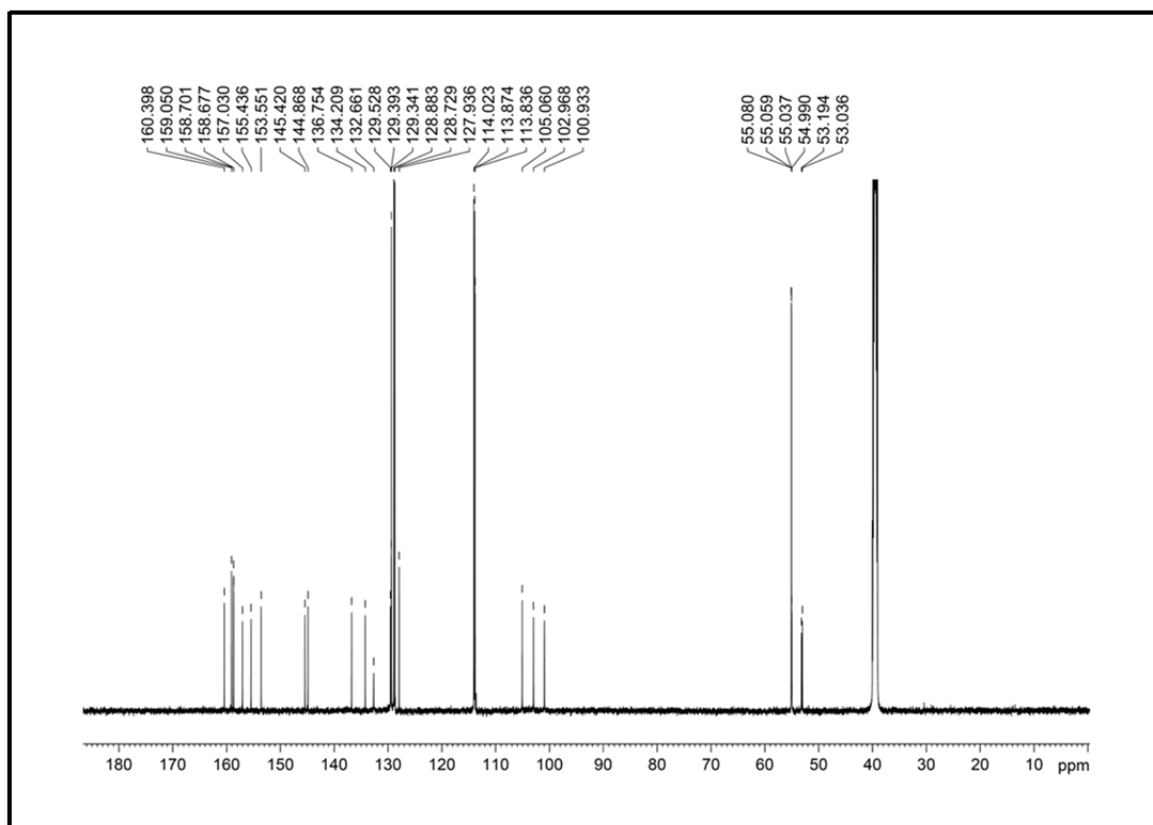
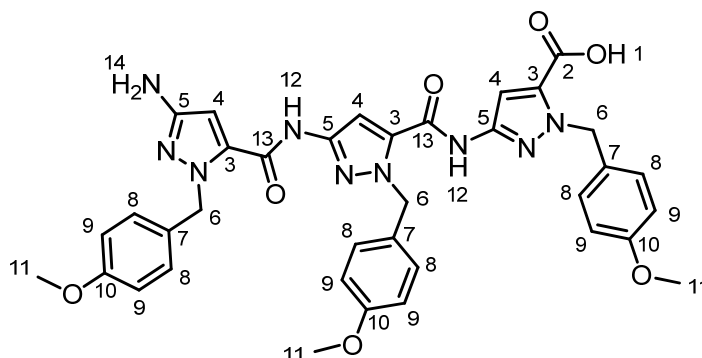


Abb. 135: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung 57 (150.9 MHz, DMSO-d_6).

5.2.3. Synthese von 3-(3-(3-amino-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carbonsäure (37)



0.100 g Aminotrimer **36** (0.14 mmol, 1.0 eq.) wurden in 5 mL THF und 5 mL Methanol gelöst. Anschließend wurden 0.047 g LiOH · H₂O (1.11 mmol, 8.0 eq.) und 3 mL bidest. Wasser hinzugegeben und die Reaktionslösung 18 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittelgemisch unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand mit bidest. Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde mit 1 M HCl auf pH 1 angesäuert und der ausfallende Feststoff abfiltriert, mit 1 M HCl gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 0.093 g (0.13 mmol) eines gelben Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 93%. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **3.70-3.71** (3s, 9H, H-11), **5.60** (s, 2H, H-6), **5.65-5.67** (2s, 4H, H-6), **6.86-6.90** (m, 6H, H-8, H-9), **7.15-7.22** (m, 8H, H-4, H-8, H-9), **7.69** (s, 1H, H-4), **11.34** (s, 1H, H-12), **11.35** (s, 1H, H-12). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **53.06, 53.16, 53.54, 54.93, 55.05, 55.07, 55.08, 101.07, 101.50, 103.01, 113.46, 113.75, 113.85, 113.89, 128.11, 128.73, 128.84, 128.91, 128.96, 129.06, 129.11, 129.28, 129.39, 129.60, 132.56, 134.14, 135.76, 145.12, 145.45, 156.32, 157.10, 158.67, 158.72, 158.82, 160.37**. HRMS (ESI): für C₃₆H₃₆N₉O₇: berechnet: 706.2732, gefunden: 706.2705, für C₃₆H₃₅N₉O₇Na: berechnet: 728.2552, gefunden: 728.2583, für C₃₆H₃₄N₉O₇: berechnet: 704.2587, gefunden: 704.2668.

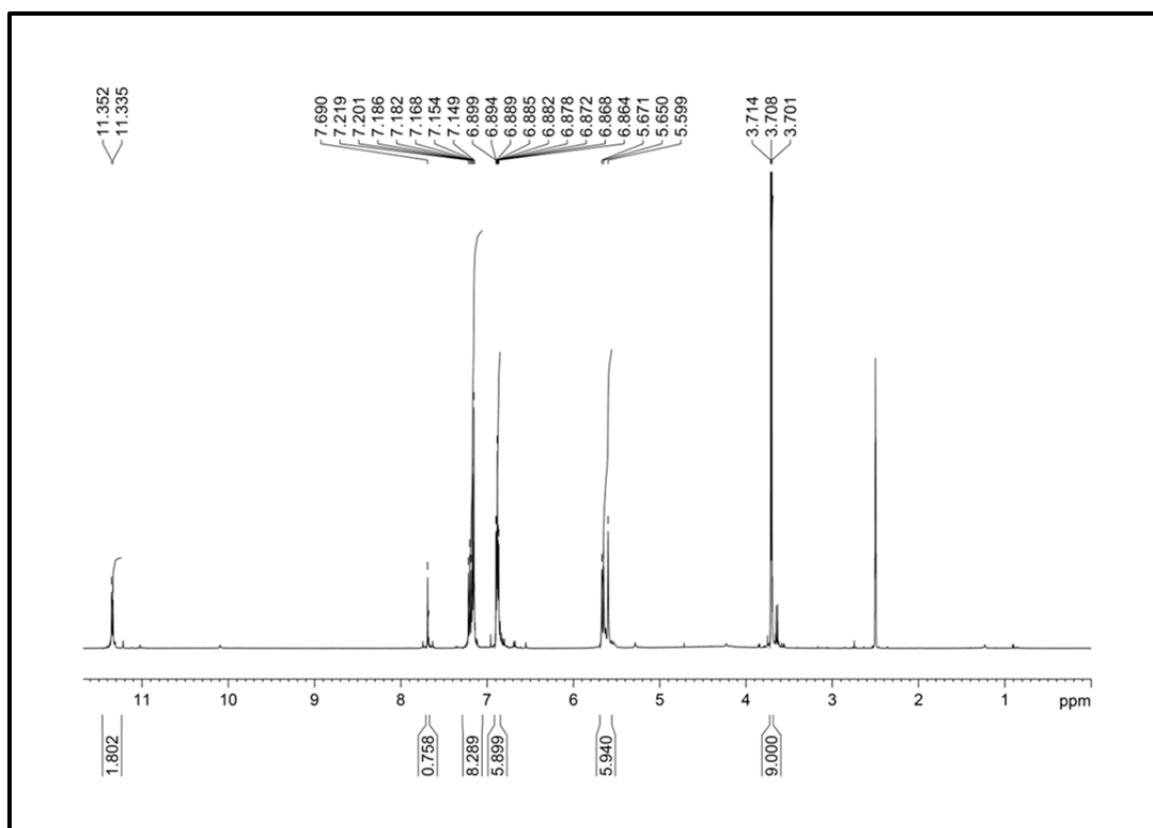


Abb. 136: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 37 (500 MHz, DMSO-d_6).

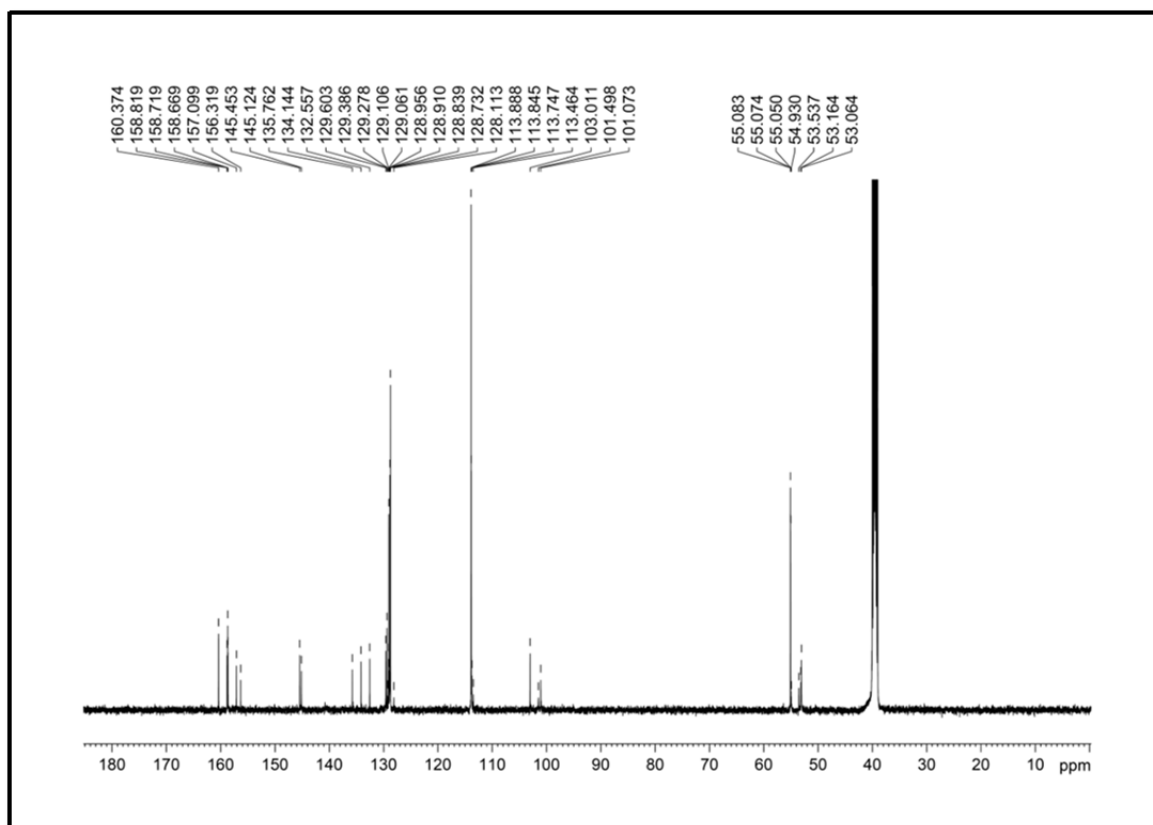
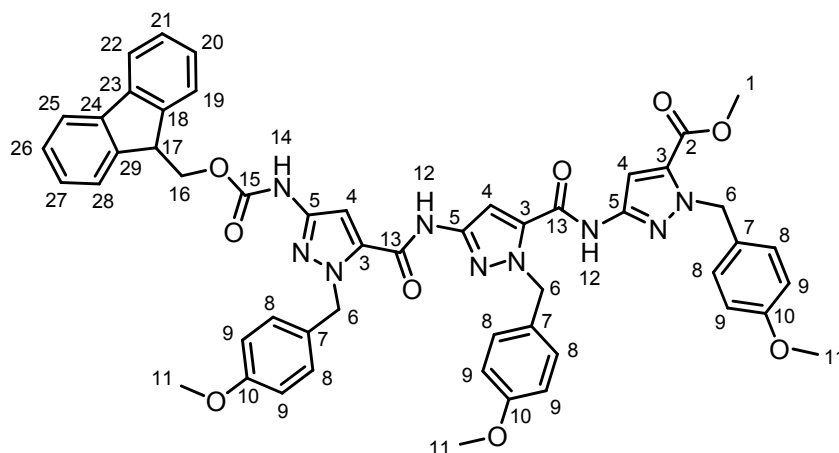


Abb. 137: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung 37 (125.8 MHz, DMSO-d_6).

5.2.4. Synthese von 3-(3-(3-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carboxamido)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-5-carbonsäuremethylester (35)



Unter Argonatmosphäre wurden 0.102 g Aminotrimer **36** (0.14 mmol, 1.0 eq.) und 0.055 g Fmoc-Chlorid (0.21 mmol, 1.5 eq.) in absolutem THF gelöst. Dann wurde die Reaktionslösung 16 h bei 70 °C gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1) gereinigt. Es wurden 0.079 g (0.08 mmol) eines gelbbraunen Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 59%. **R_F:** 0.25 (Cyclohexan/Ethylacetat = 2:1). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **3.69-3.72** (3s, 9H, H-11), **3.85** (s, 3H, H-1), **4.27-4.30** (t, ³J_{HH} = 6.9 Hz, 1H, H-17), **4.35-4.36** (d, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 2H, H-16), **5.59-5.63** (3s, 6H, H-6), **6.84-6.90** (m, 6H, H-8, H-9), **7.16-7.21** (m, 7H, H-4, H-8, H-9), **7.32-7.35** (t, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2H, H-20, H-21. H-26, H-27), **7.41-7.44** (t, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2H, H-20, H-21. H-26, H-27), **7.66** (s, 1H, H-4), **7.77-7.78** (d, ³J_{HH} = 6.9 Hz, 2H, H-19, H-22, H-25, H-28), **7.89-7.91** (d, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, H-19, H-22, H-25, H-28), **10.38/11.20/11.38** (s, 3H, H-12, H-14). **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **46.42, 52.21, 52.90, 53.12, 53.30, 55.02, 55.04, 55.06, 66.14, 101.18, 102.95, 113.79, 113.81, 113.90, 120.12, 125.40, 127.09, 127.69, 128.73, 128.78, 128.83, 129.06, 129.64, 129.84, 131.22, 133.91, 134.26, 140.70, 143.69, 145.29, 145.67, 153.35, 157.08, 157.19, 158.60, 158.64, 158.77, 159.33**. **HRMS** (ESI): für C₅₂H₄₈N₉O₉: berechnet: 942.3570, gefunden: 942.3505, für C₅₂H₄₇N₉O₉Na: berechnet: 964.3389, gefunden: 964.3390.

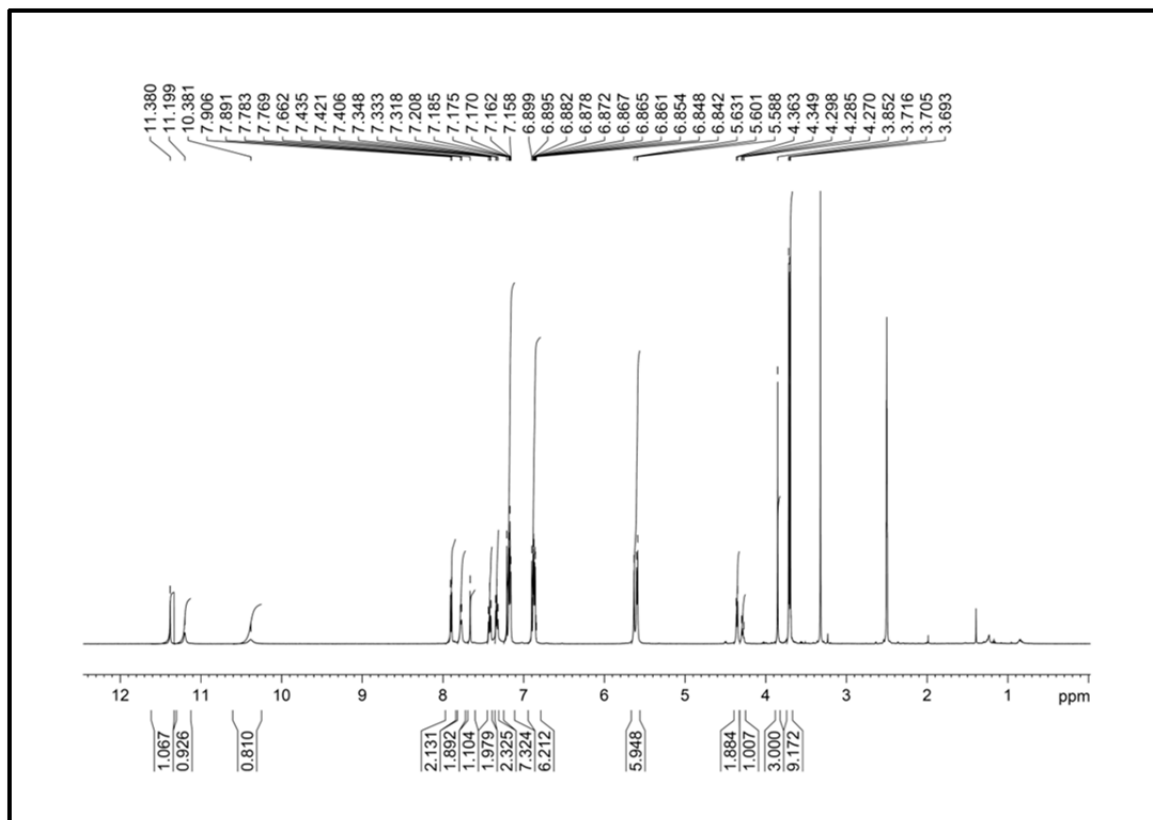


Abb. 138: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 35 (500 MHz, DMSO-d_6).

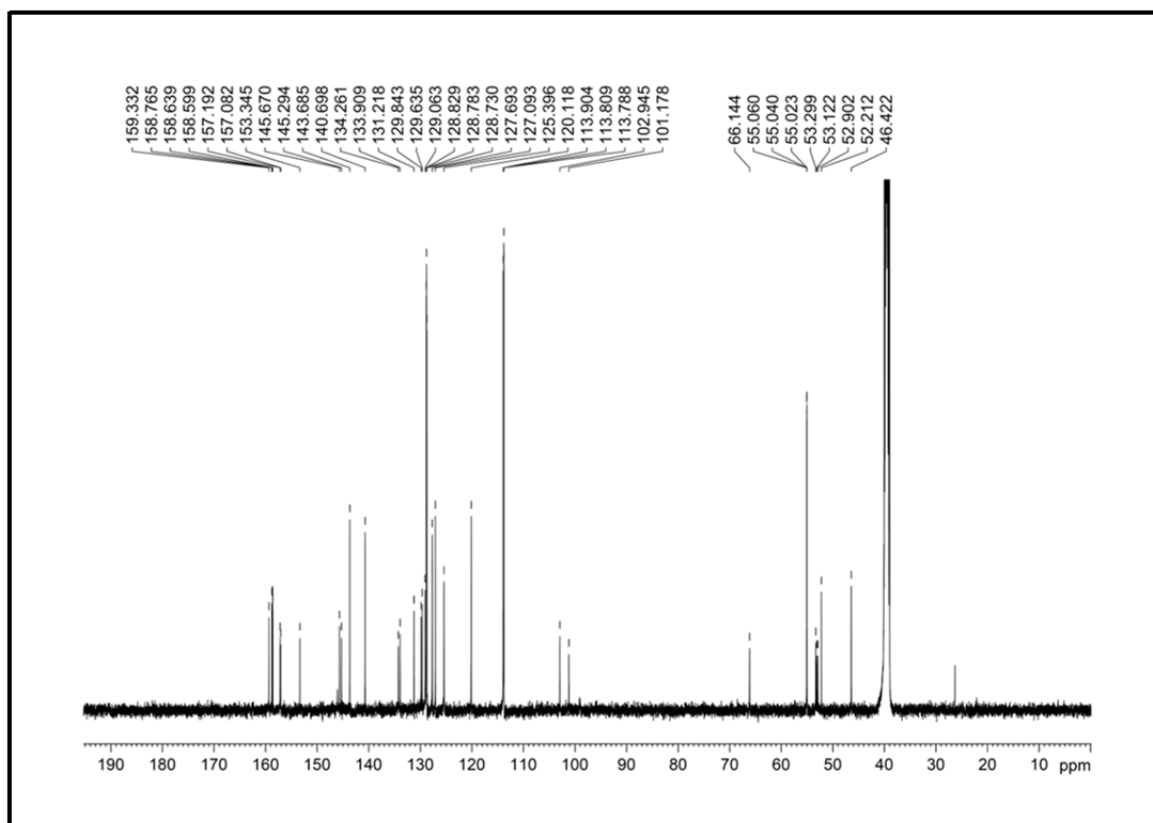
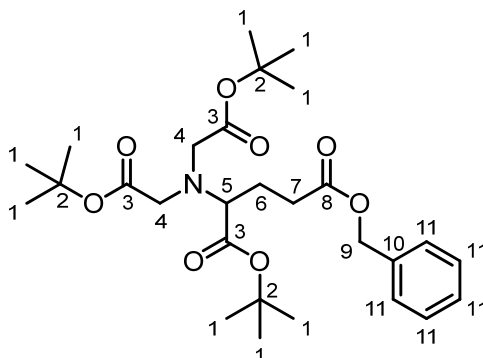


Abb. 139: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung 35 (125.8 MHz, DMSO-d_6).

5.3. Tris(NTA)-Cyclam Funktionalisierung des Aminopyrazoltrimers

5.3.1. Synthese von 5-Benzyl-1-*tert*-butyl-2-(bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-pentandioat (**50**)



Unter Argonatmosphäre wurden 3.30 g H-Glu-*Of*Bu · HCl (**48**) (10.01 mmol, 1.0 eq.) in 75 mL absolutem DMF gelöst. Anschließend wurden 5.87 mL *tert*-Butylbromacetat (**49**) (40.02 mmol, 4.0 eq.) und 13.95 mL DIEA (80.04 mmol, 8.0 eq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung 16 h bei 55 °C gerührt. Darauffolgend wurden das Lösungsmittel sowie flüchtige Bestandteile bei 60 °C abkondensiert. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat aufgenommen und der entstandene Feststoff abfiltriert, sowie noch dreimal mit einem Gemisch aus Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 gewaschen. Letztlich wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1) gereinigt. Es wurden 4.45 g (8.53 mmol) eines gelben Öls erhalten.

Ausbeute: 85%. **R_F:** 0.61 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.42-1.45** (2s, 27H, H-1), **1.87-2.04** (m, 2H, H-6), **2.56-2.72** (m, 2H, H-7), **3.36-3.39** (dd, ³J_{HH} = 10.1 Hz, ⁴J_{HH} = 5.5 Hz, 1H, H-5), **3.43** (s, 4H, H-4), **5.10** (s, 2H, H-9), **7.26-7.35** (m, 5H, H-11). **¹³C-NMR** (125.8 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **25.46** (C-6), **28.20/28.31** (C-1), **30.62** (C-7), **53.93** (C-4), **64.42** (C-9), **66.19** (C-5), **80.78/81.40** (C-2), **128.15/128.26/128.57** (C-11), **136.30** (C-10), **170.55/171.86** (C-3), **173.56** (C-8). **HRMS** (ESI): für C₂₈H₄₄NO₈: berechnet: 522.3061, gefunden: 522.3131, für C₂₈H₄₃NO₈Na: berechnet: 544.2881, gefunden: 544.2946.

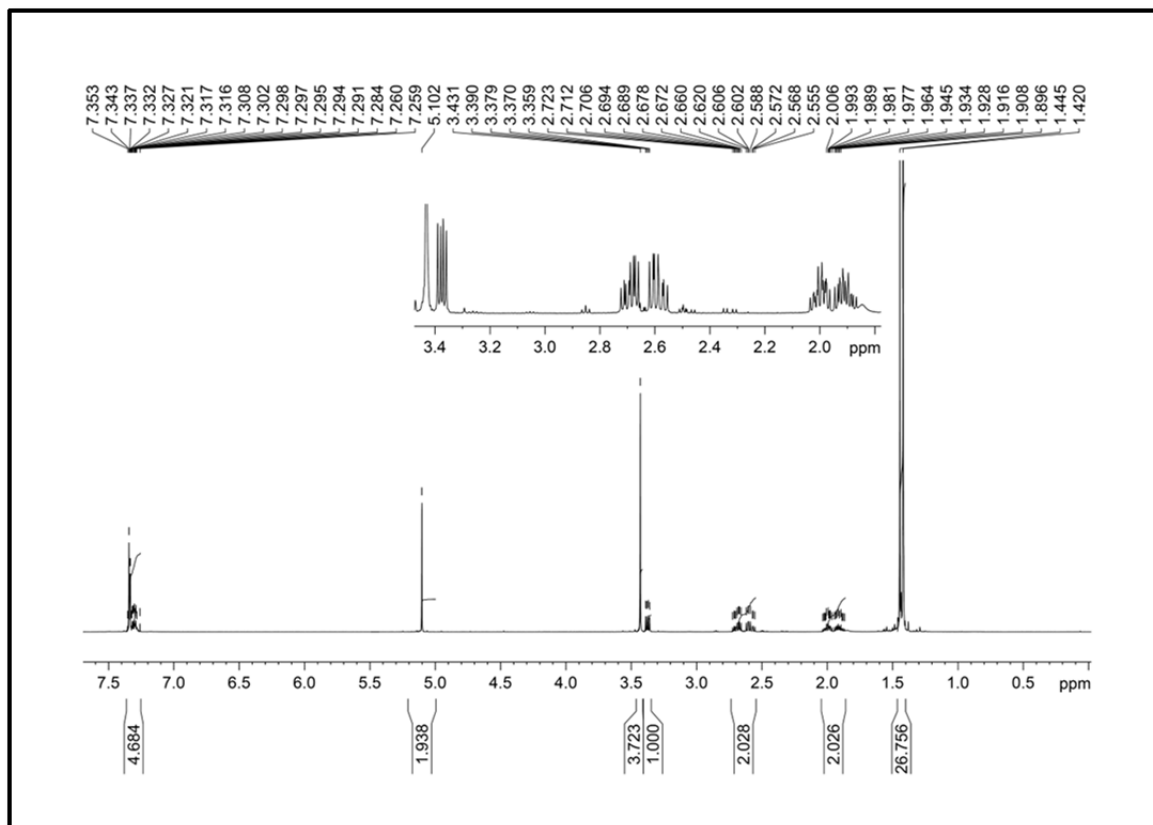


Abb. 140: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 50 (500 MHz, CDCl_3).

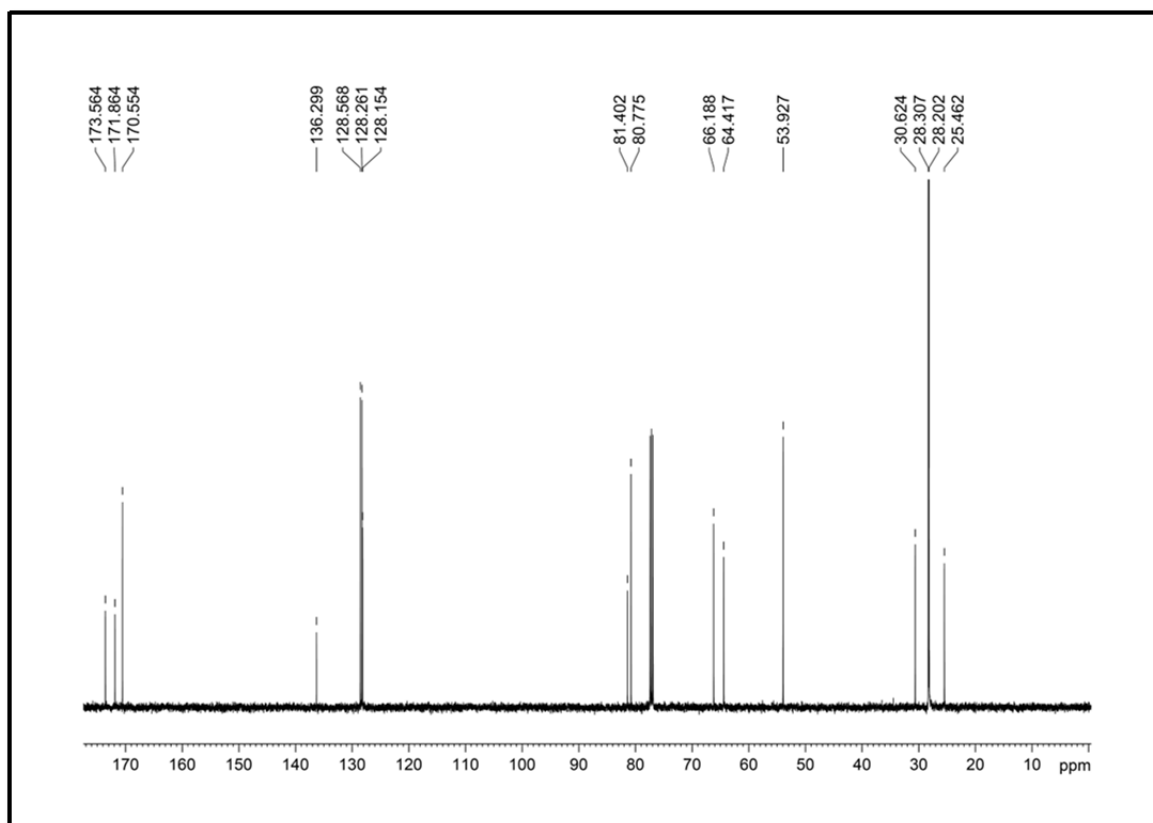
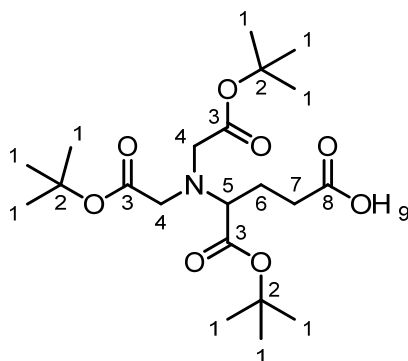


Abb. 141: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 50 (125.8 MHz, CDCl_3).

5.3.2. Synthese von 4-(Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxo-pentansäure (51)



0.700 g 5-Benzyl-1-*tert*-butyl-2-(bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-pentandioat (**50**) (1.34 mmol, 1.0 eq.) wurden in 20 mL Methanol gelöst und schließlich 30 mg Pd/C (10 mol%) hinzugegeben. Darauf folgend wurde die Reaktionslösung unter Wasserstoffatmosphäre 24 h bei RT gerührt. Dann wurde der Katalysator über Kieselgur abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Es wurden 0.426 g (0.99 mmol) eines blassgelben Öls erhalten.

Ausbeute: 74%. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.44-1.46** (2s, 27H, H-1), **1.87-2.03** (m, 2H, H-6), **2.56-2.71** (m, 2H, H-7), **3.35-3.38** (dd, ³J_{HH} = 10.3 Hz, ⁴J_{HH} = 5.2 Hz, 1H, H-5), **3.45** (s, 4H, H-4). **¹³C-NMR** (125.8 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **25.51** (C-6), **28.22/28.33** (C-1), **31.14** (C-7), **54.16** (C-4), **66.19** (C-5), **81.29/81.71** (C-2), **170.78/171.64** (C-3), **177.74** (C-8). **HRMS** (ESI): für C₂₁H₃₈NO₈: berechnet: 432.2592, gefunden: 432.2659, für C₂₁H₃₇NO₈Na: berechnet: 454.2411, gefunden: 454.2474.

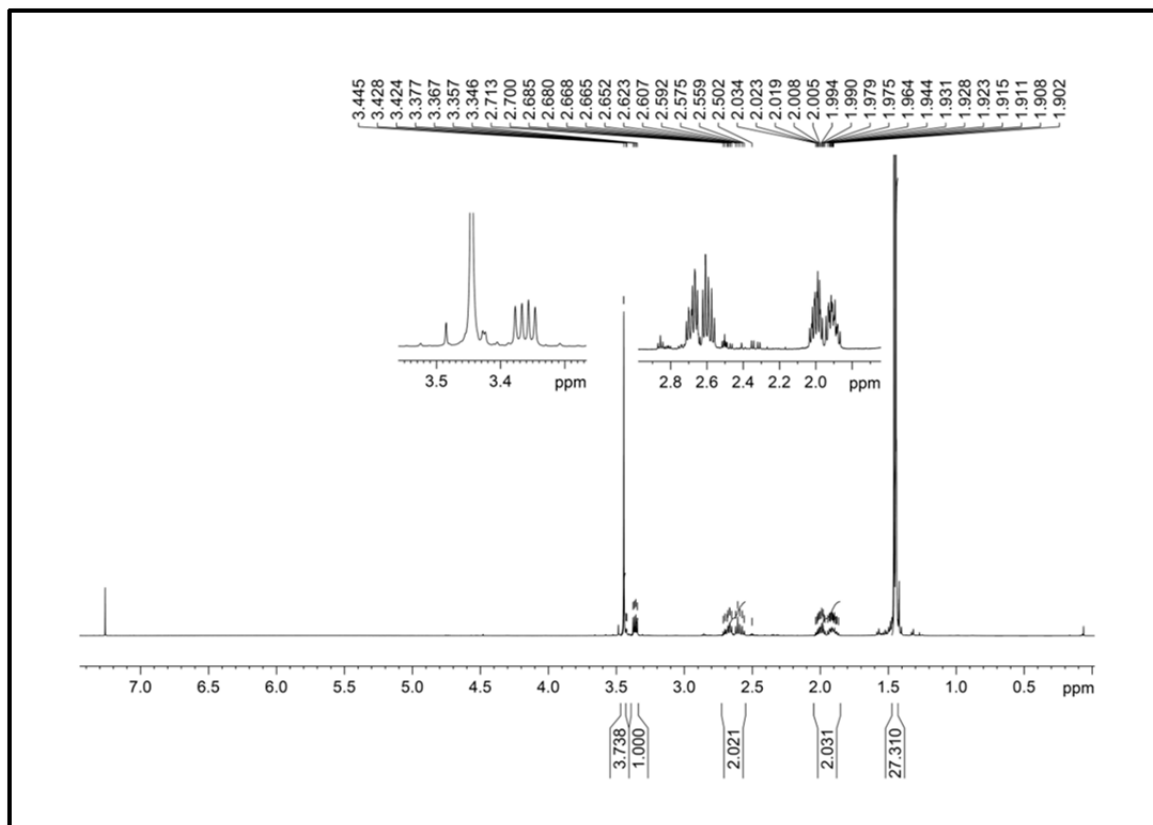


Abb. 142: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 51 (500 MHz, CDCl_3).

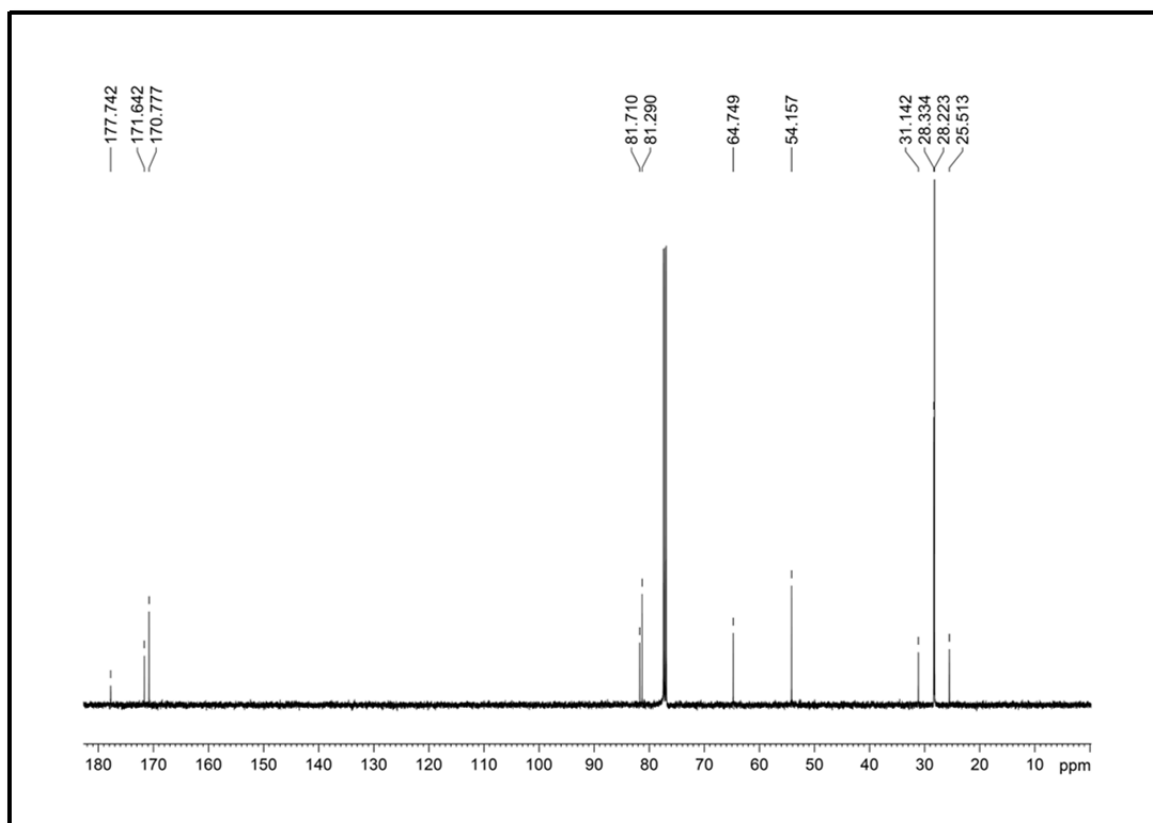
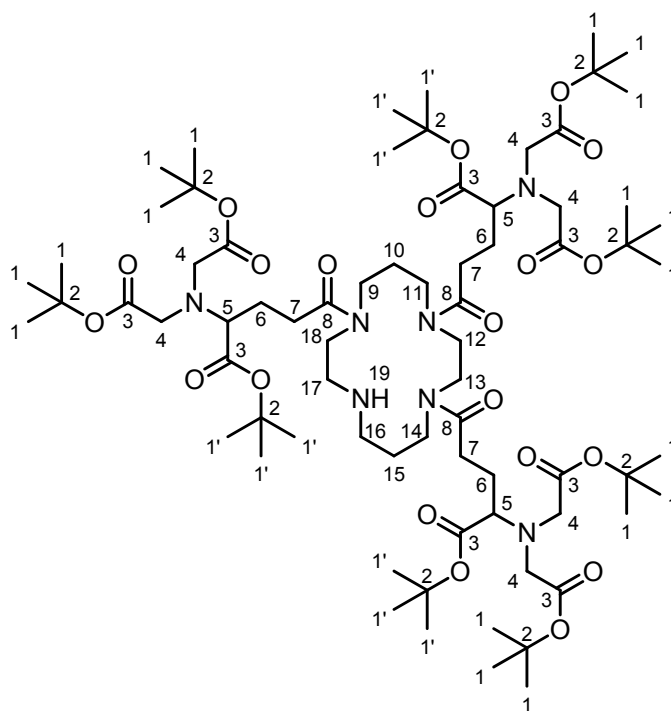


Abb. 143: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung 51 (125.8 MHz, CDCl_3).

5.3.3. Synthese von Hexa-*tert*-butyl-2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((1,4,8,11-tetraaza-cyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-(*tert*-butoxy)-1,5-dioxopentan-5,2-di-yl))tris(azantriyl))hexaacetat (**53**)



Unter Argonatmosphäre wurden 1.906 g 4-(Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxo-pentansäure (**51**) (4.43 mmol, 1.0 eq.) in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst, woraufhin 0.292 g Cyclam **52** (1.48 mmol, 0.3 eq.), 1.844 g TBTU (5.77 mmol, 1.3 eq.) und 2.310 mL DIEA (13.37 mmol, 3.0 eq.) hinzugegeben wurden. Schließlich wurde die Reaktionslösung 24 h bei RT gerührt. Darauffolgend wurde das Lösungsmittel sowie flüchtige Bestandteile unter vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand wieder mit 50 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit jeweils 50 mL bidest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Ethylacetat) aufgereinigt. Es wurden 0.979 g (0.68 mmol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 46%. **R_F:** 0.13 (Ethylacetat). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **1.38** (s, 54H, H-1), **1.41** (s, 27H, H-1'), **1.64-1.78** (m, 11H), **2.44-2.47** (m, 8H), **2.64-2.71** (m, 2H), **3.28-3.40** (m, 27 H). **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **28.20**,

28.27, 35.40, 38.72, 53.76, 53.90, 55.81, 61.32, 64.50, 73.46, 80.40, 80.41, 80.90, 170.44, 170.47, 170.85. HRMS (ESI): für $C_{73}H_{130}N_7O_{21}$: berechnet: 1440.9314, gefunden: 1440.9397, für $C_{73}H_{129}N_7O_{21}Na$: berechnet: 1462.9134, gefunden: 1462.9216.

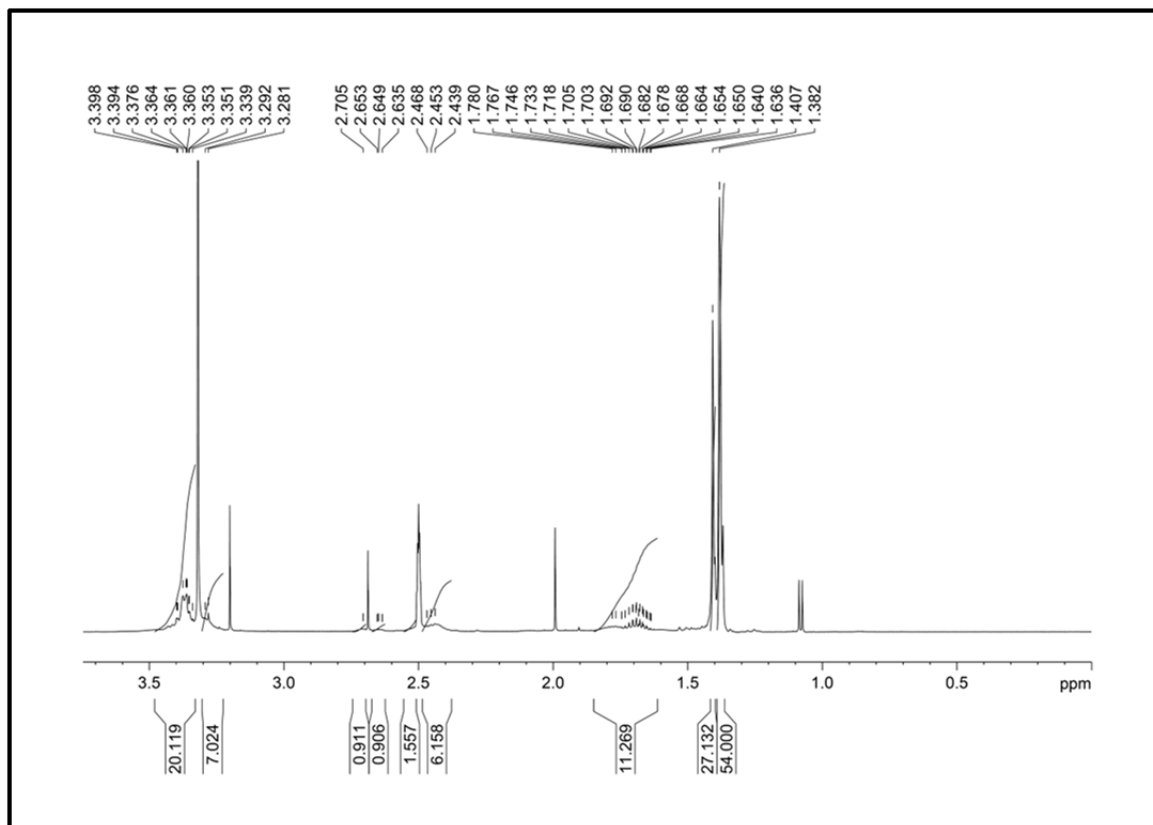


Abb. 144: ^1H -NMR-Spektrum Tris(NTA)cyclam 53 (500 MHz, DMSO-d_6).

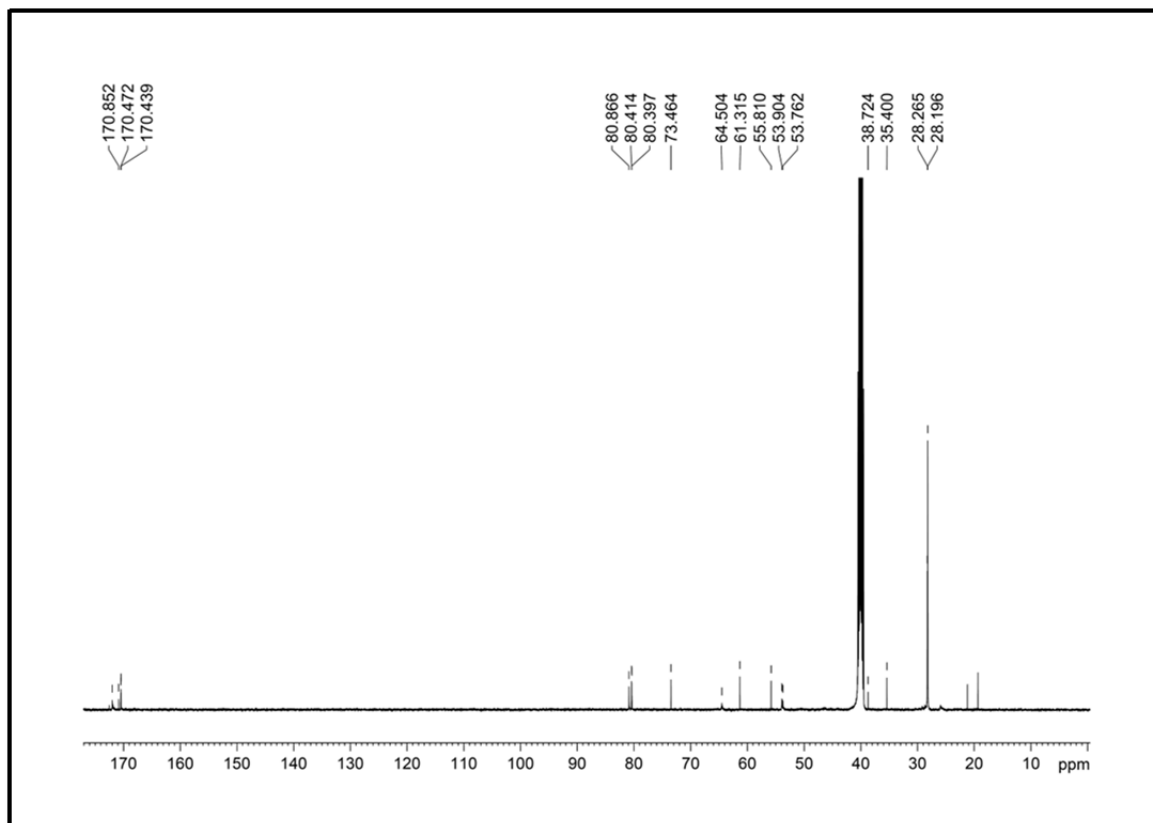
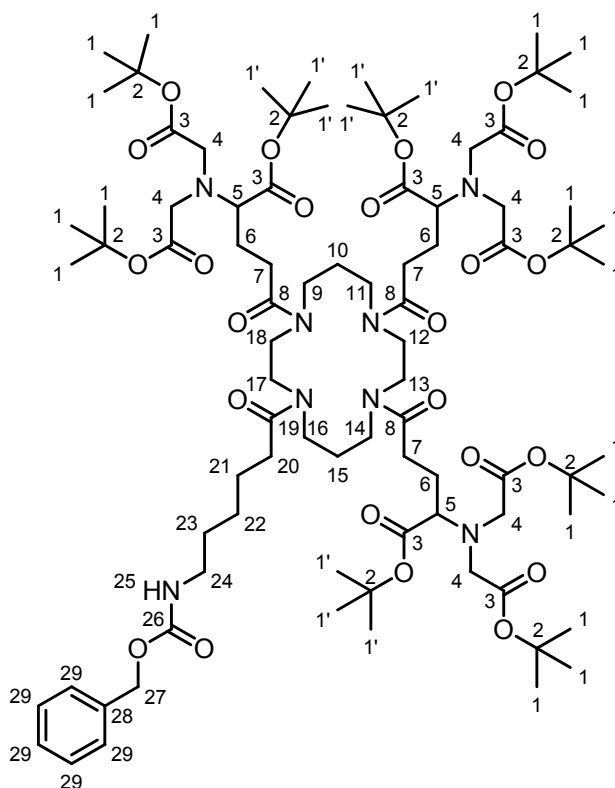


Abb. 145: ^{13}C -NMR-Spektrum Tris(NTA)cyclam 53 (125.8 MHz, DMSO-d_6).

5.3.4. Synthese von Hexa-*tert*-butyl-2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((11-(6-(((benzyl-oxy)carbonyl)amino)hexanoyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-(*tert*-butoxy)-1,5-dioxopentan-5,2-diyl)tris(azantriyl))hexaacetat (59)

Unter Argonatmosphäre wurden 0.190 g Tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam **53** (0.13 mmol, 1.0 eq.) in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst, woraufhin 0.035 g *Z*-Aminohexansäure (0.13 mmol, 1.0 eq.), 0.059 g TBTU (0.19 mmol, 1.4 eq.) und 0.040 mL DIEA (0.25 mmol, 1.9 eq.) hinzugegeben wurden. Schließlich wurde die Reaktionslösung 24 h bei RT gerührt. Darauffolgend wurde das Lösungsmittel sowie flüchtige Bestandteile unter vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand wieder mit 50 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit jeweils 50 mL bidest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Gradient Ethylacetat bis Ethylacetat/Methanol 9:1 über 5 Säulenvolumina) aufgereinigt. Es wurden 0.183 g (0.11 mmol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 85%. **R_F:** 0.21 (Ethylacetat). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.42** (s, 54H, H-1), **1.45** (s, 27H, H-1'), **1.61-1.63** (m, 2H), **1.93** (m, 11H), **2.22-2.59** (m, 18H), **3.41-3.47** (m, 27H), **5.08** (s, 2H, H-27), **7.34-7.36** (m, 5H, H-29). **HRMS** (ESI): für C₈₇H₁₄₇N₈O₂₄: berechnet: 1688.0523, gefunden: 1689.0567, für C₈₇H₁₄₆N₈O₂₄Na: berechnet: 1710.0342, gefunden: 1710.0370.

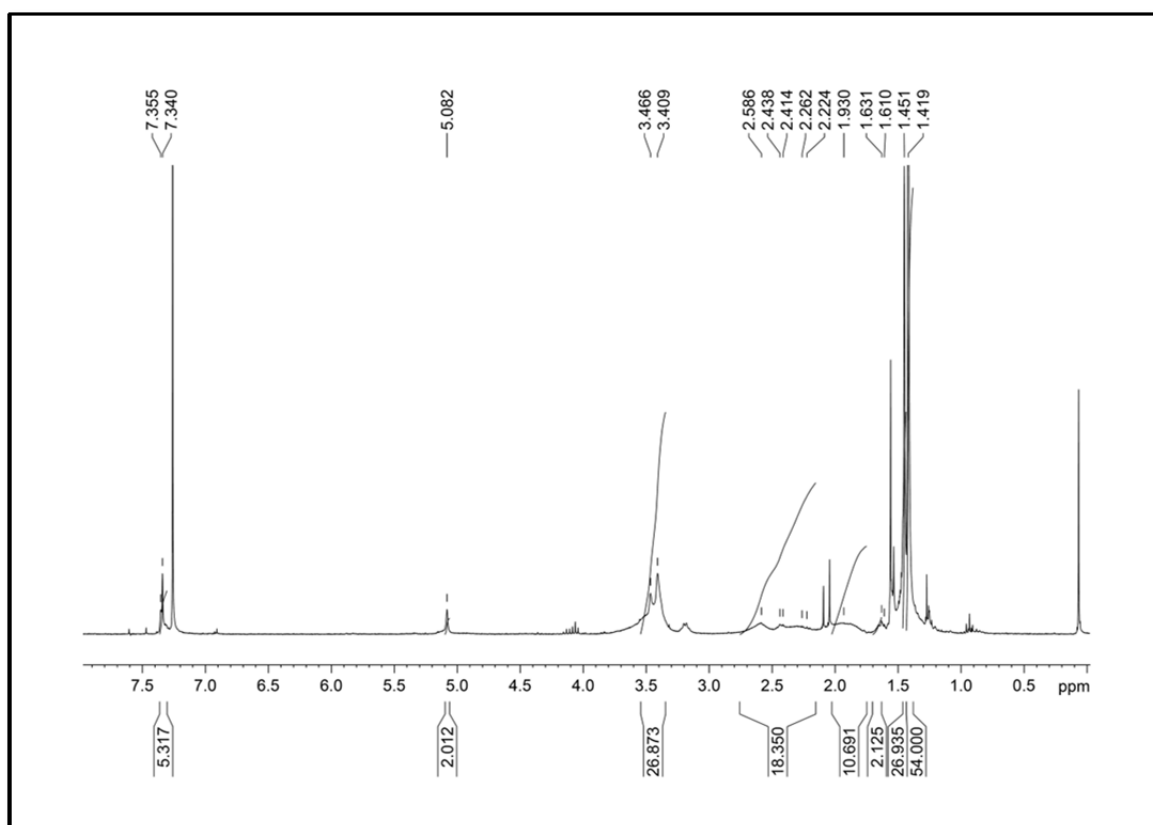
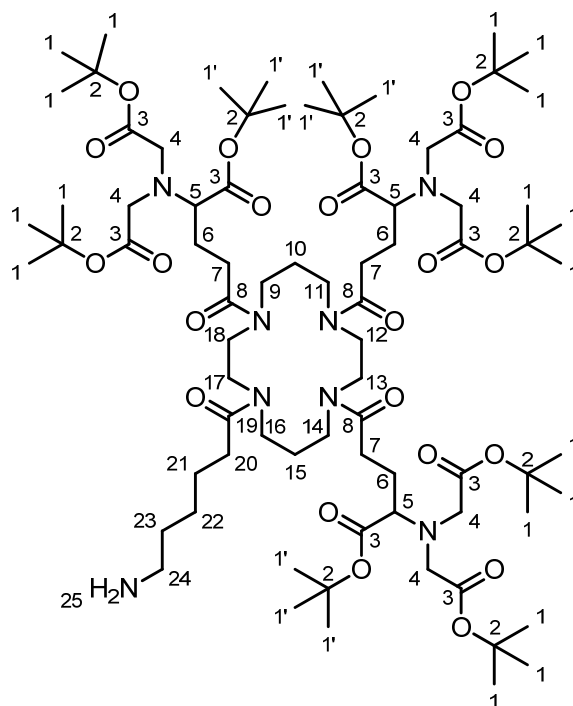


Abb. 146: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 59 (500 MHz, CDCl₃).

5.3.5. Synthese von Hexa-*tert*-butyl-2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((11-(6-aminohexanoyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-(*tert*-butoxy)-1,5-dioxopentan-5,2-diyl)tris(azantriyl))hexaacetat (60)

0.171 g der Verbindung **59** (0.10 mmol, 1.0 eq.) wurden in 15 mL Methanol gelöst und schließlich 30 mg Pd/C (10 mol%) hinzugegeben. Darauffolgend wurde die Reaktionslösung unter Wasserstoffatmosphäre 24 h bei RT gerührt. Dann wurde der Katalysator über Kieselgur abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Es wurden 0.145 g (0.09 mmol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 90%. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = **1.24-1.28** (m, 2H), **1.37** (s, 54H, H-1), **1.41** (s, 27H, H-1'), **1.46-1.51** (m, 8H), **1.68-1.81** (m, 11H), **2.28-2.46** (m, 8H), **2.63-2.66** (m, 1H), **3.33-3.36** (m, 27H), **4.04-4.18** (m, 2H, H-25). **HRMS** (ESI): für C₇₉H₁₄₂N₈O₂₂: berechnet: 777.5114, gefunden: 777.5105, für C₇₉H₁₄₁N₈O₂₂Na: berechnet: 788.5024, gefunden: 788.5060, für C₇₉H₁₄₁N₈O₂₂Na₂: berechnet: 799.4933, gefunden: 799.4974, für C₇₉H₁₄₁N₈O₂₂: berechnet: 1554.0155, gefunden: 1554.0221, für C₇₉H₁₄₀N₈O₂₂Na: berechnet: 1575.9974, gefunden: 1576.0015.

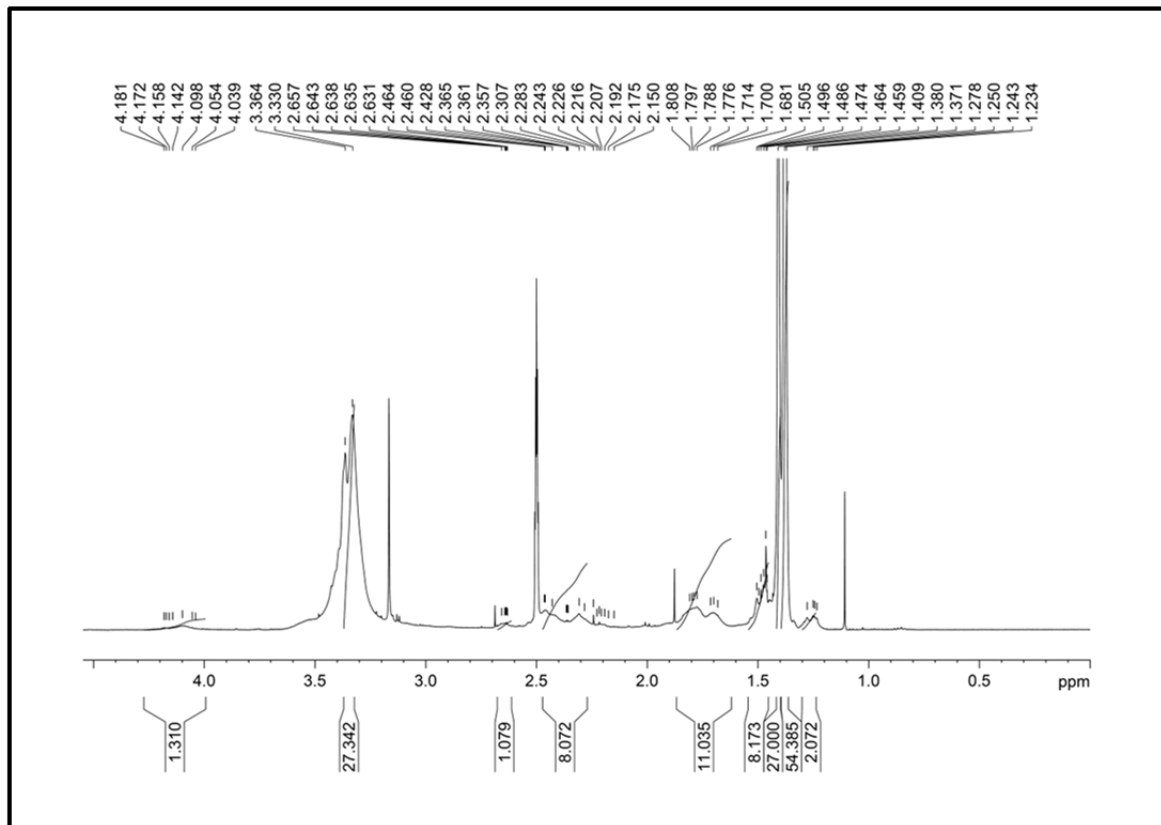
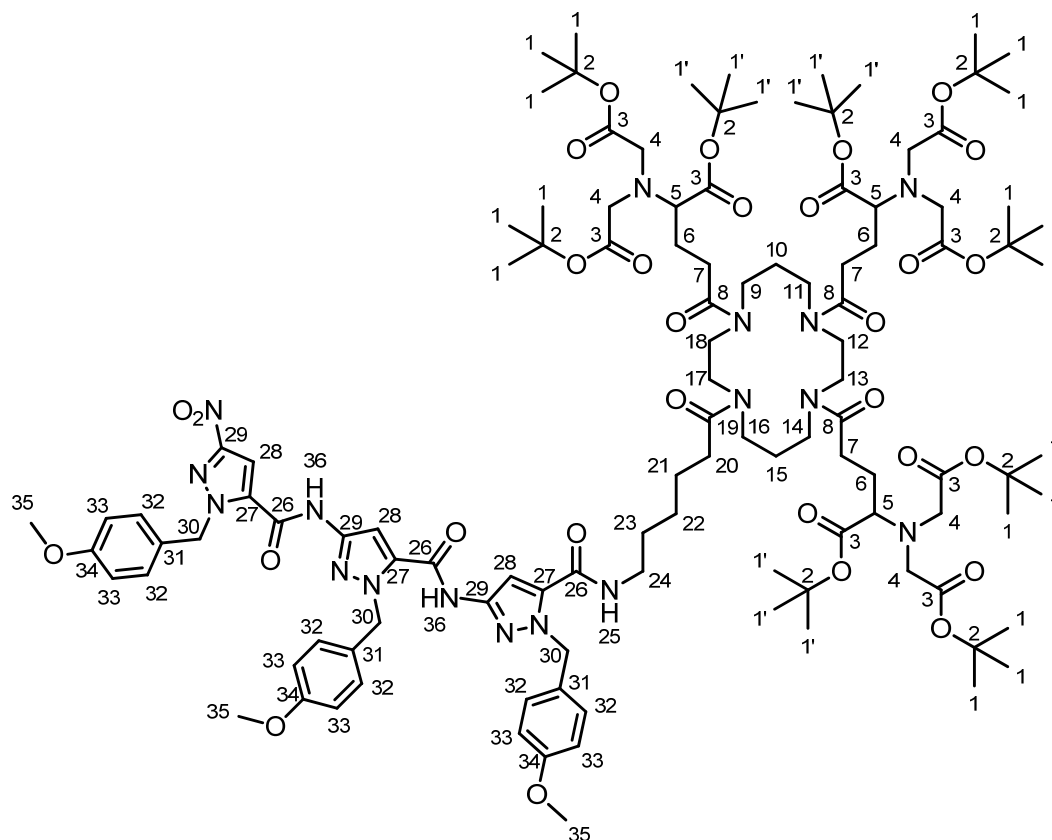


Abb. 147: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 60 (500 MHz, DMSO-d_6).

5.3.6. Synthese von Hexa-*tert*-butyl-2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((11-(6-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)hexan-oyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-(*tert*-butoxy)-1,5-dioxo-pentan-5,2-diyl))tris(azantriyl))hexaacetat (**61**)



Unter Argonatmosphäre wurden 0.043 g Trimer-Säure **57** (0.06 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL absolutem Dichlormethan und 5 mL absolutem DMF gelöst. Anschließend wurden 0.029 g HCTU (0.07 mmol, 1.2 eq.), 0.025 g Cl-HOBt (0.15 mmol, 2.5 eq.) und 0.04 mL DIEA (0.23 mol, 4.0 eq.) hinzugegeben, auf 0 °C heruntergekühlt und 10 min gerührt. Darauffolgand wurden 0.136 g der Substanz **60** (0.09 mmol, 1.5 eq.) hinzugegeben und 48 h bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck eingeengt und der Rückstand wieder mit Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wurde jeweils dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde letztlich säulenchromatographisch (Ethylacetat) aufgereinigt. Es wurden 0.043 g (0.02 mmol) eines farblosen Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 33%. **R_F:** 0.44 (Ethylacetat). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **1.24-1.31** (m, 2H), **1.38** (s, 54H, H-1), **1.40** (s, 27H, H-1'), **1.50-1.52** (m, 8H), **1.65-1.84** (m, 11H), **2.34-2.46** (m, 8H), **3.36-3.40** (m, 27H), **3.33-3.36** (m, 27H), **3.70-3.71** (3s, 9H, H-35), **5.61** (s, 2H, H-30), **5.67** (s, 2H, H-30), **5.81** (s, 2H, H-30), **6.85-6.91** (m, 7H, H-28, H-32, H-33), **7.16-7.30** (m, 7H, H-32, H-33), **7.71** (s, 1H, H-28), **7.98** (s, 2H, H-28), **8.62** (bs, 1H, H-25), **11.33** (s, 1H, H-36), **11.49** (s, 1H, H-36). **HRMS** (ESI): für C₁₁₅H₁₇₁N₁₇O₃₀Na: berechnet: 2294.2301, gefunden: 2294.2476, für C₁₁₅H₁₇₁N₁₇O₃₀Na₂: berechnet: 1158.6097, gefunden: 1158.6217.

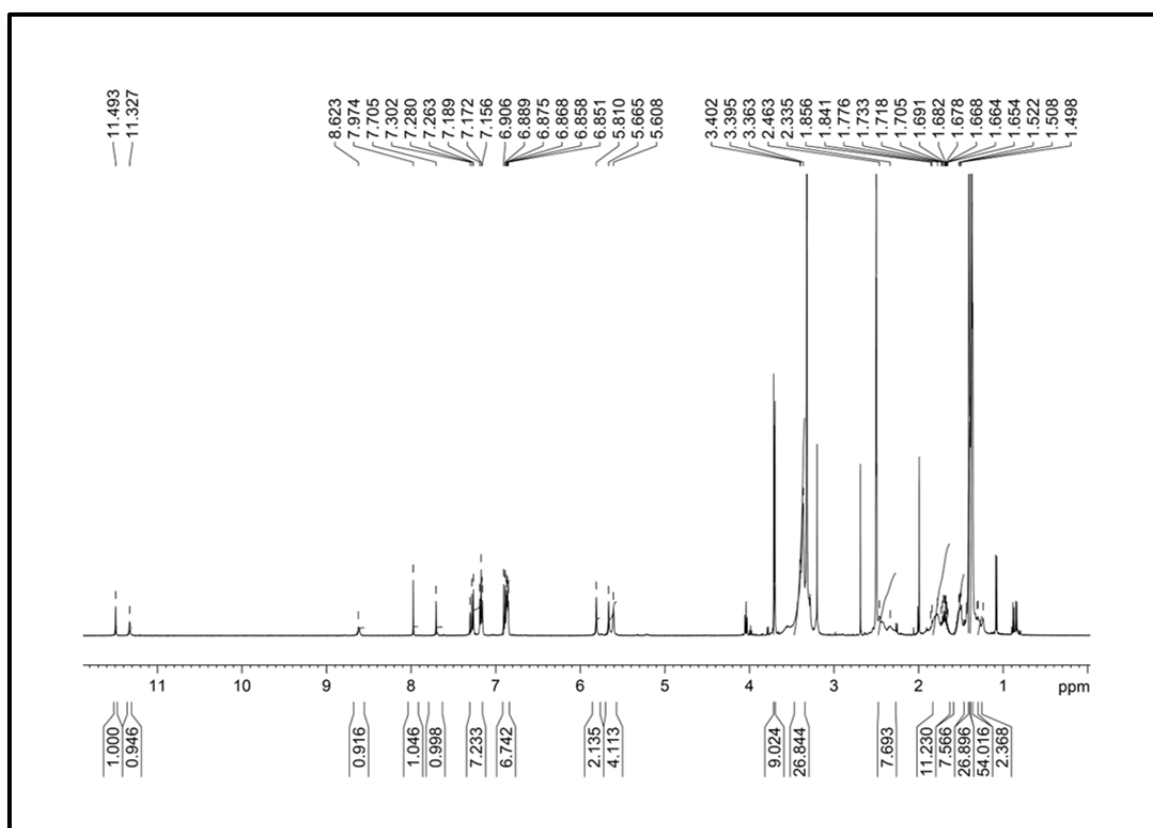
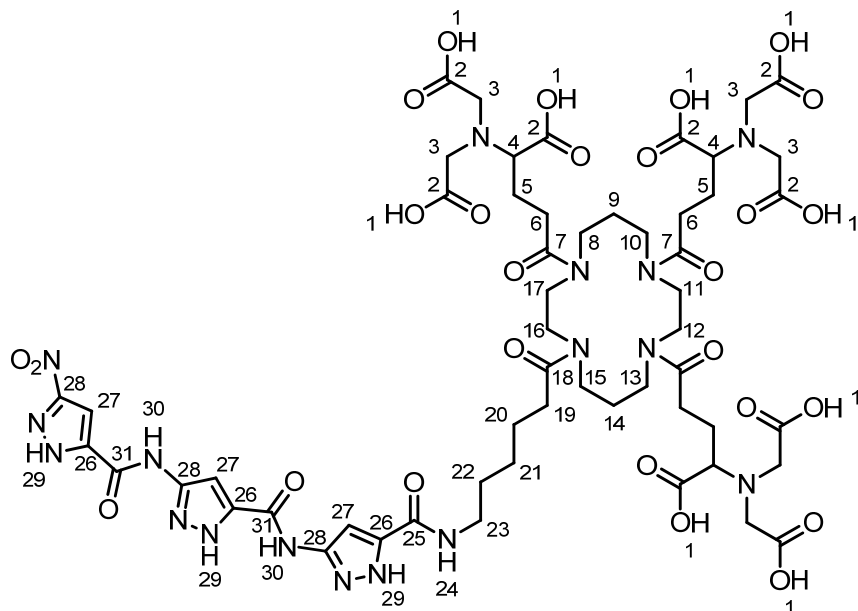


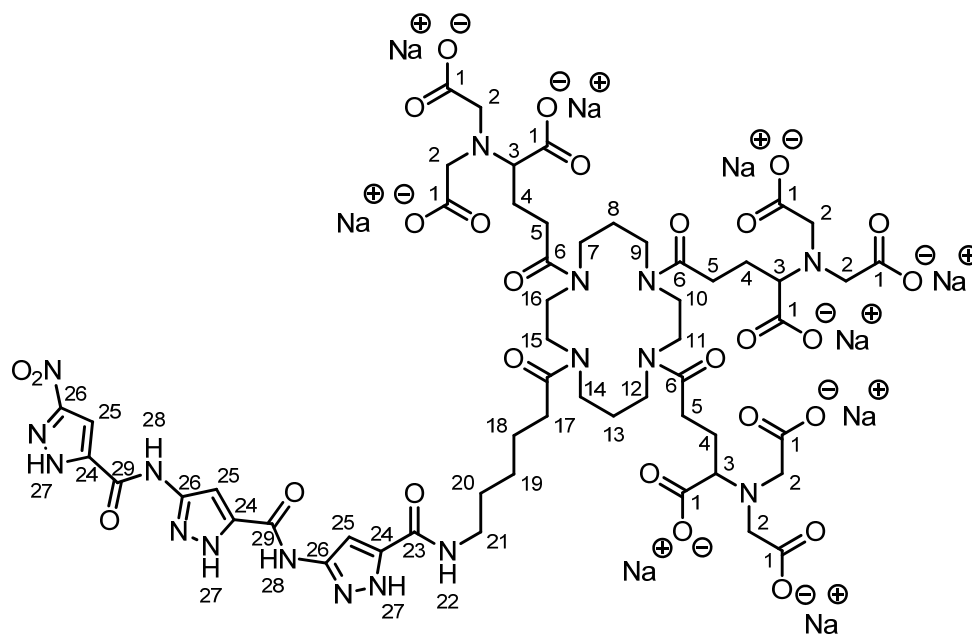
Abb. 148: ¹H-NMR-Spektrum des geschützten Trimer-Hybrids 61 (500 MHz, DMSO-d₆).

5.3.7. Synthese von 2,2',2'',2''',2''''-(((11-(6-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carbox-amido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carbox-amido)hexanoyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-carboxy-4-oxobutan-4,1-diyl)tris(azan-triyl))hexaethansäure



Unter Argonatmosphäre wurden 0.028 g Trimer-tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam **61** (0.01 mmol, 1.0 eq.) in 4 mL absolutem TFA gelöst und in einem geschlossenen System 5 h bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde die erkaltete Reaktionslösung mit kaltem Diethylether versetzt, der ausfallende Feststoff zentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Danach wurde der Feststoff noch dreimal in kaltem Diethylether suspendiert, wieder abzentrifugiert und letztlich der Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 0.019 g (0.01 mmol, 99%) eines weißen Feststoffes erhalten. Das erhaltene Produkt wurde sofort ins Natriumsalz überführt.

5.3.8. Synthese von 2,2',2'',2''',2''''-(((11-(6-(3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carbox-amido)-1*H*-pyrazol-5-carbox-amido)-1*H*-pyrazol-5-carbox-amido)hexanoyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-carboxylat-4-oxobutan-4,1-diyl)tris(azan-triyl))hexaethansäure nona Natriumsalz (62)



5.0 mg der entschützten Hybridverbindung (0.004 mmol, 1.0 eq., Abschnitt 5.2.11.) wurden mit 1 mL 2 M NaOH versetzt und anschließend wurden 2 mL kalter Diethylether hinzugegeben. Darauffolgend wurden schrittweise bis zu 1 mL Methanol hinzugegeben, bis sich die beiden Phasen vermischten und ein gelblicher Niederschlag zu sehen war. Letztlich wurde der Feststoff mit Diethylether gewaschen und in bidest. Wasser gefriergetrocknet. Es wurden 5.2 mg (0.003 mmol) eines gelben Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 75%. **¹H-NMR** (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = **1.44** (m, 2H, H-19), **1.66** (m, 4H, H-18, H-20), **1.86-2.00** (m, 10H, H-4, H-8, H-13), **2.45** (m, 8H, H-5, H-17), **3.12-3.63** (m, 33H, H-2, H-3, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-21), **6.81** (s, 1H, H-25), **6.93** (s, 1H, H-25), **7.46** (s, 1H, H-25). **HPLC:** 92-99% (Retentionszeit: 2.1-3.0 min, RP 18 Säule, 214 nm Detektion, Flussrate: 1.0 mL/min, linearer Gradient 95-40% Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1% TFA in bidestilliertem Wasser, Eluent B: Acetonitril).

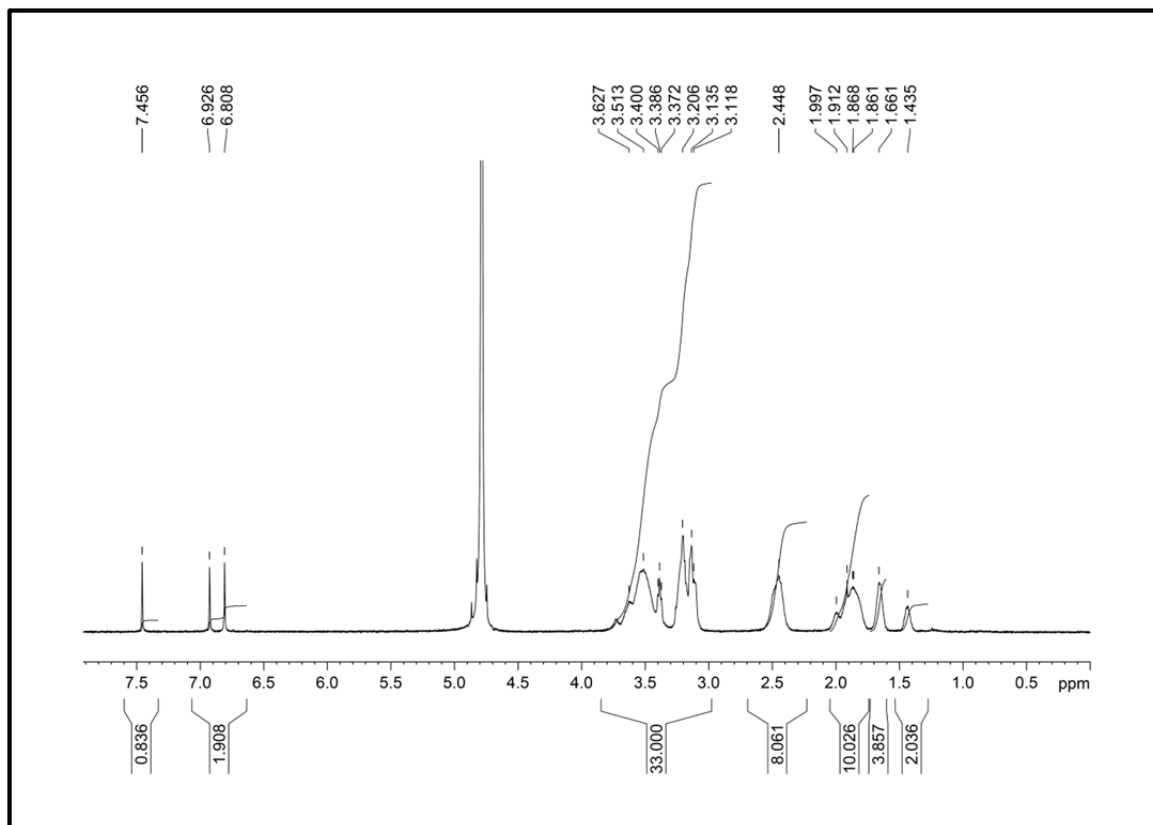
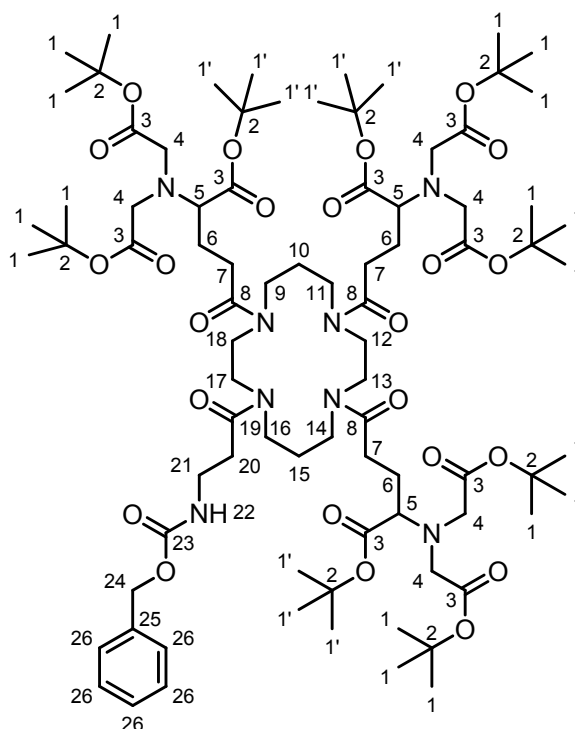


Abb. 149: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Zielverbindung 62 (500 MHz, D_2O).

5.3.9. Synthese von Hexa-*tert*-butyl-2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((11-(3-(((Benzyl-oxyl)carb-onyl)amino)propan-oyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-(*tert*-butoxy)-1,5-dioxopentan-5,2-diyl))tris(azan-triyl))hexaacetat (55)

Unter Argonatmosphäre wurden 0.489 g Tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam **53** (0.34 mmol, 1.0 eq.) in absolutem Dichlormethan gelöst, woraufhin 0.076 g Z- β -Alanin (0.34 mmol, 1.0 eq.), 0.153 g TBTU (0.48 mmol, 1.4 eq.) und 0.18 mL DIEA (1.02 mmol, 3.0 eq.) hinzugegeben wurden. Schließlich wurde die Reaktionslösung 24 h bei RT gerührt. Darauffolgend wurden das Lösungsmittel sowie flüchtige Bestandteile unter vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand wieder mit 50 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit jeweils 50 mL bidest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Ethylacetat) aufgereinigt. Es wurden 0.355 g (0.22 mmol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 65%. R_F : 0.46 (Ethylacetat). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = **1.42** (s, 54H, H-1), **1.46** (m, 27H, H-1'), **1.89-2.04** (m, 11H), **2.35-2.64** (m, 12H), **3.47-3.57**

(m, 29H), **5.07** (s, 2H, H-24), **7.30-7.33** (m, 5H, H-26). **MS** (ESI): für $C_{84}H_{140}N_8O_{24}Na$: berechnet: 1669.00, gefunden: 1668.03, für $C_{84}H_{140}N_8O_{24}Na_2$: berechnet: 846.50, gefunden: 845.54.

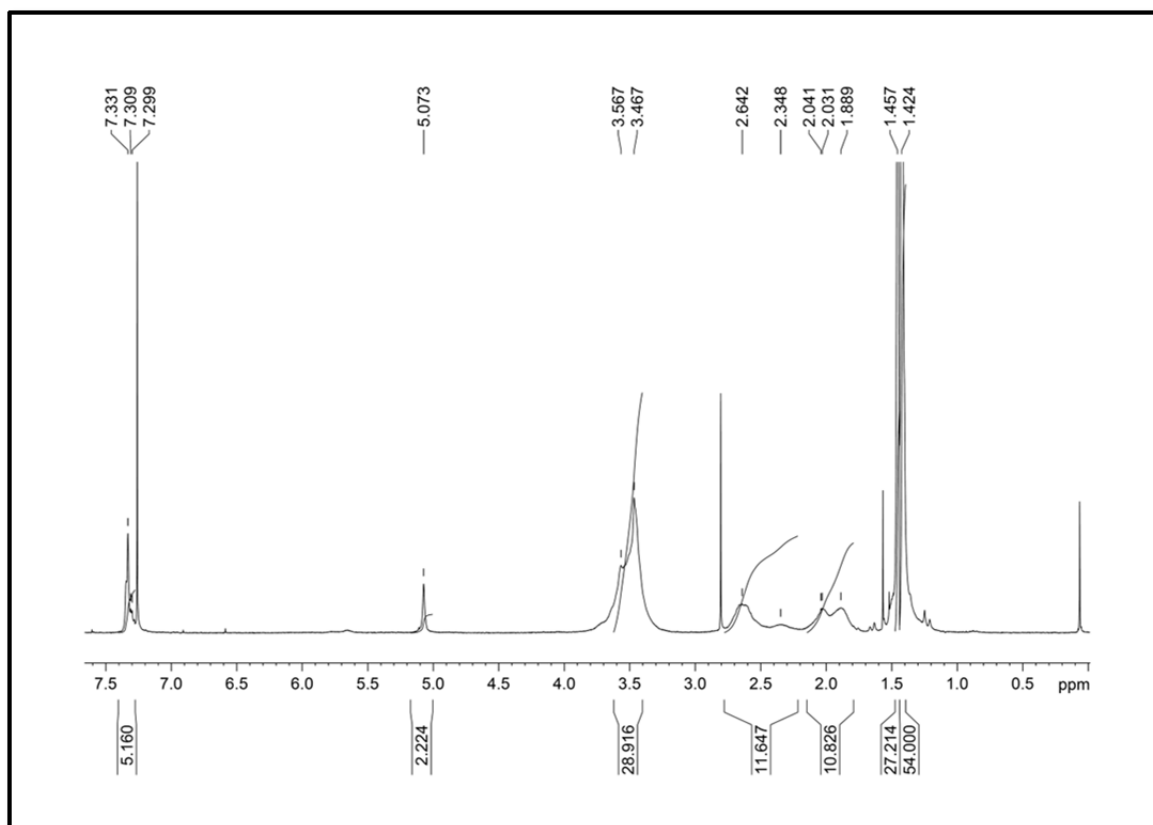
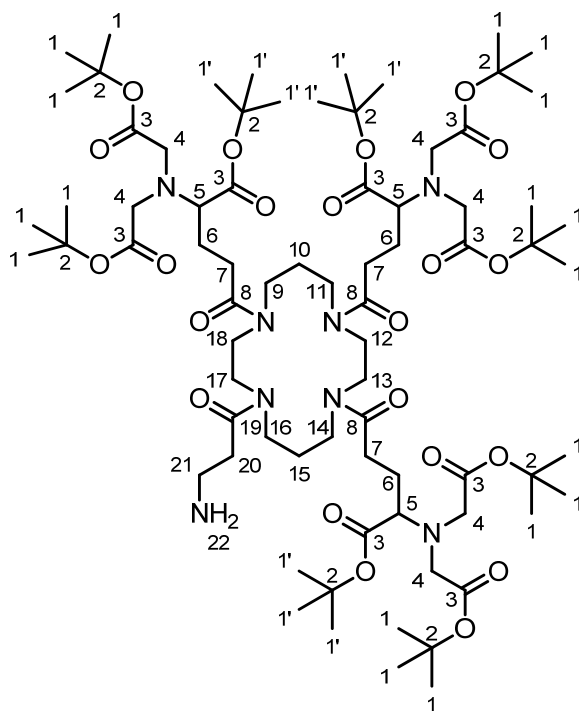


Abb. 150: 1H -NMR-Spektrum der Verbindung 55 (300 MHz, $CDCl_3$).

5.3.10. Synthese von Hexa-*tert*-butyl- 2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((11-(3-Aminopropanoyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-(*tert*-butoxy)-1,5-dioxopentan-5,2-diyl)tris(azantriyl))hexaacetat (56)

0.346 g der Verbindung **55** (0.210 mmol, 1.0 eq.) wurden in 20 mL Methanol gelöst und schließlich 30 mg Pd/C (10 mol%) hinzugegeben. Darauf folgend wurde die Reaktionslösung unter Wasserstoffatmosphäre 24 h bei RT gerührt. Dann wurde der Katalysator über Kieselgur abfiltriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 0.315 g (0.208 mmol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 99%. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = **1.42** (s, 54H, H-1), **1.45** (m, 27H, H-1'), **1.95** (m, 11H), **2.60-2.75** (m, 12H), **3.41-3.64** (m, 31H).

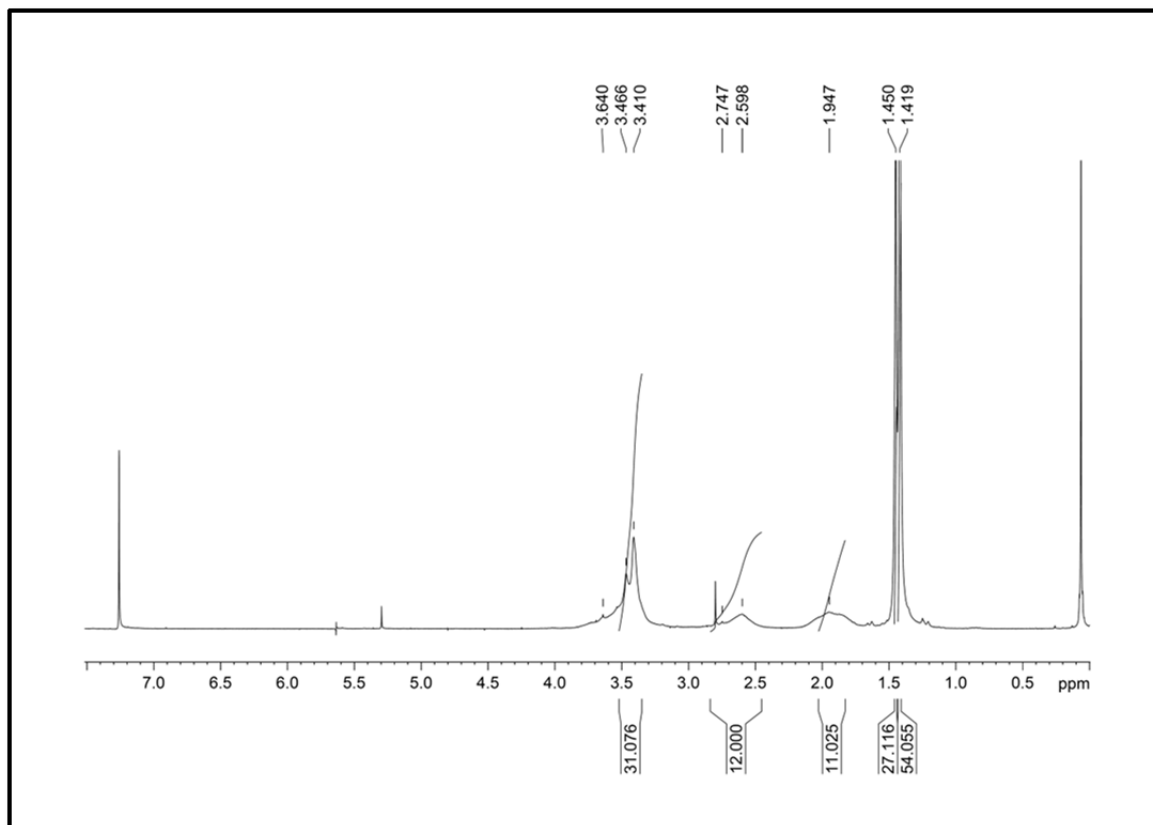
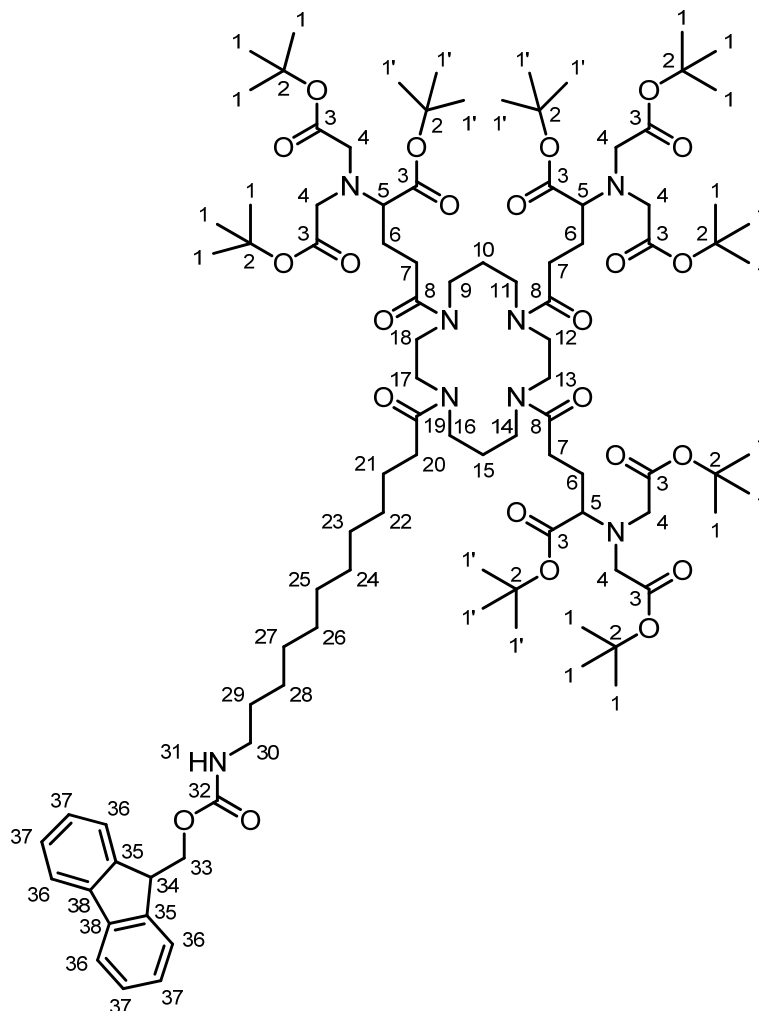


Abb. 151: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Amins 56 (300 MHz, CDCl_3).

5.3.11. Synthese von Hexa-*tert*-butyl-2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((11-(12-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)dodecanoyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-(*tert*-but-oxy)-1,5-dioxopentan-5,2-diyl)tris(azantriyl))hexa-acetat (63**)**

Unter Argonatmosphäre wurden 0.242 g Tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam **53** (0.17 mmol, 1.0 eq.) in absolutem Dichlormethan gelöst, woraufhin 0.073 g Fmoc-12-Ado-OH (0.17 mmol, 1.0 eq.), 0.075 g TBTU (0.24 mmol, 1.4 eq.) und 0.090 mL DIEA (0.50 mmol, 3.0 eq.) hinzugegeben wurden. Schließlich wurde die Reaktionslösung 24 h bei RT gerührt. Darauffolgend wurden das Lösungsmittel sowie flüchtige Bestandteile unter vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand wieder mit 50 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit jeweils 50 mL bidest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Gradient: Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 bis Ethylacetat) aufgereinigt. Es wurden 0.244 g (0.13 mmol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 76%. **R_F:** 0.63 (Ethylacetat). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.29-1.32** (m, 14H, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28), **1.46** (s, 54H, H-1), **1.50** (s, 27H, H-1'), **1.62-1.65** (m, 4H), **1.92-1.95** (m, 11H), **2.30-2.74** (m, 8H), **3.20-3.24** (m, 2H), **3.49-3.61** (m, 31H), **4.23-4.26** (t, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 1H, H-34), **4.42-4.43** (d, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 2H, H-33), **4.81** (bs, 1H, H-31), **7.33-7.36** (dt, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, 2H, H-37), **7.41-7.44** (t, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, H-37), **7.62-7.63** (d, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, H-36), **7.79-7.80** (d, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, H-36). **MS** (ESI): für C₁₀₀H₁₆₂N₈O₂₄Na₂: berechnet: 953.08, gefunden: 953.18, für C₁₀₀H₁₆₂N₈O₂₄Na: berechnet: 1883.16, gefunden: 1883.33.

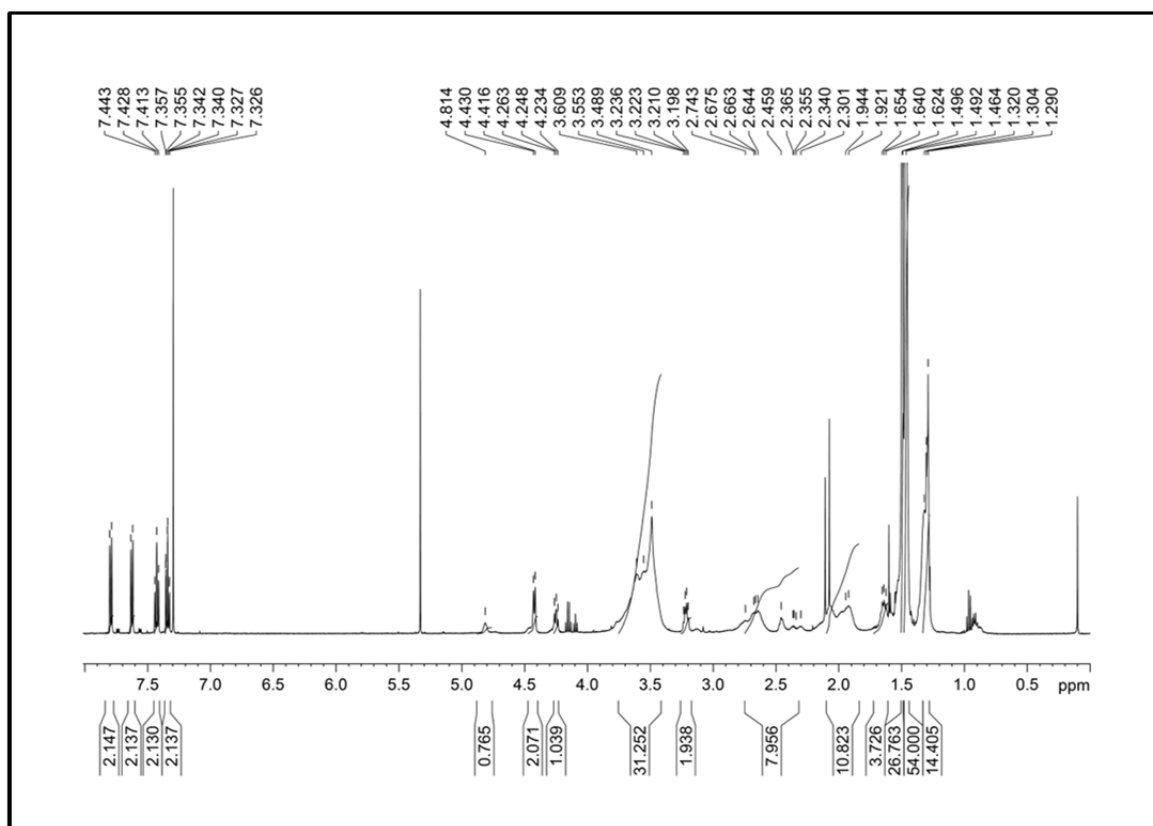
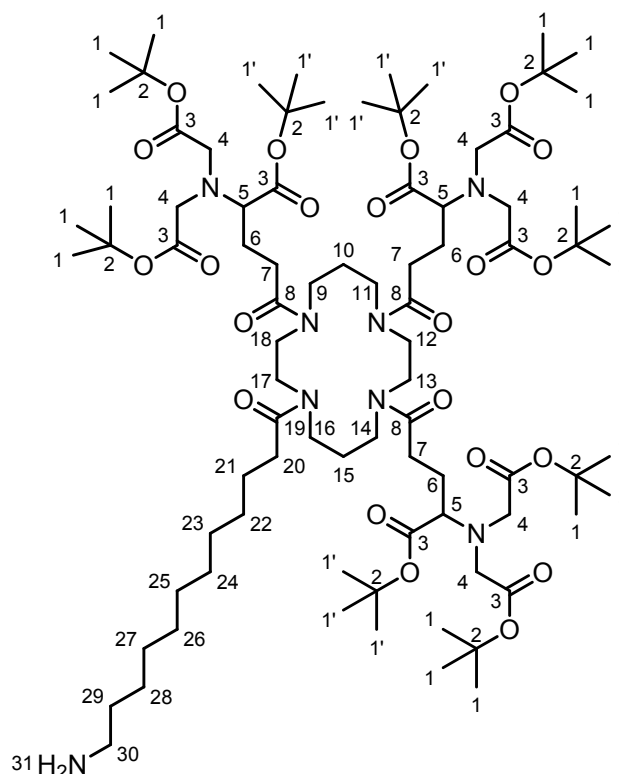


Abb. 152: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 63 (500 MHz, CDCl₃).

5.3.12. Synthese von Hexa-*tert*-butyl-2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((11-(12-Aminododecanoyl)-1,4,8,11-tetra-azacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-(*tert*-butoxy)-1,5-dioxopentan-5,2-diyl))tris(azan-triyl))hexaacetat (64)

Unter Argonatmosphäre wurden 189.3 mg des Cyclam-Derivates **63** (0.10 mol, 1.0 eq.) in 16 mL absolutem Dichlormethan gelöst und darauffolgend wurden 4 mL Piperidin (20 vol%) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 24 h bei RT gerührt und anschließend jeweils dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 1 M HCl und bidest. Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Gradient: Ethylacetat über Ethylacetat/Methanol 9:1 bis Methanol) aufgereinigt. Es wurden 82.5 mg (0.05 mmol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 50%. **R_F:** 0.63 (Ethylacetat). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.28-1.33** (m, 14H, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28), **1.46** (s, 54H, H-1), **1.49** (s, 27H, H-1'), 1.62-1.65 (m, 4H), **1.87-2.07** (m, 11H), **2.33-2.67** (m, 8H), **3.09-3.15** (m, 2H), **3.43-3.53** (m, 31H). **HRMS** (ESI): für C₈₅H₁₅₃N₈O₂₂: berechnet: 1638.1094, ge-

funden: 1638.1077, für $C_{85}H_{153}N_8O_{22}Na$: berechnet: 830.5493, gefunden: 830.5479,
für $C_{85}H_{153}N_8O_{22}Na_2$: berechnet: 561.3626, gefunden: 561.3628.

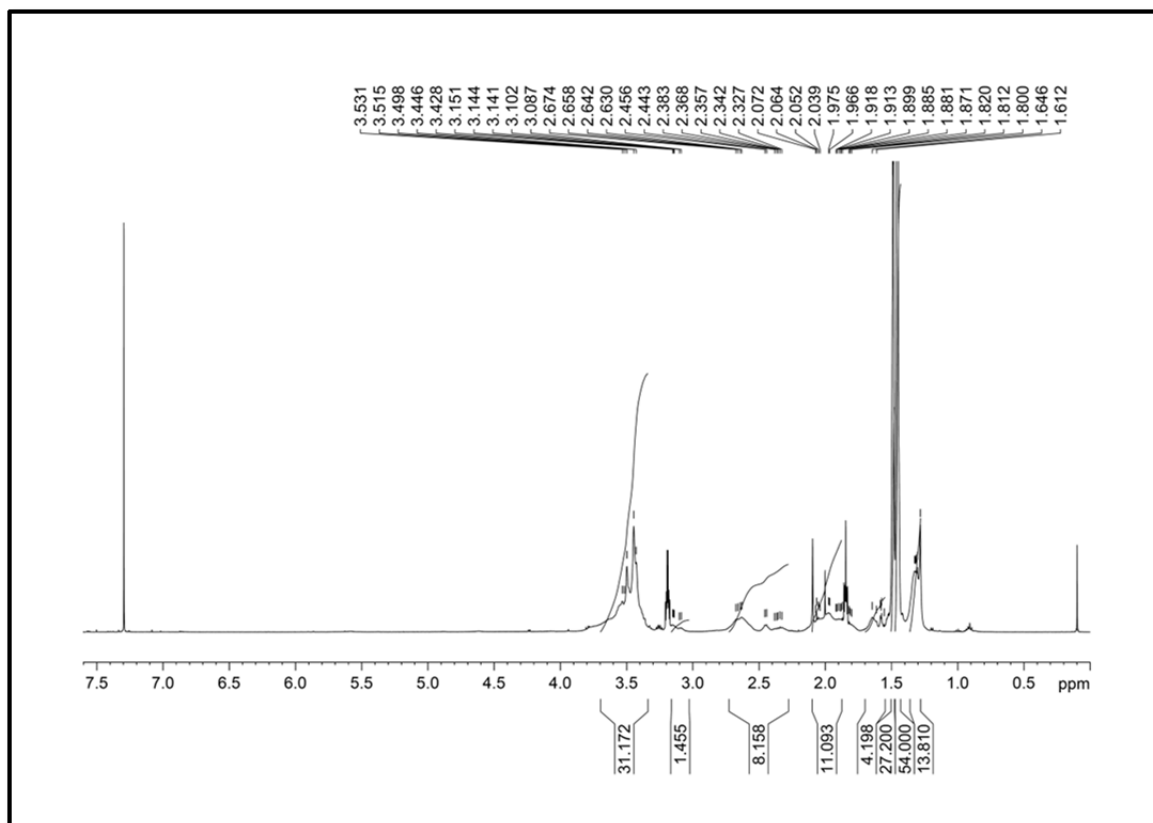
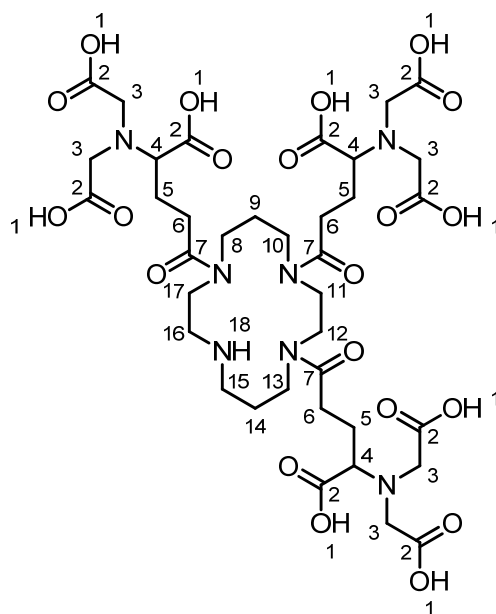
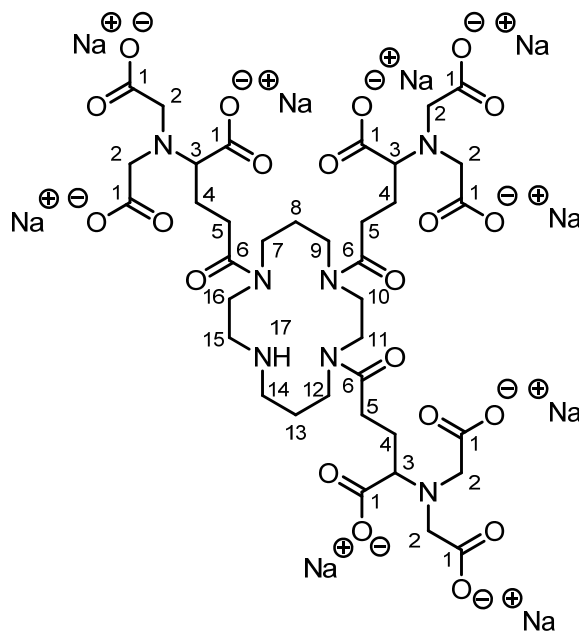


Abb. 153: 1H -NMR-Spektrum der Verbindung 64 (500 MHz, $CDCl_3$).

5.3.13. Synthese von 2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-carboxy-4-oxobutan-4,1-diyl))tris(azantriyl))hexaethansäure

0.359 g Tris(*t*Bu-NTA)-Cyclam **53** (0.25 mmol, 1.0 eq.) wurden in 2 mL TFA und 14 mL Dichlormethan gelöst und 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand wieder mit TFA aufgenommen und mit kaltem Diethylether versetzt. Der ausfallende Feststoff wurde abzentrifugiert, dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen und der Feststoff schließlich im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 0.203 g (0.22 mmol, 91%) eines gelbbraunen Feststoffes erhalten. Das erhaltene Produkt wurde im nächsten Schritt ins Natriumsalz überführt.

5.3.14. Synthese von 2,2',2'',2''',2''''',2''''''-(((1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan-1,4,8-triyl)tris(1-carboxylat-4-oxobutan-4,1-diyl))tris(azantriyl))hexaacetat nona Natriumsalz (54)

0.050 g Tris(NTA)-Cyclam (0.053 mmol, 1.0 eq., Abschnitt 5.2.17.) wurden mit 0.481 mL 1 M NaOH (0.481 mmol, 9.0 eq.) versetzt und 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde für den Erhalt des Natriumsalzes die Lösung gefriergetrocknet. Es wurden 0.060 g (0.053 mmol) eines gelbbraunen Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 99%. ¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = **1.85-2.01** (m, 10H, H-4, H-8, H-13), **2.46-2.48** (m, 6H, H-7, H-9, H-12), **2.75** (m, 2H, H-14), **2.82-2.87** (m, 2H, H-15), **3.11-3.28** (m, 15H, H-2, H-3), **3.48-3.58** (m, 13H, H-5, H-10, H-11, H-16, H-17).

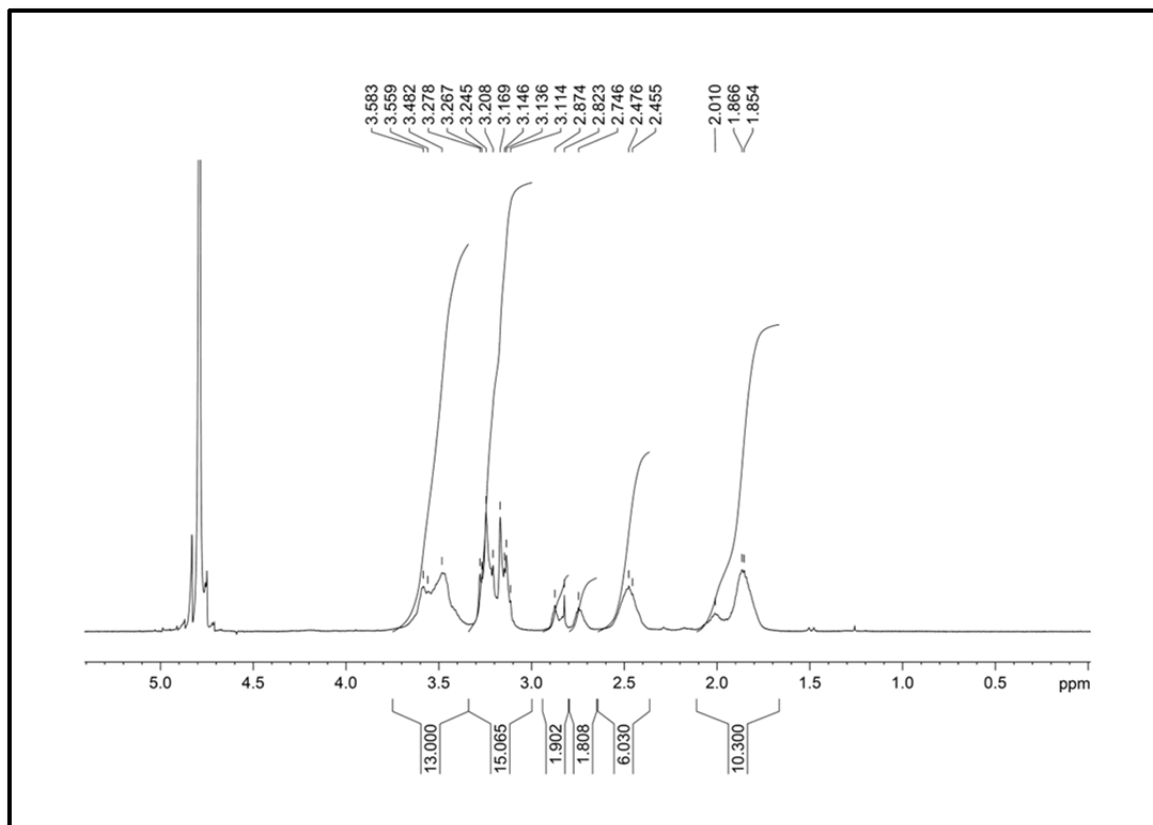


Abb. 154: ^1H -NMR-Spektrum des Salzes 54 (500 MHz, D_2O).

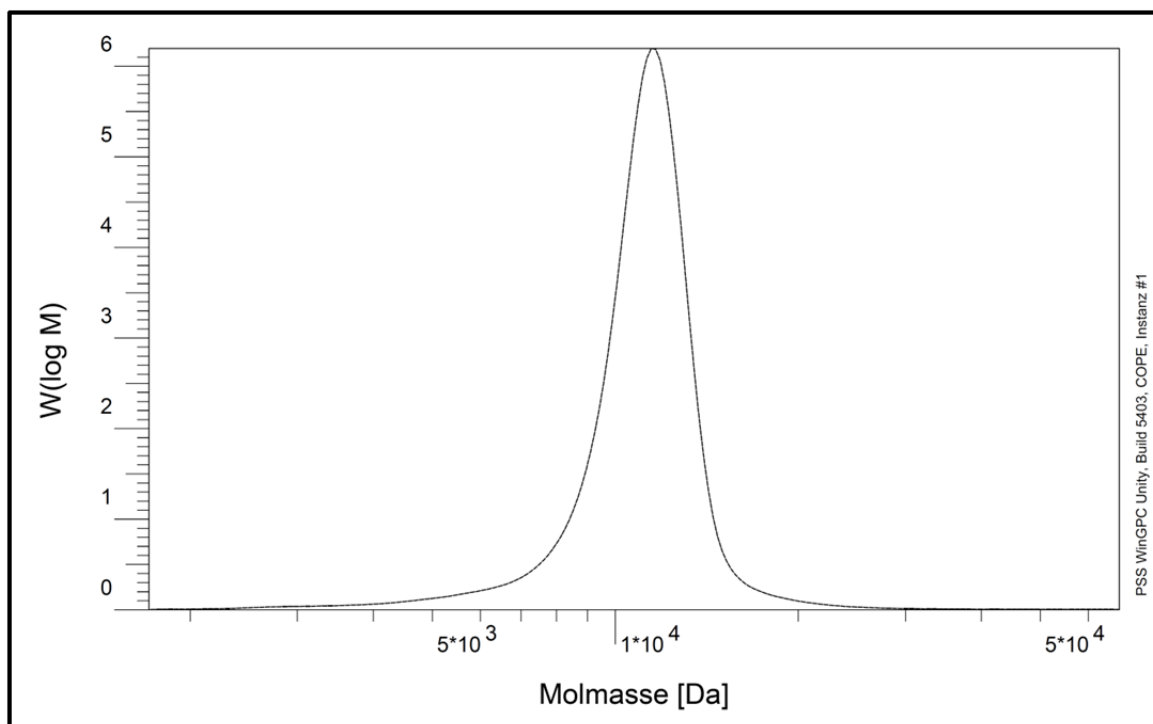
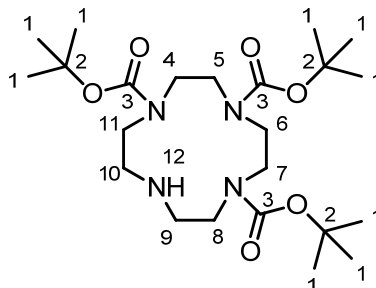


Abb. 155: GPC-Chromatogramm des Salzes 54 mit dem Peakmaximum $M_p = 1146 \text{ g/mol}$.

5.4. Cyclen-Funktionalisierung des Aminopyrazoltrimers

5.4.1. Synthese von 1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäuretri-*tert*-butylester (**66**)



1.00 g Cyclen **67** (5.81 mmol, 1.0 eq.) und 2.44 mL Triethylamin (17.59 mmol, 3.03 eq.) wurden in 30 mL Chloroform gelöst. Anschließend wurden 3.84 g Di-*tert*-butyldicarbonat (**68**) (17.59 mmol, 3.03 eq.) in 20 mL Chloroform über einen Zeitraum von 2 h hinzugegeben, wobei die Temperatur mittels Eisbad auf 0 °C gehalten wurde. Nach dem Zutropfen wurde die Reaktionslösung 18 h bei RT gerührt und danach zweimal mit jeweils 100 mL bidest. Wasser gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Diethylether) aufgereinigt. Es wurden 0.79 g (1.68 mmol) eines weißen Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 29%. **R_F:** 0.25 (Diethylether). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.45-1.47** (2s, 27H, H-1), **2.85** (m, 4H, H-9, H-10), **3.28-3.61** (m, 13H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-11, H-12). **MS** (ESI): für C₂₃H₄₅N₄O₆: berechnet: 473.33, gefunden: 473.41, für C₂₃H₄₄N₄O₆Na: berechnet: 495.32, gefunden: 495.38.

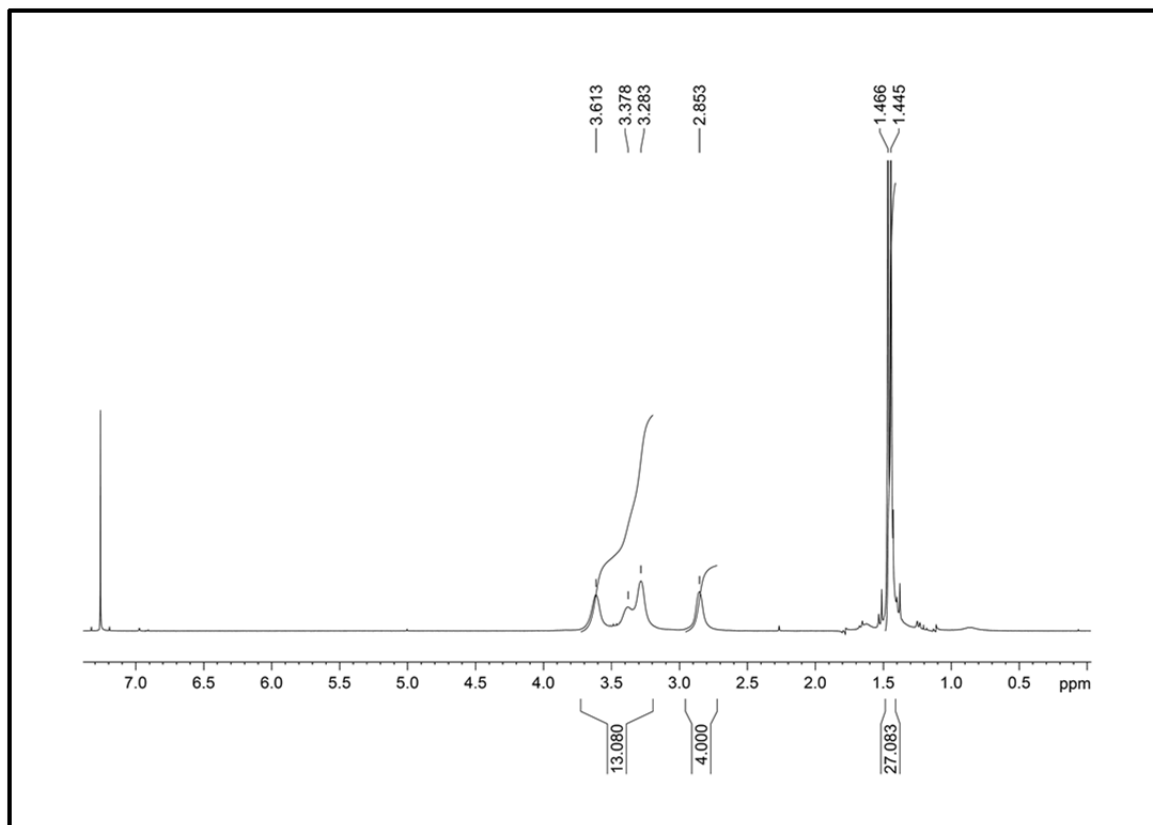
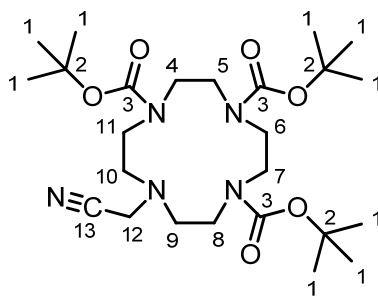


Abb. 156: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Tris(*N*-Boc)-Cyclen 66 (300 MHz, CDCl_3).

5.4.2. Synthese von 10-(Cyanomethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäuretri-*tert*-butylester (70)



0.150 g Tris(*N*-Boc)-Cyclen **66** (0.32 mmol, 1.0 eq.) wurden in 10 mL Acetonitril gelöst und anschließend 0.024 mL Bromoacetonitril (**69**) (0.35 mmol, 1.1 eq.) sowie 0.053 g Kaliumcarbonat (0.38 mmol, 1.2 eq.) hinzugegeben. Darauffolgend wurde die Suspension 16 h bei 50 °C gerührt, nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Abschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) aufgereinigt. Es wurden 0.144 g (0.28 mmol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 88%. **R_F:** 0.50 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.44-1.46** (2s, 27H, H-1), **2.82-2.85** (m, 4H, H-9, H-10), **3.37-3.47** (m, 12H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-11), **3.82** (s, 2H, H-12). **MS** (ESI): für C₂₃H₄₅N₄O₆: berechnet: 473.33, gefunden: 473.41, für C₂₃H₄₄N₄O₆Na: berechnet: 495.32, gefunden: 495.38.

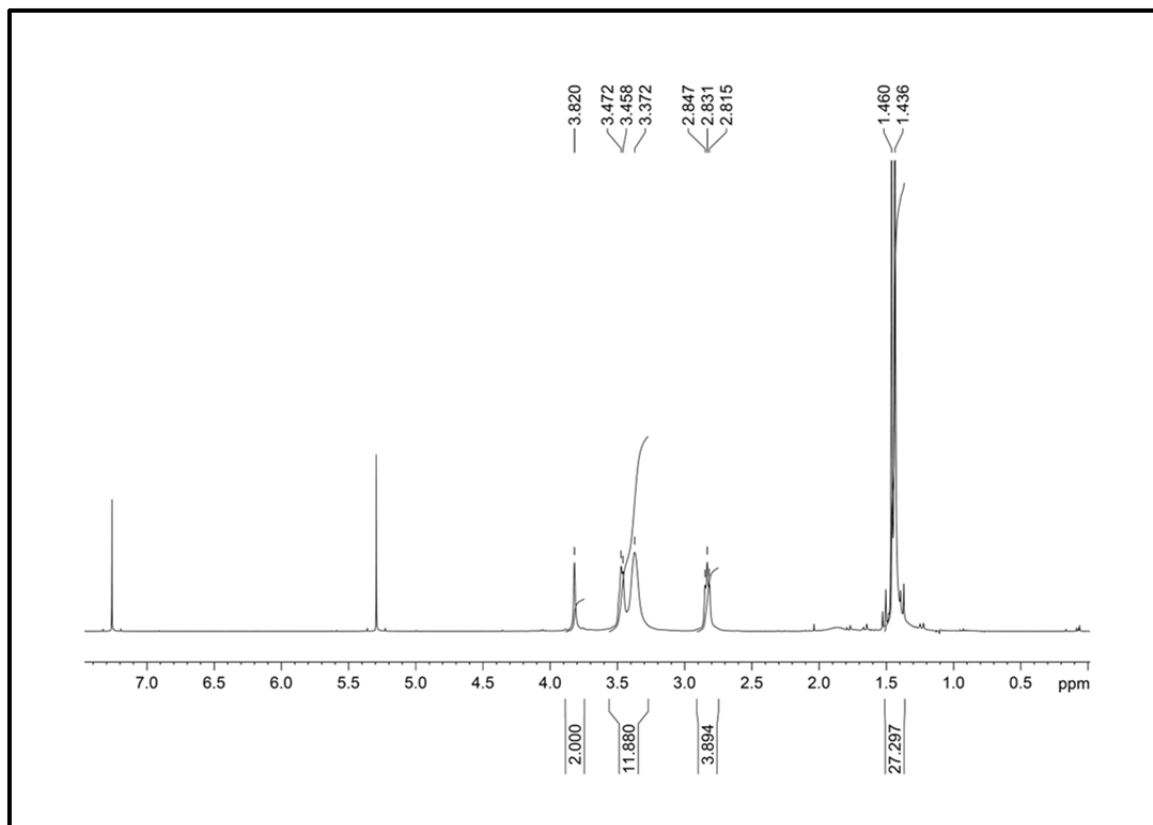
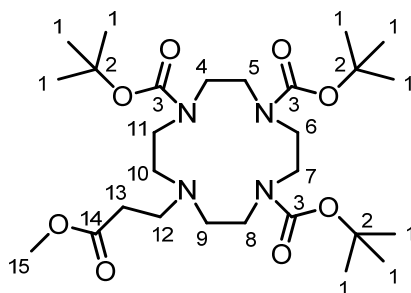


Abb. 157: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Nitrils 70 (300 MHz, CDCl_3).

5.4.3. Synthese von 10-(3-Methoxy-3-oxopropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecan-1,4,7-tricarbonsäuretri-*tert*-butylester



0.100 g Tris(*N*-Boc)-Cyclen **66** (0.21 mmol, 1.0 eq.) wurden in 15 mL Acetonitril gelöst. Daraufgehend wurden 0.025 mL 3-Brompropansäuremethylester (0.23 mmol, 1.1 eq.), 0.035 g Kaliumcarbonat (0.25 mmol, 1.2 eq.), 0.162 g 18-Krone-6 (0.61 mmol, 2.9 eq.) und 0.018 g Kaliumiodid (0.11 mol, 0.5 eq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde 16 h bei 80 °C gerührt, schließlich auf RT abgekühlt und filtriert. Letztlich wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) aufgereinigt. Es wurden 0.006 g (0.01 mol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 5%. **R_F:** 0.59 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.45-1.46** (2s, 27H, H-1), **2.43-2.48** (t, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, H-13), **2.61-2.68** (m, 4H, H-9, H-10), **2.93-2.98** (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2H, H-4/H-5/H-6/H-7/H-11), **3.28-3.50** (m, 10H, H-4/H-5/H-6/H-7/H-11), **3.65-3.70** (m, 5H, H-12, H-15). **MS** (ESI): für C₂₇H₅₀N₄O₈Na: berechnet: 581.35, gefunden: 581.42, für C₅₄H₁₀₀N₈O₁₆Na: berechnet: 1139.71, gefunden: 1139.82.

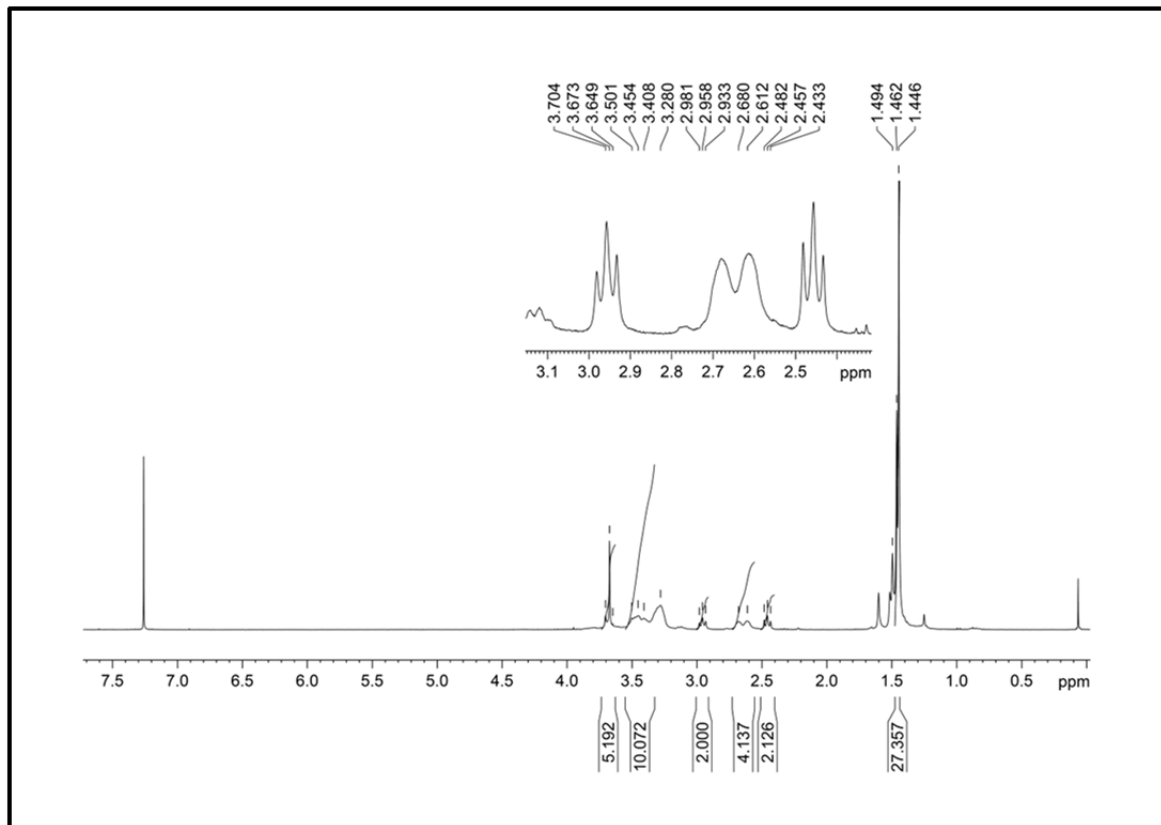
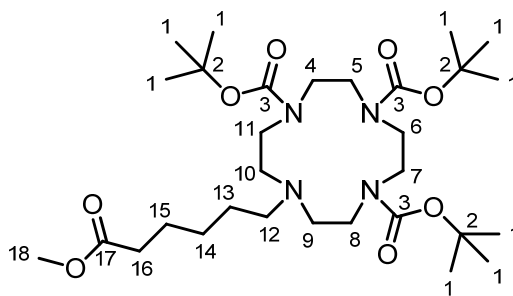


Abb. 158: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Tris(*N*-Boc)-Cyclen-propionsäuremethylesters (300 MHz, CDCl_3).

5.4.4. Synthese von 10-(6-Methoxy-6-oxohexyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäuretri-*tert*-butylester (78)



0.100 g Tris(*N*-Boc)-Cyclen **66** (0.21 mmol, 1.0 eq.) wurden in 15 mL Acetonitril gelöst und schließlich 0.049 g 6-Bromhexansäuremethylester (**77**) (0.23 mmol, 1.1 eq.) und 0.035 g Kaliumcarbonat (0.25 mmol, 1.2 eq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde darauffolgend 8 d bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Reaktionslösung filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Letztlich wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) aufgereinigt. Es wurden 0.048 g (0.08 mmol) eines blassgelben Öls erhalten.

Ausbeute: 38%. **R_F:** 0.63 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.23-1.40** (m, 4H, H-13, H-14), **1.44-1.46** (2s, 27H, H-1), **1.59-1.66** (m, 2H, H-15), **2.28-2.2.33** (t, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2H, H-16), **2.48-2.65** (m, 4H, H-9, H-10), **3.25-3.60** (m, 14H, H-4, H-5, H-6, H-8, H-11, H-12), **3.66** (s, 3H, H-18). **MS** (ESI): für C₃₀H₅₇N₄O₈: berechnet: 601.42, gefunden: 601.47, für C₃₀H₅₆N₄O₈Na: berechnet: 623.40, gefunden: 623.44, für C₃₀H₅₅N₄O₈: berechnet: 599.40, gefunden: 599.55.

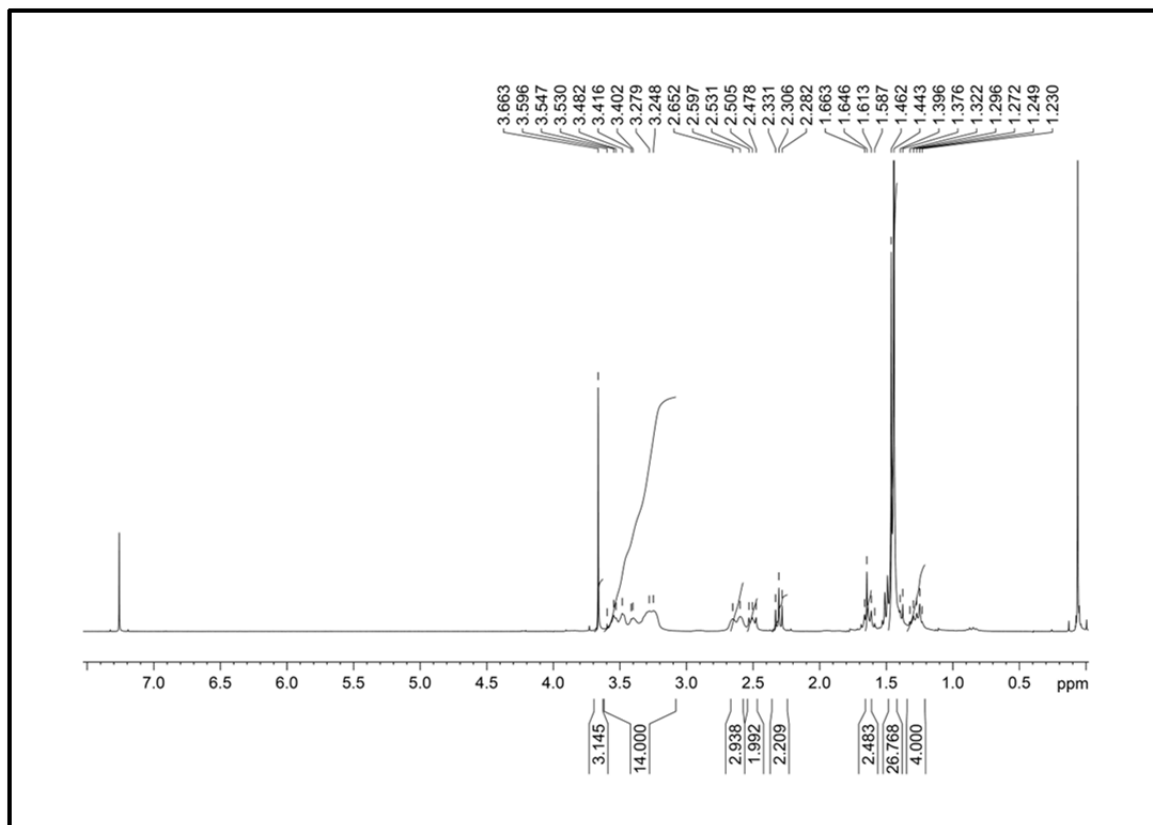
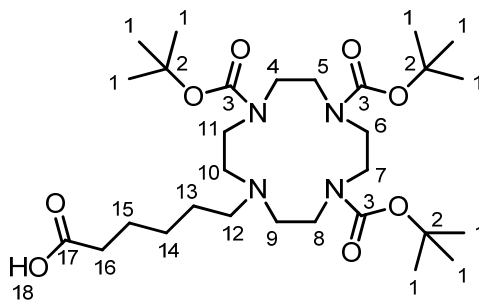


Abb. 159: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Hexansäureesters 78 (300 MHz, CDCl_3).

5.4.5. Synthese von 6-(4,7,10-Tris(tert-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)hexansäure (79)



28.3 mg 10-(12-Methoxy-12-oxododecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäuretri-*tert*-butylester (**78**) (0.047 mmol, 1.0 eq.) wurden in 10 mL THF und 5 mL Methanol gelöst. Anschließend wurden 5.9 mg LiOH · H₂O (0.14 mmol, 3.0 eq.) und 1 mL bidest. Wasser hinzugegeben und 18 h refluxiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand in bidest. Wasser aufgenommen. Danach wurde die Lösung mit 1 M HCl auf pH 1 angesäuert und diese dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 27.5 mg (0.047 mmol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 99%. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.41-1.49** (m + 2s, 31H, H-1, H-13, H-14), **1.64-1.66** (m, 2H, H-15), **1.92** (bs, 2H, H-9/H-10), **2.32-2.34** (t, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 2H, H-16), **2.96** (bs, 2H, H-9/H-10), **3.32-3.85** (m, 14H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-11, H-12), **12.27** (bs, 1H, H-18). ¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **23.55** (C-15), **23.99** (C-14), **26.25** (C-13), **28.56/28.61** (C-1), **33.73** (C-16), **45.41** (C-4, C-5, C-6, C-7), **48.35** (C-8, C-11), **50.08/50.40** (C-9, C-10), **54.36** (C-12), **81.27/81.78** (C-2), **156.59/156.76** (C-3), **176.38** (C-17). **MS** (ESI): für C₂₉H₅₄N₄O₈: berechnet: 585.39, gefunden: 585.45.

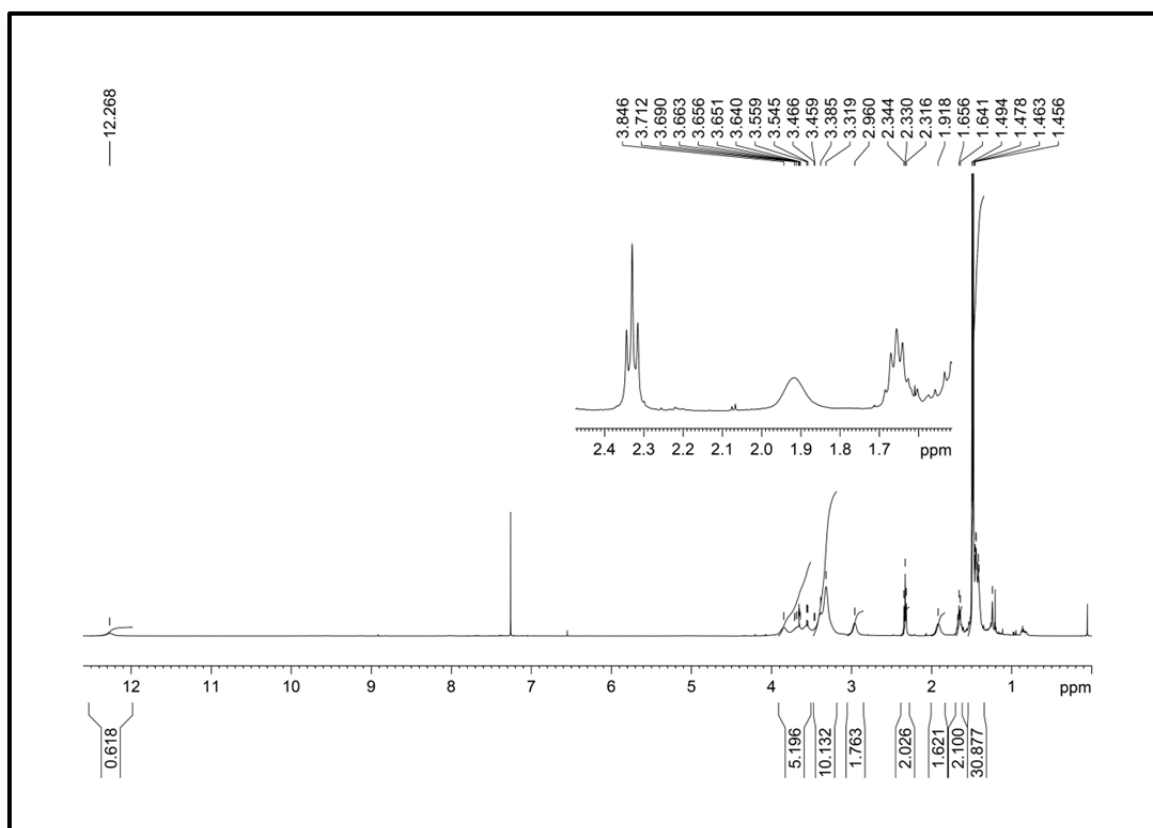


Abb. 160: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 79 (500 MHz, CDCl_3).

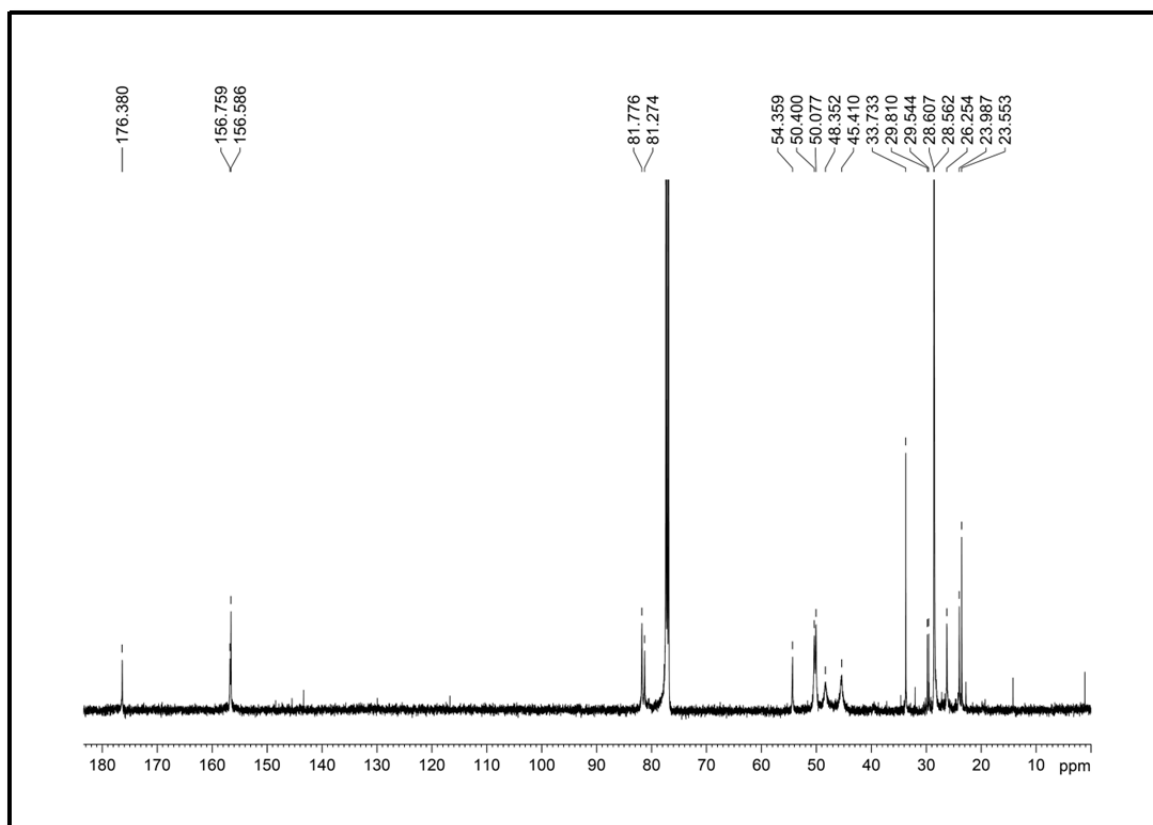
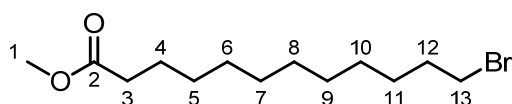


Abb. 161: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung 79 (125.8 MHz, CDCl_3).

5.4.6. Synthese von 12-Bromdodecansäuremethylester (82)

0.500 g 12-Bromdodecansäure (**81**) (1.79 mmol, 1.0 eq.) wurden in 20 mL Methanol gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Schließlich wurden 0.390 mL Thionylchlorid (5.37 mmol, 3.0 eq.) langsam hinzugegeben und 16 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 0.299 g (1.02 mol) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 57%. **R_F:** 0.67 (Cyclohexan/Ethylacetat = 7:1). **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.23** (m, 12H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10), **1.35-1.38** (m, 2H, H-11), **1.55-1.58** (quin, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 2H, H-4), **1.78-1.82** (quin, ³J_{HH} = 7.3 Hz, 2H, H-12), **2.24-2.26** (t, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, H-3), **3.34-3.36** (t, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 2H, H-12), **3.61** (s, 3H, H-1). **¹³C-NMR** (150.9 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **24.95** (C-4), **28.18/28.77/29.15/29.25/29.40/29.42/29.46** (C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11), **32.86** (C-12), **33.95** (C-3), **34.10** (C-13), **51.41** (C-1), **174.23** (C-2). **HRMS** (ESI): für C₁₃H₂₅BrO₂Na: berechnet: 315.0930, gefunden: 315.0918.

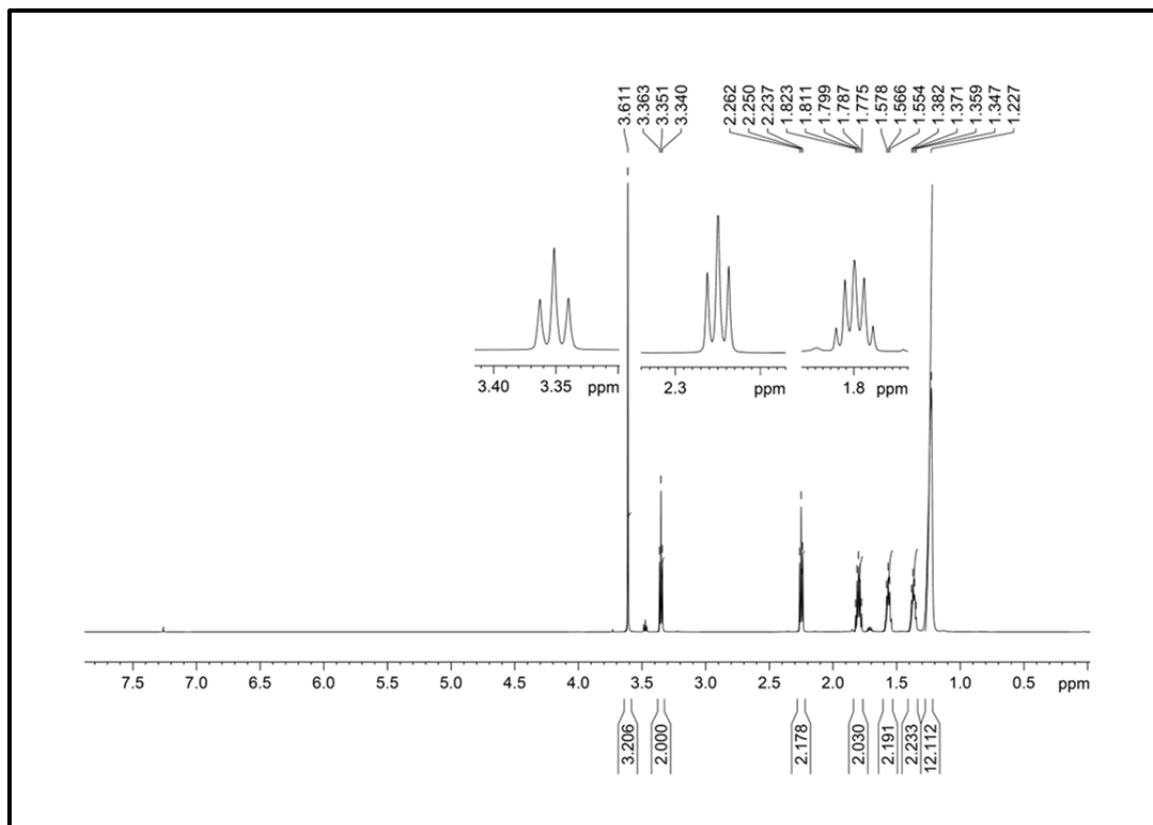


Abb. 162: ^1H -NMR-Spektrum des :Linkers 82 (600 MHz, CDCl_3).

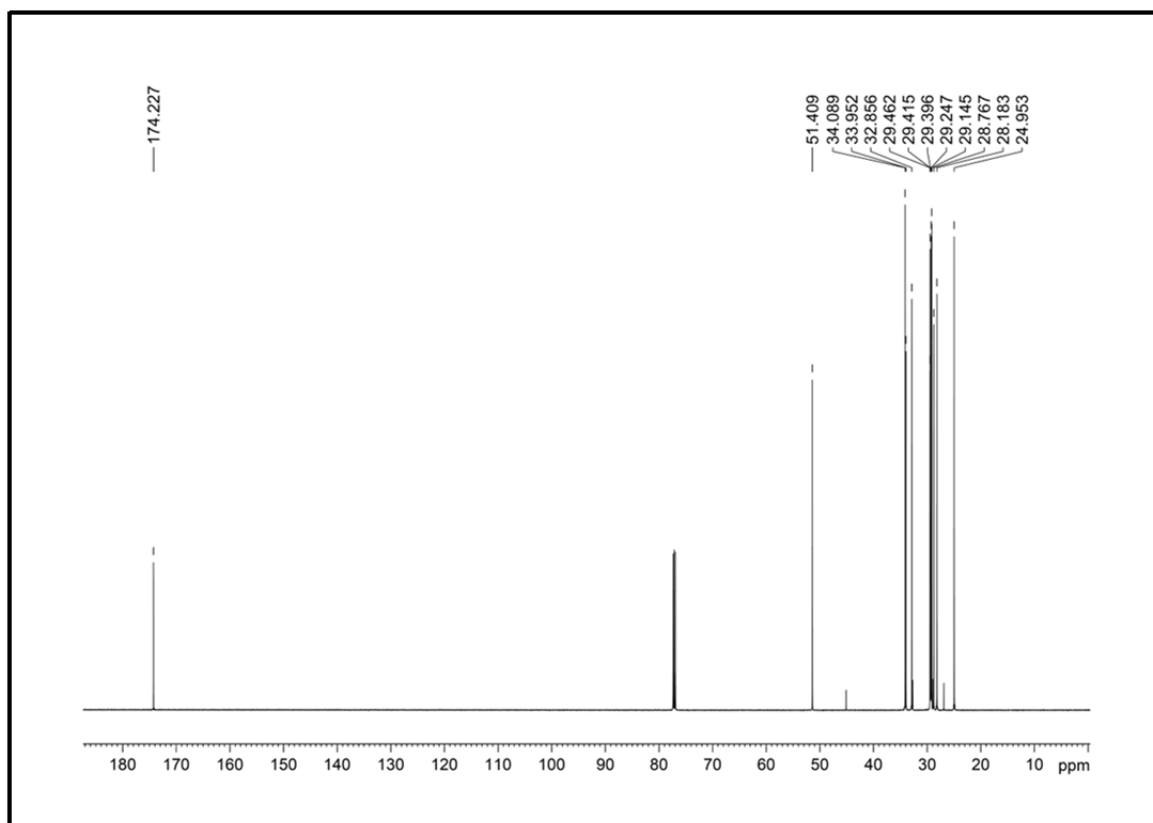
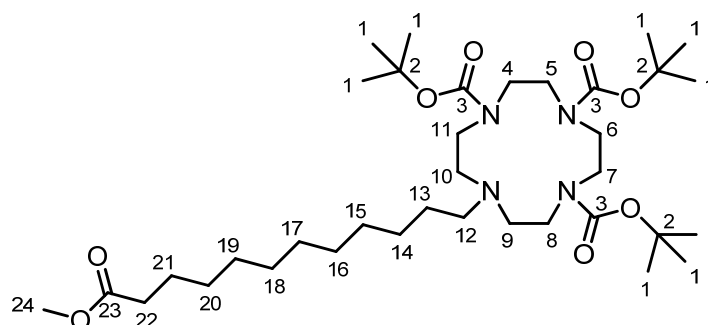


Abb. 163: ^{13}C -NMR-Spektrum der Linkers 82 (150.9 MHz, CDCl_3).

5.4.7. Synthese von 10-(12-Methoxy-12-oxododecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecan-1,4,7-tricarbonsäuretri-tert-butylester (83)



0.100 g Tris(*N*-Boc)-Cyclen **66** (0.21 mmol, 1.0 eq.) wurden in 15 mL Acetonitril gelöst. Darauffolgend wurden 0.310 g 12-Bromdodecansäuremethylester (**82**) (1.06 mmol, 5.0 eq.), 0.088 g Kaliumcarbonat (0.64 mmol, 3.0 eq.), 0.364 g 18-Krone-6 (1.38 mmol, 6.5 eq.) und 0.018 g Kaliumiodid (0.11 mol, 0.5 eq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde 48 h bei 80 °C gerührt, schließlich auf RT abgekühlt und filtriert. Letztlich wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) aufgereinigt. Es wurden 0.059 g (0.09 mol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 43%. **R_F:** 0.36 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.26-1.28** (m, 16H, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20), **1.43-1.51** (5s, 27H, H-1), **1.60-1.63** (m, 2H, H-21), **1.91** (m, 1H, H-12), **2.28-2.31** (t, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, H-22), **2.47-2.91** (3m, 4H, H-9, H-10), **3.24-3.56** (m, 12H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-11, H-12), **3.66** (s, 3H, H-24), **3.88** (m, 1H, H-12). **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **25.10** (C-21), **27.06** (C-14), **28.02** (C-13), **28.59/28.64/28.70** (C-1), **29.29/29.40/29.56/29.68/29.78/29.81** (C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20), **34.26** (C-22), **48.12/50.05** (C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11), **51.59** (C-24), **79.38/81.69** (C-2), **156.77** (C-3), **174.48** (C-23). **MS** (ESI): für C₃₆H₆₈N₄O₈Na: berechnet: 707.49, gefunden: 707.53.

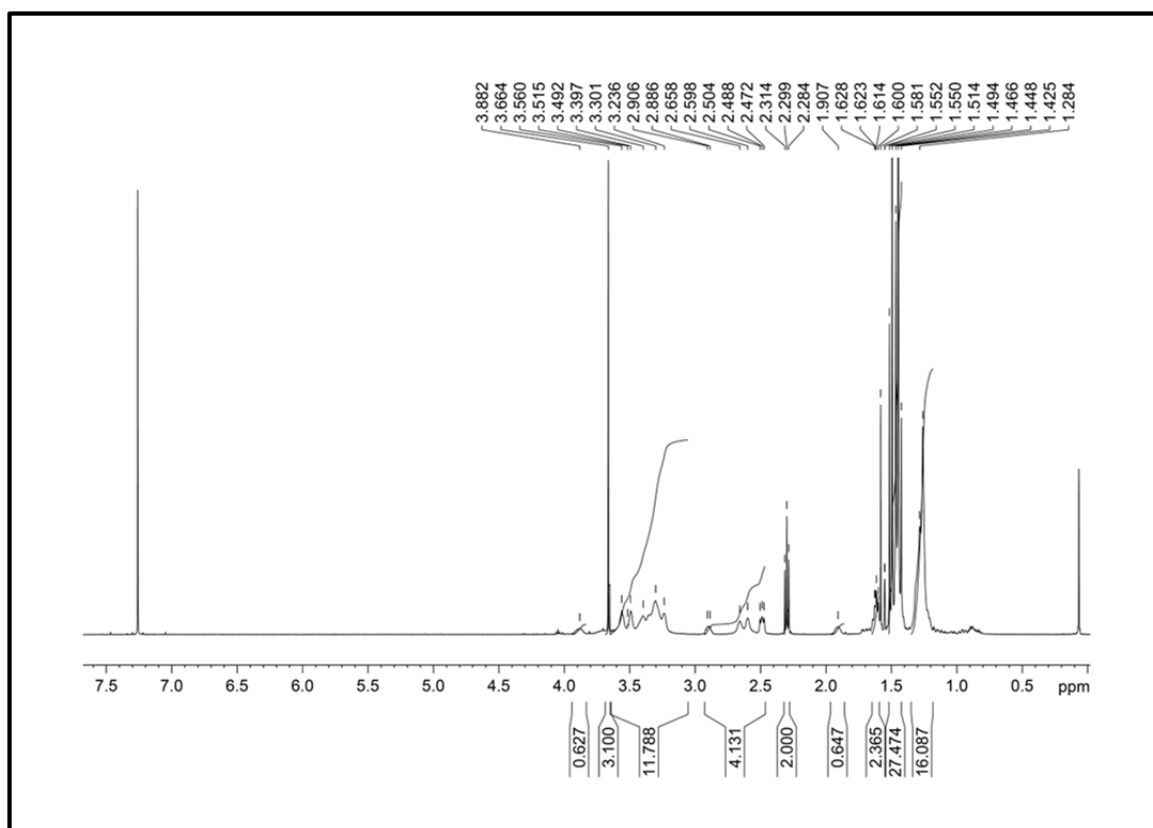


Abb. 164: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 83 (500 MHz, CDCl_3).

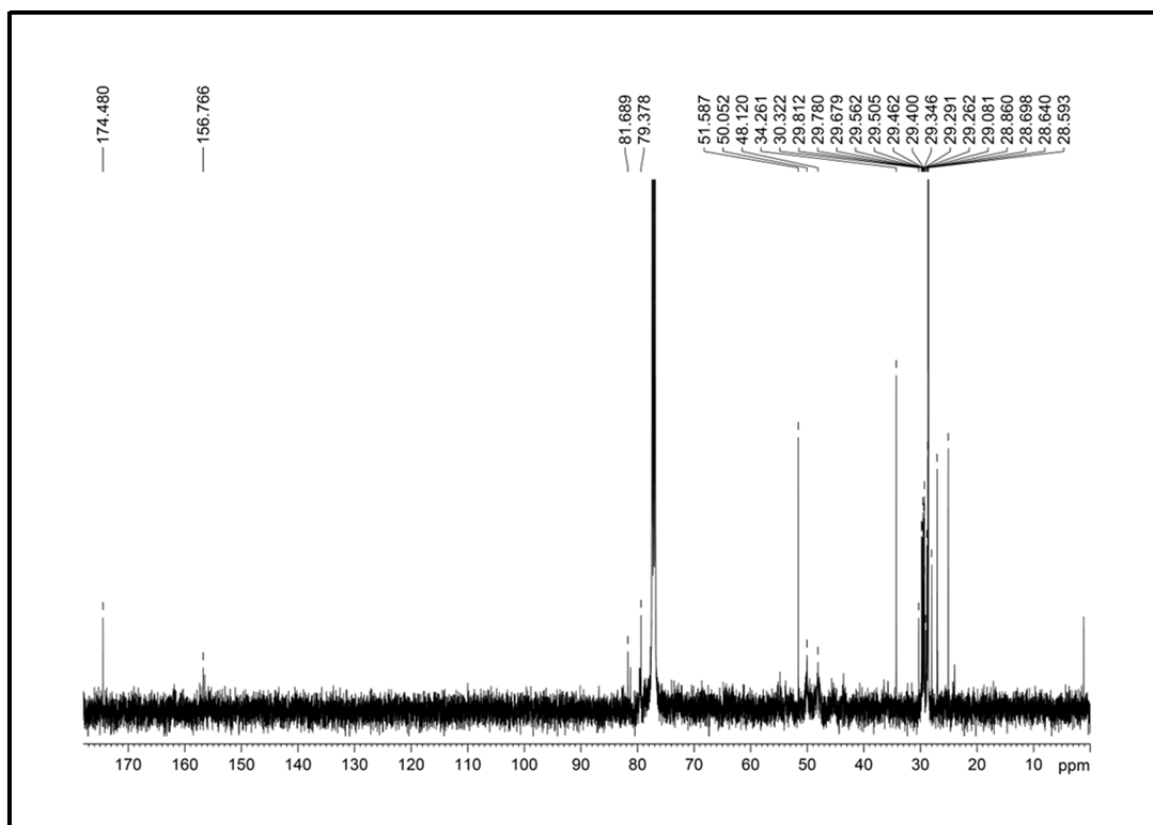
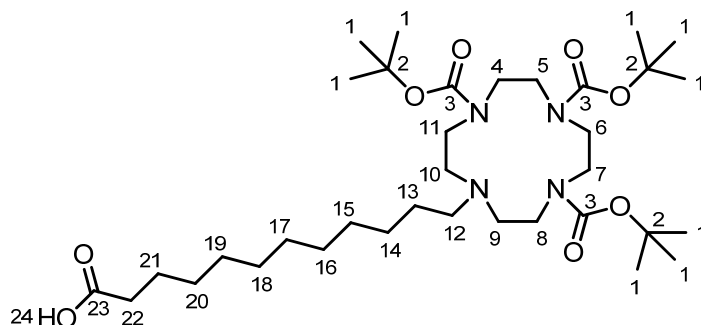


Abb. 165: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung 83 (125 MHz, CDCl_3).

5.4.8. Synthese von 12-(4,7,10-Tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecan-1-yl)dodecansäure (**84**)



54.10 mg 10-(12-Methoxy-12-oxododecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäuretri-*tert*-butylester (**83**) (0.08 mmol, 1.0 eq.) wurden in 15 mL Methanol gelöst. Anschließend wurden 9.90 mg LiOH · H₂O (0.24 mmol, 3.0 eq.) und 1 mL bi-dest. Wasser hinzugegeben und 18 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand in bi-dest. Wasser aufgenommen. Danach wurde die Lösung mit 1 M HCl auf pH 1 angesäuert und diese dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 41.20 mg (0.06 mmol) eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 75%. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.29-1.36** (m, 16H, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20), **1.53-1.56** (3s, 27H, H-1), **1.63-1.68** (m, 2H, H-21), **1.89.1.93** (m, 2H, H-9/H-10), **2.36-2.38** (t, ³J_{HH} = 7.3 Hz, 2H, H-22), **2.96-3.00** (m, 2H, H-9/H-10), **3.37-4.05** (3m, 14H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-11, H-12), **12.47** (bs, 1H, H-24). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **23.85** (C-21), **24.65** (C-14), **26.61** (C-13), **28.58/28.63** (C-1), **28.67/28.71/28.73/** (C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20), **33.79** (C-22), **45.37/48.49/50.05/50.28/53.57/54.86** (C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11), **81.27/81.74** (C-2), **156.57/156.76** (C-3), **176.85** (C-23). **MS** (ESI): für C₃₅H₆₇N₄O₈: berechnet: 671.50, gefunden: 671.56, für C₃₅H₆₆N₄O₈Na: berechnet: 693.48, gefunden: 693.56, für C₃₅H₆₅N₄O₈Na₂: berechnet: 715.46, gefunden: 715.53, für C₃₅H₆₅N₄O₈: berechnet: 669.48, gefunden: 669.64.

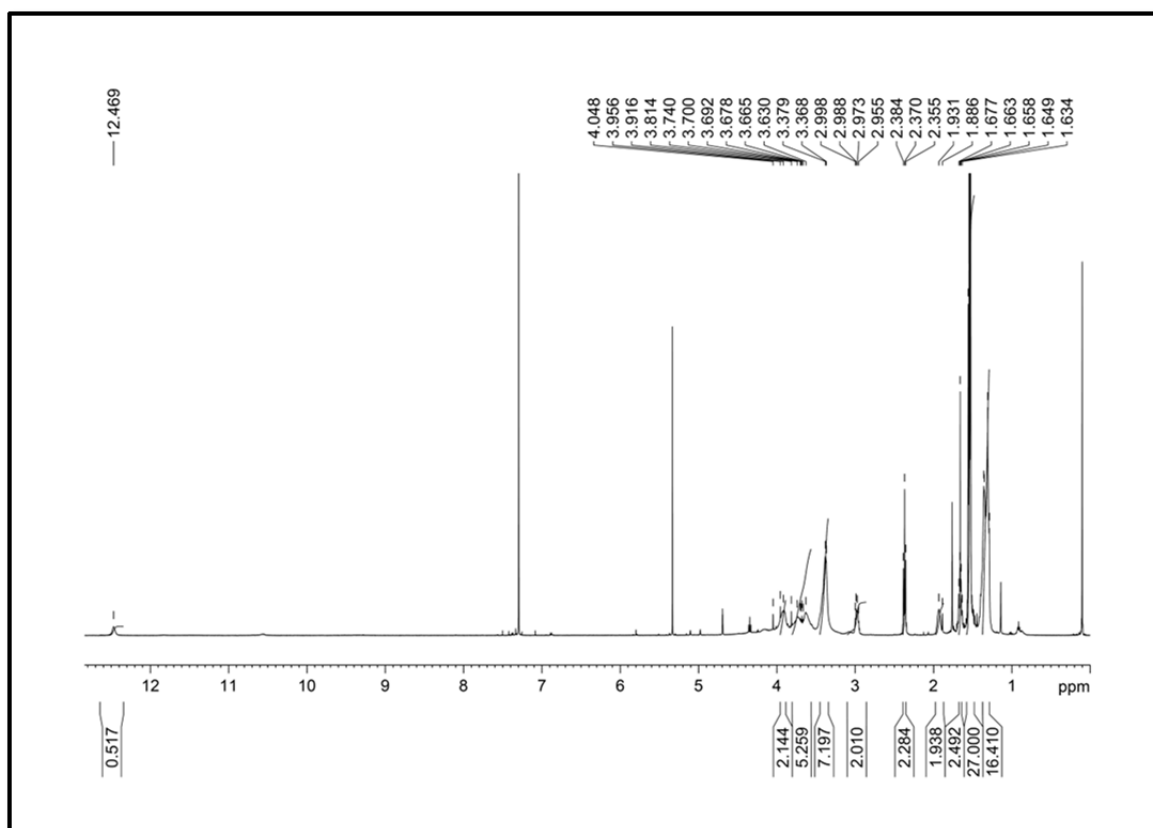


Abb. 166: ^1H -NMR-Spektrum der Säure 84 (500 MHz, CDCl_3).

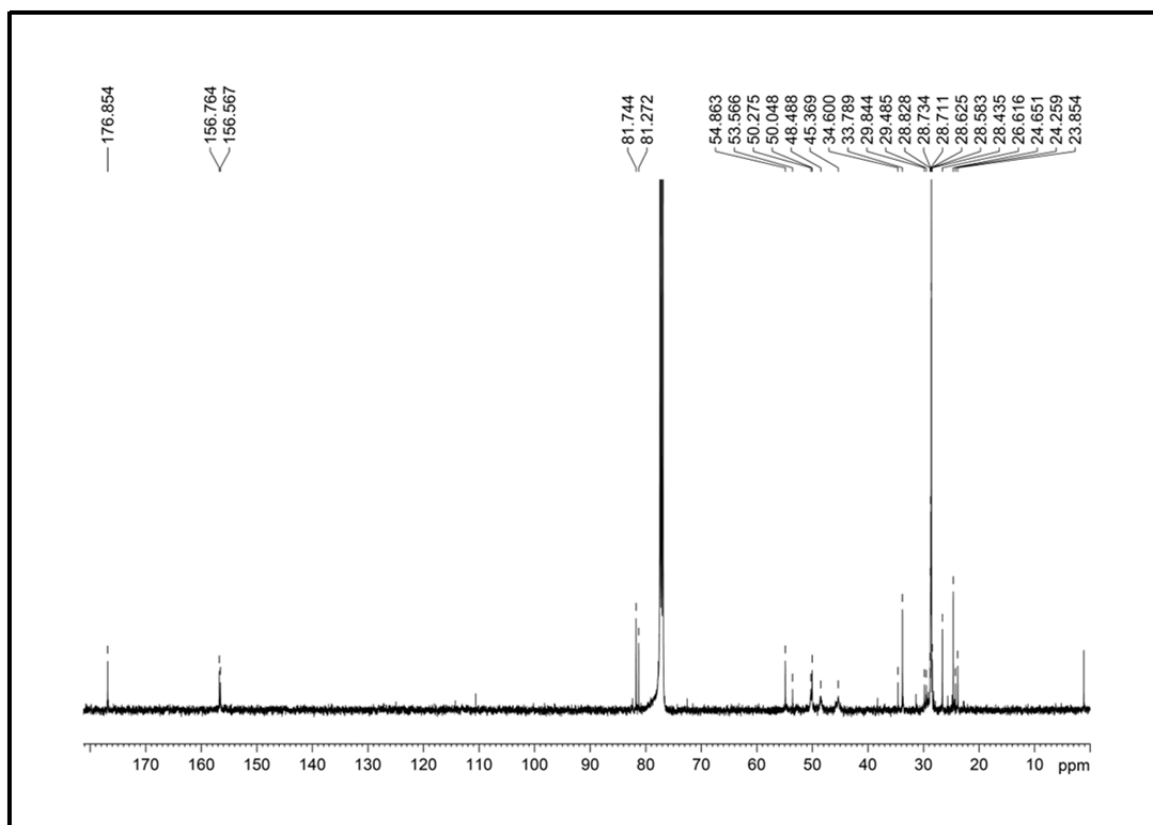
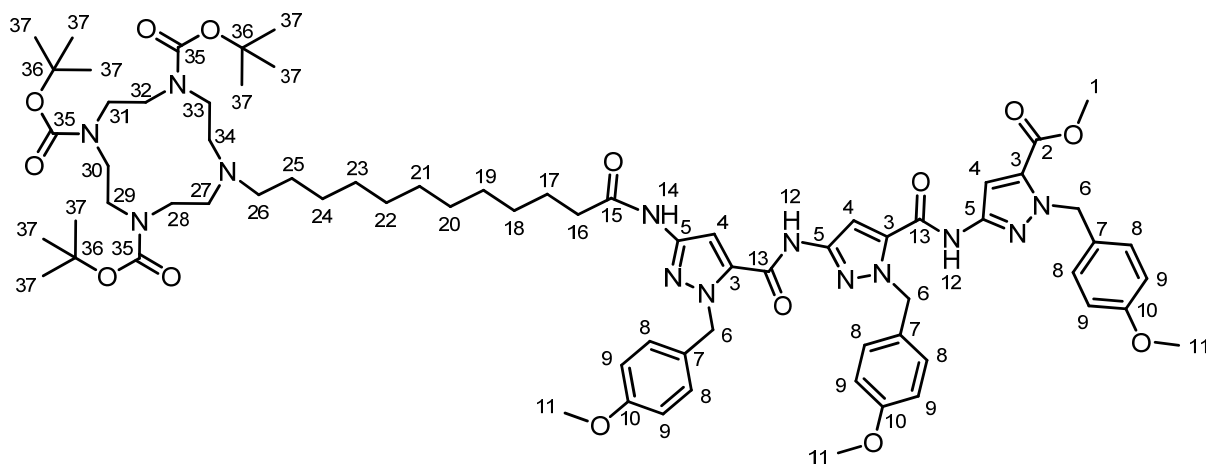


Abb. 167: ^{13}C -NMR-Spektrum der Säure 84 (125 MHz, CDCl_3).

5.4.9. Synthese von 10-(12-((1-(4-Methoxybenzyl)-5-((1-(4-methoxybenzyl)-5-((1-(4-methoxybenzyl)-5-(methoxycarbonyl)-1H-pyrazol-3-yl)carbamoyl)-1H-pyrazol-3-yl)carbamoyl)-1H-pyrazol-3-yl)amino)-12-oxododecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tricarbonsäuretri-*tert*-butylester (85)



Unter Argonatmosphäre wurden 39.9 mg Aminotrimer **36** (0.055 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL absolutem DMF gelöst, woraufhin 37.2 mg 12-(4,7,10-Tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecan-1-yl)dodecansäure (**84**) (0.055 mmol, 1.0 eq.), 21.3 mg EDCI (0.111 mmol, 2.0 eq.) und 16.9 mg DMAP (0.139 mmol, 2.5 eq.) hinzugegeben wurden. Anschließend wurde die Reaktionslösung 48 h bei RT gerührt, mit Ethylacetat versetzt und jeweils dreimal mit 1 M HCl und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) aufgereinigt. Es wurden 27.2 mg (0.020 mmol) eines farblosen Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 36%. **R_F:** 0.42 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.22-1.36** (m, 16H, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25), **1.45-1.53** (4s, 27H, H-37), **1.65-1.69** (m, 2H, H-17), **1.90** (m, 1H, H-26), **4.00-2.30-2.35** (quart, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2H, H-16), **2.47-2.65** (3m, 4H, H-27, H-34), **2.89-2.91** (m, 1H, H-26), **3.24-3.58** (m, 12H, H-28, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33), **3.75** (2s, 6H, H-11), **3.77** (s, 3H, H-11), **3.88** (s, 3H, H-1), **5.61** (s, 4H, H-6), **5.63** (s, 2H, H-6), **6.80-6.85** (m, 7H, H-8, H-9), **7.19-7.30** (m, 7H, H-4, H-8, H-9), **7.35** (s, 1H, H-4), **7.89-7.98**

(2s, 1H, H-14), **8.45-8.51** (3s, 2H, H-12). **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **23.91, 25.54, 26.85, 28.58, 28.63, 28.85, 28.94, 29.20, 29.23, 29.31, 29.42, 29.53, 29.62, 29.70, 29.75, 29.83, 37.18, 37.24, 45.36, 48.22, 50.04, 52.18, 53.93, 54.01, 54.16, 54.76, 55.37, 55.39, 81.24, 81.58, 98.65, 102.79, 114.11, 128.95, 129.08, 129.38, 129.41, 129.66, 132.24, 134.39, 134.54, 145.08, 145.18, 146.00, 156.51, 156.73, 156.77, 159.34, 159.42, 159.44, 160.06, 170.99**. **HRMS** (ESI): für C₇₂H₁₀₁N₁₃O₁₄Na: berechnet: 1394.7483, gefunden: 1394.7434.

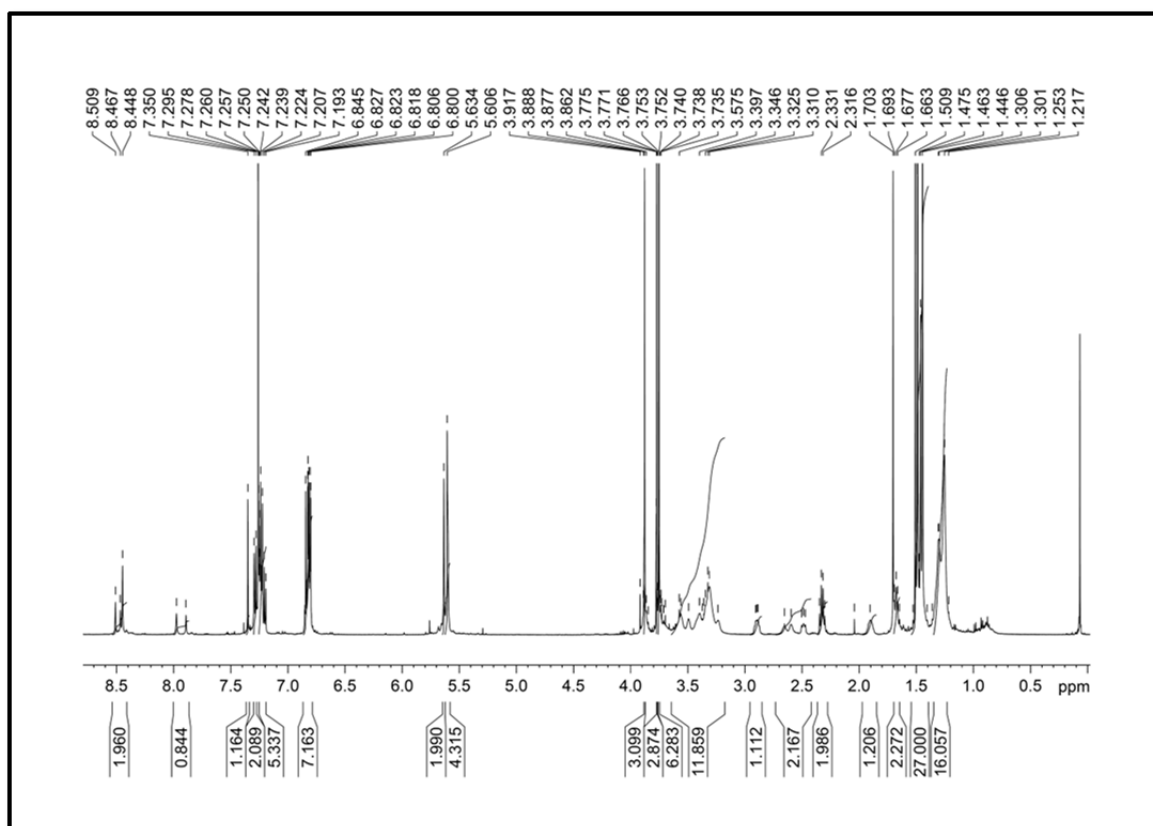


Abb. 168: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung 85 (500 MHz, CDCl_3).

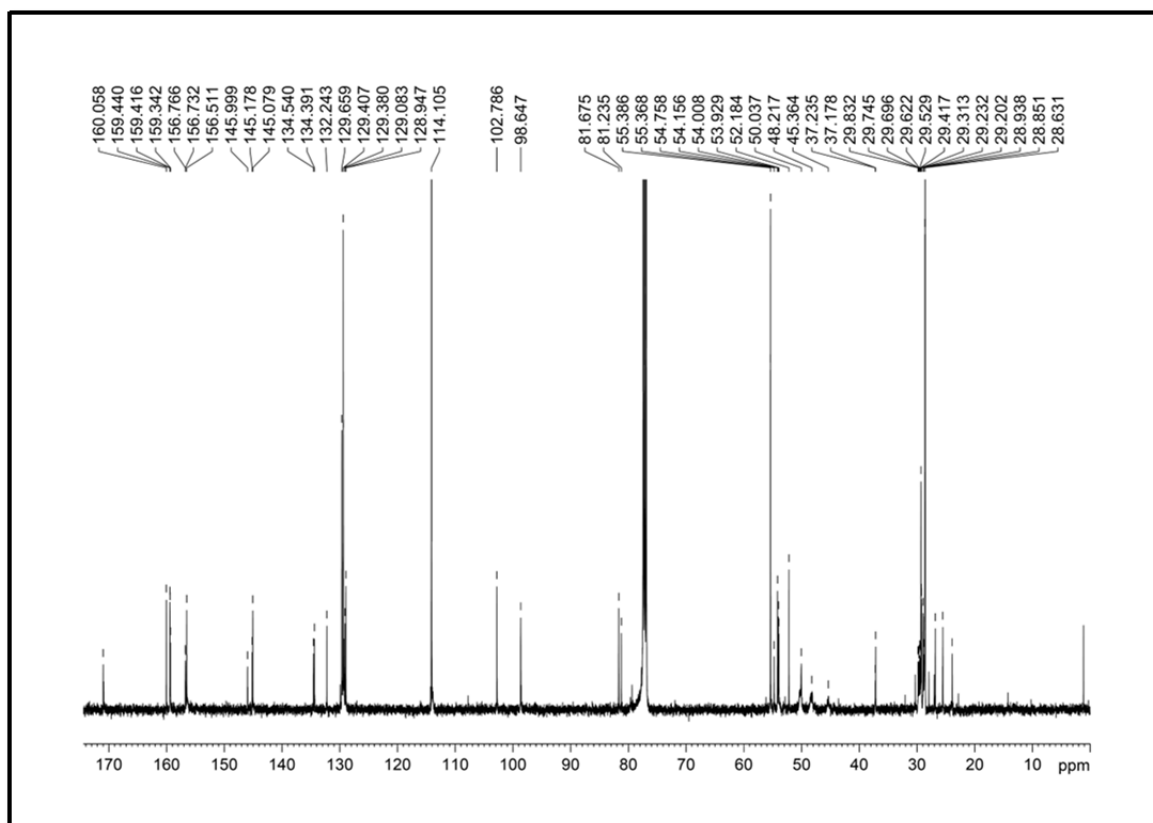
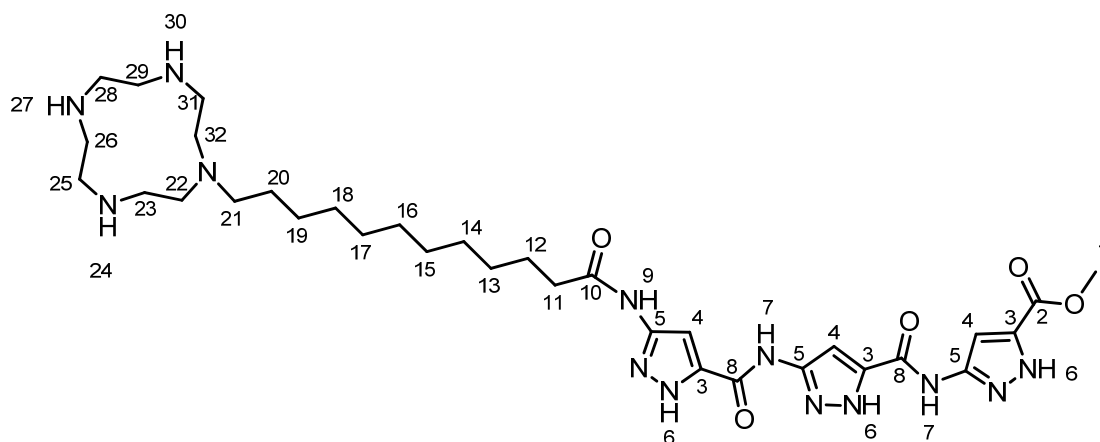


Abb. 169: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung 85 (125 MHz, CDCl_3).

5.4.10. Synthese von 5-(methoxycarbonyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)carbamoyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)carbamoyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)-12-oxododecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecan (86)



Unter Argonatmosphäre wurden 15.5 mg Trimer-Cyclen-Hybrid **85** (0.011 mmol, 1.0 eq.) in 3 mL absolutem TFA gelöst und in einem geschlossenen System 5 h bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde die erkaltete Reaktionslösung mit kaltem Diethylether versetzt, der ausfallende Feststoff zentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Danach wurde der Feststoff noch dreimal in kaltem Diethylether suspendiert, wieder abzentrifugiert und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 7.6 mg (0.007 mmol) eines weißen Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 64%. ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = **1.21-1.27** (m, 16H, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20), **1.40-1.45** (m, 2H, H-21), **1.58** (m, 2H, H-12), **2.29-2.32** (t, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2H, H-6), **2.73-2.80** (2m, 6H, H-23, H-25, H-26, H-28, H-29, H-31), **3.00-3.03** (m, 6H, H-23, H-25, H-26, H-28, H-29, H-31), **3.85** (s, 3H, H-1), **6.90-7.59** (2bs, 3H, H-4), **10.40-11.18** (3bs, 3H, H-7, H-9), **13.17-13.74** (3bs, 3H, H-6). **HPLC:** 98% (Retentionszeit: 28.0 min, RP 18 Säule, 214 nm Detektion, Flussrate: 1.0 mL/min, linearer Gradient 95-40% Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1% TFA in bidestilliertem Wasser, Eluent B: Acetonitril). **MS** (MALDI): für C₃₃H₅₄N₁₃O₅: berechnet: 712.44, gefunden: 712.32, für C₃₃H₅₃N₁₃O₅Na: berechnet: 734.42, gefunden: 734.31.

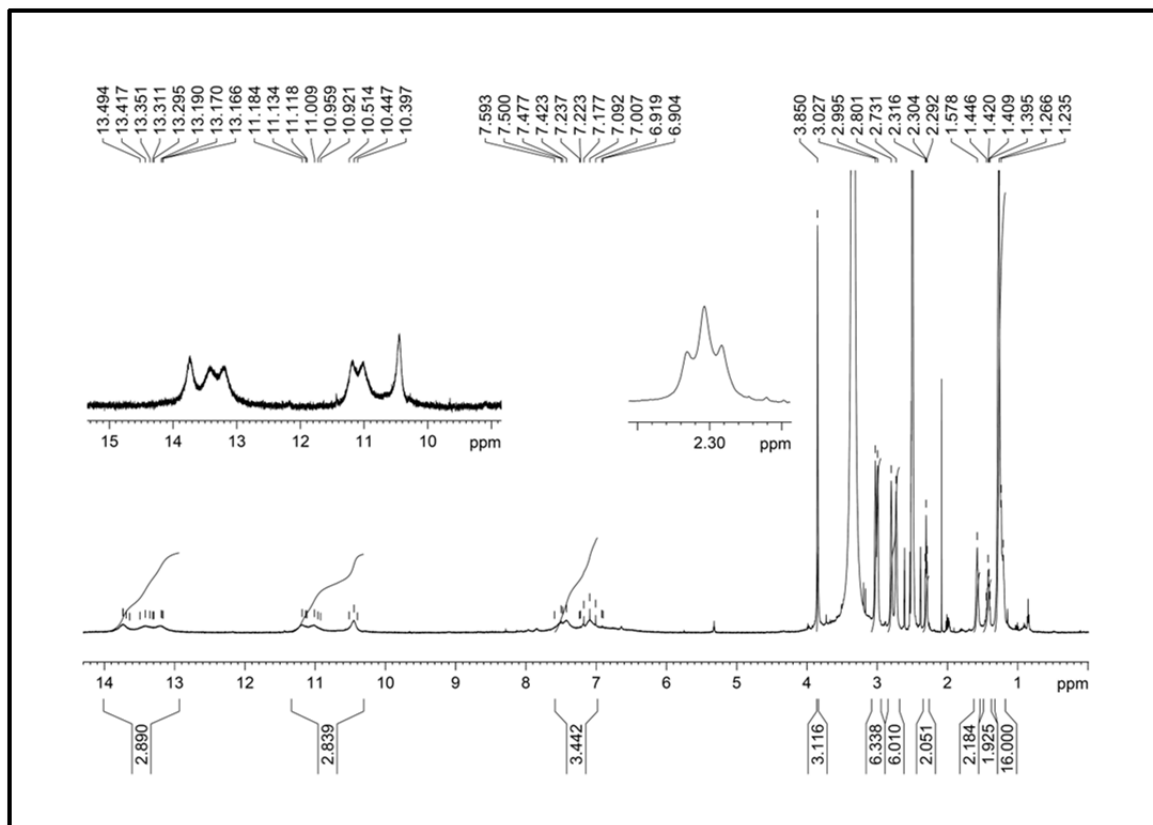
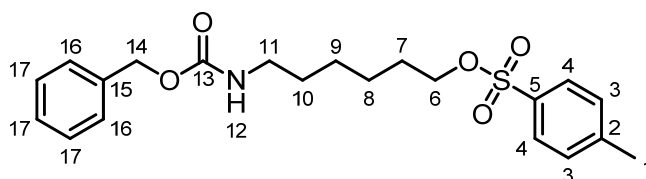


Abb. 170: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Zielverbindung 86 (600 MHz, DMSO-d_6).

5.4.11. Synthese von 6-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)hexyl-*p*-toluolsulfonat (**75**)

0.500 g 6-(Z-Amino)-1-hexanol (**74**) (1.99 mmol, 1.0 eq.) wurden in 20 mL Dichlormethan gelöst. Schließlich wurden 0.569 g Tosylchlorid (2.98 mmol, 1.5 eq.), 0.827 mL Triethylamin (5.969 mmol, 3.0 eq.) und 0.122 g 4-Dimethylaminopyridin (1.00 mmol, 0.5 eq.) hinzugegeben und 16 h bei RT gerührt. Darauffolgend wurde die Reaktionslösung zweimal mit 20 mL bidest. Wasser gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Letztlich wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1) aufgereinigt. Es wurden 0.688 g (1.70 mmol) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 85%. **R_F:** 0.24 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **1.26-1.34** (m, 4H, H-8, H-9), **1.44-1.46** (m, 2H, H-10), **1.62-1.64** (m, 2H, H-7), **2.44** (s, 3H, H-1), **3.13-3.16** (m, 2H, H-11), **4.00-4.02** (t, ³J_{HH} = 6.4 Hz, 2H, H-6), **4.72** (bs, 1H, H-12), **5.09** (s, 2H, H-14), **7.33-7.36** (m, 7H, H-3, H-4, H-17), **7.77-7.79** (d, 2H, H-16). **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **21.76** (C-1), **25.16/26.15** (C-8, C-9), **28.85** (C-7), **29.89** (C-10), **40.98** (C-11), **66.75** (C-14), **70.54** (C-6), **128.01/128.24/128.66/129.96** (C-3, C-4, C-16, C-17), **133.32** (C-2), **136.74** (C-15), **144.83** (C-5), **156.50** (C-13). **HRMS** (ESI): für C₂₁H₂₇NO₅SNa: berechnet: 428.1502, gefunden: 428.1517, für C₄₂H₅₄N₂O₁₀S₂Na: berechnet: 833.3112, gefunden: 833.3122.

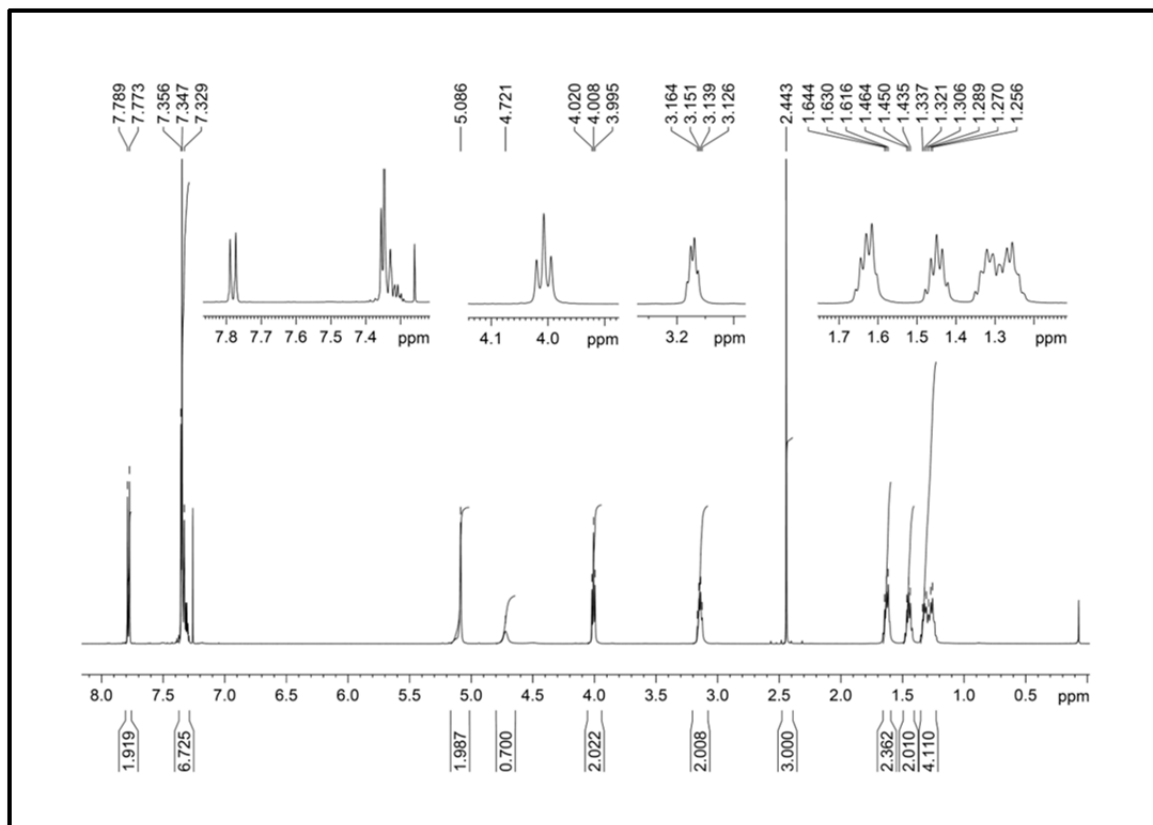


Abb. 171: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 75 (500 MHz, CDCl₃).

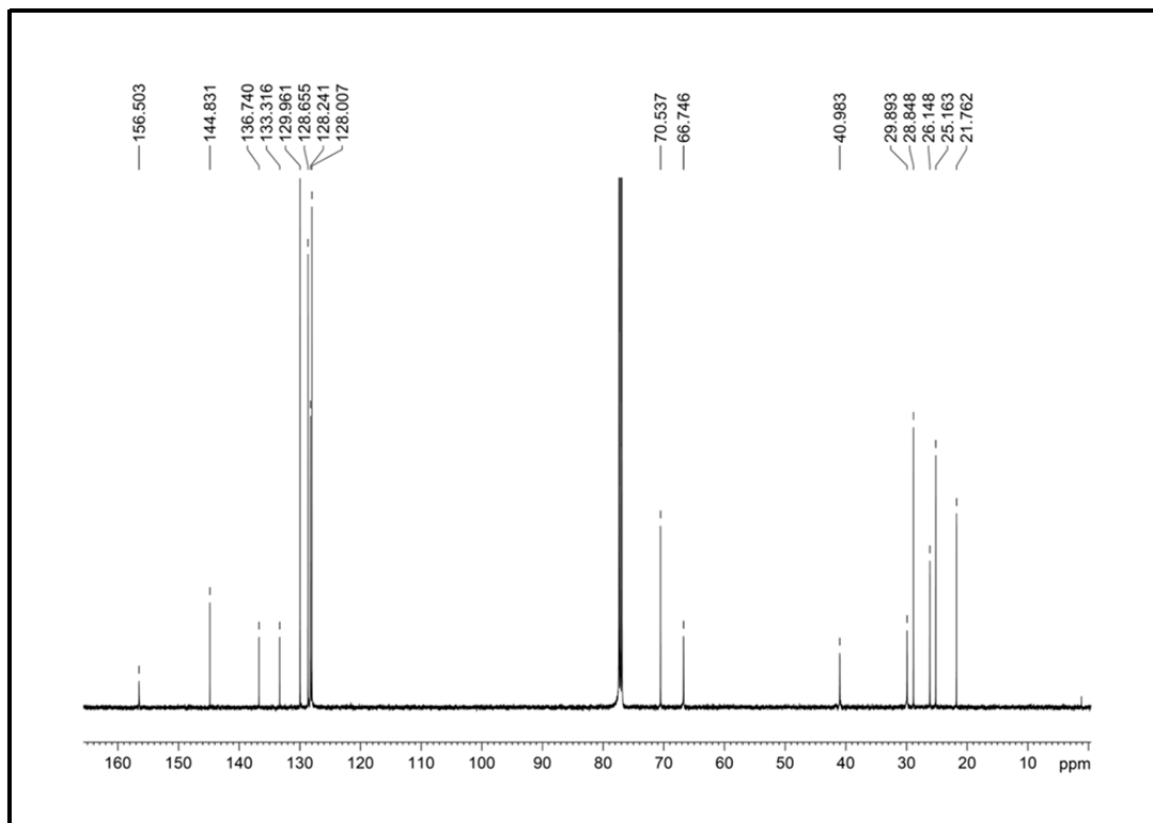
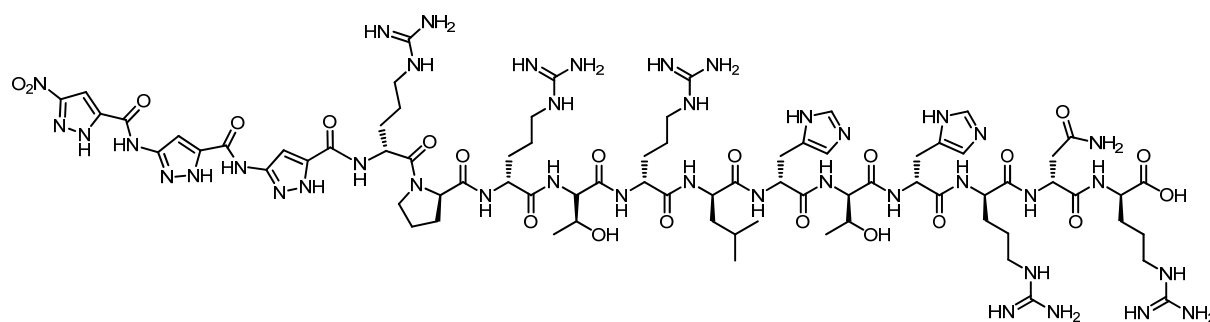


Abb. 172: ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung 75 (125.8 MHz, CDCl₃).

5.5. Manuelle Festphasensynthese von Trimer-Peptid Derivaten

Für die Synthese der Trimer-Peptid Derivate wurde stets das von Wöll über automatisierte Peptidfestphasensynthese hergestellte D3 Derivat mit *N*-terminal freier Aminogruppe verwendet und mit der Trimer-Säure **57** gekuppelt.

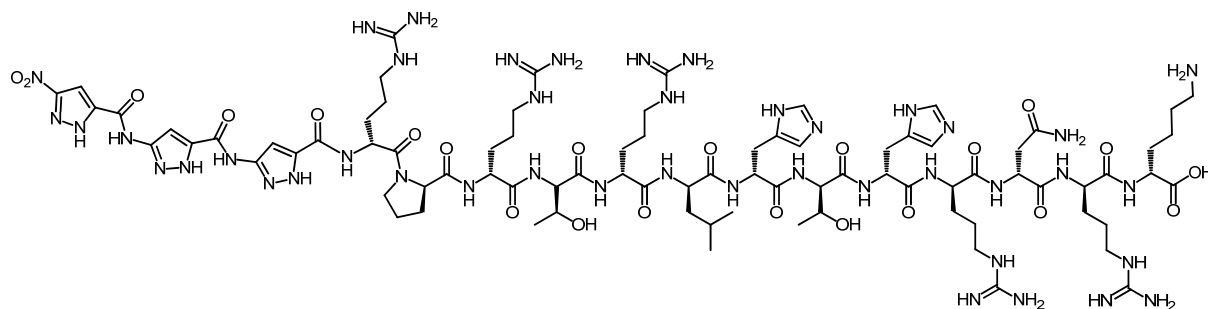
5.5.1. Darstellung von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-(*R*)-argininyl-(*R*)-prolinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-leucinyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-asparaginyl-(*R*)-arginin (**43**)



167.2 mg mit D3 beladenes Harz (0.036 mmol, 1.0 eq.) wurden mit 3 mL absolutem DMF versetzt und 2 h gequell. Anschließend wurden 40.0 mg Trimer-Säure **57** (0.054 mmol, 1.5 eq.), 45.0 mg HCTU (0.109 mol, 2.0 eq.) und 38.0 μ L DIEA (0.218 mmol, 4.0 eq.) hinzugegeben und 24 h bei RT geschüttelt. Der Kupplungsschritt wurde nochmals 10 min bei 65 °C und 8 Watt in der Mikrowelle durchgeführt. Dann wurde das Harz über eine Glasfritte abfiltriert und dieses nochmals mit circa 30 mL DMF und mit 30 mL Dichlormethan gewaschen. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde das Peptid vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz mit 3.72 mL TFA, 0.20 mL Triisopropylsilan und 0.08 mL bidestilliertem Wasser versetzt und 4 h bei RT geschüttelt. Dann wurde die Lösung filtriert und das Rohprodukt mit kaltem Diethylether gefällt. Das noch teilweise mit PMB-Schutzgruppen behaftete Peptid wurde schließlich unter Argonatmosphäre mit 4 mL trockener TFA 5 h bei 70 °C unter erhöhtem Druck gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Produkt fraktionierend mit kaltem Diethylether gefällt. Der ausgefallene Feststoff wurde je-

weils dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit 0.1% TFA in bidestilliertem Wasser aufgenommen und schließlich gefriergetrocknet. Dabei wurden zwei saubere Fraktionen erhalten. Die anderen Fraktionen beinhalteten sowohl das gewünschte Trimer-Hybrid als auch das ungekoppelte Peptid. Es wurden 23.9 mg (0.009 mmol) des gewünschten Produktes als siebenfaches TFA-Salz erhalten.

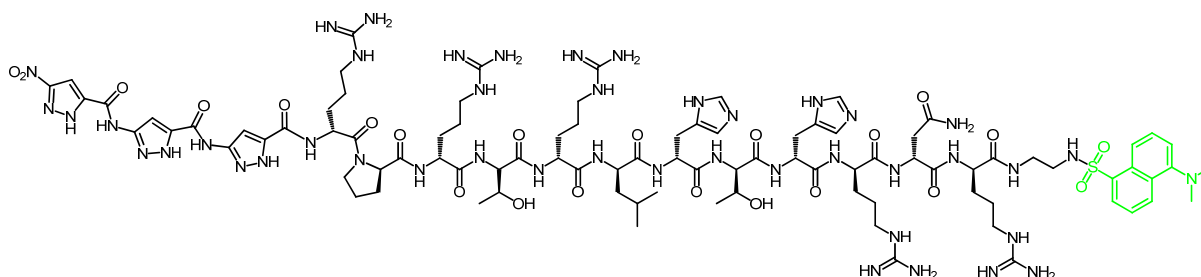
Ausbeute: 24% über drei Stufen, bezogen auf das eingesetzte Harz. **HPLC:** 98% (Retentionszeit: 18.8 min, RP 18 Säule, 214 nm Detektion, Flussrate: 1.0 mL/min, linearer Gradient 95-40% Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1% TFA in bidestilliertem Wasser, Eluent B: Acetonitril). **HRMS** (ESI): für $C_{77}H_{122}N_{41}O_{21}$: berechnet: 1956.9733, gefunden: 1956.9645.

5.5.2. Darstellung von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-(*R*)-argininyl-(*R*)-prolinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-leucinyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-asparaginyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-lysin (45)

259.6 mg mit D3-Lys beladenes Harz (0.05 mmol, 1.0 eq.) wurden mit 3 mL absolutem DMF versetzt und 2 h gequell. Anschließend wurden 55.0 mg Trimer-Säure **57** (0.075 mmol, 1.5 eq.), 61.9 mg HCTU (0.150 mol, 2.0 eq.) und 52.0 μ L DIEA (0.299 mmol, 4.0 eq.) hinzugegeben und 24 h bei RT geschüttelt. Der Kupplungsschritt wurde nochmals 10 min bei 65 °C und 8 Watt in der Mikrowelle durchgeführt. Dann wurde das Harz über eine Glasfritte abfiltriert und dieses nochmals mit circa 30 mL DMF und mit 30 mL Dichlormethan gewaschen. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde das Peptid vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz mit 3.72 mL TFA, 0.20 mL Triisopropylsilan und 0.08 mL bidestilliertem Wasser versetzt und 4 h bei RT geschüttelt. Dann wurde die Lösung filtriert und das Rohprodukt mit kaltem Diethylether gefällt. Das noch teilweise mit PMB-Schutzgruppen behaftete Peptid wurde schließlich unter Argonatmosphäre mit 4 mL trockener TFA 5 h bei 70 °C unter erhöhtem Druck gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Produkt fraktionierend mit kaltem Diethylether gefällt. Der ausgefallene Feststoff wurde jeweils dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit 0.1% TFA in bidestilliertem Wasser aufgenommen und schließlich gefriergetrocknet. Dabei wurden drei saubere Fraktionen erhalten. Die anderen Fraktionen beinhalteten sowohl das gewünschte Trimer-Hybrid als auch das ungekuppelte Peptid. Es wurden 18.2 mg (0.006 mmol) des gewünschten Produktes als achtfaches TFA-Salz erhalten.

Ausbeute: 12% über drei Stufen, bezogen auf das eingesetzte Harz. **HPLC:** 97-99% (Retentionszeit: 19.7 min, RP 18 Säule, 214 nm Detektion, Flussrate: 1.0 mL/min, linearer Gradient 95-40% Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1% TFA in bidestilliertem Wasser, Eluent B: Acetonitril). **HRMS (ESI):** für $C_{83}H_{136}N_{43}O_{22}$: berechnet: 696.0284, gefunden: 695.9625, für $C_{83}H_{137}N_{43}O_{22}$: berechnet: 522.2732, gefunden: 522.1936, für $C_{83}H_{138}N_{43}O_{22}$: berechnet: 418.0200, gefunden: 417.9236.

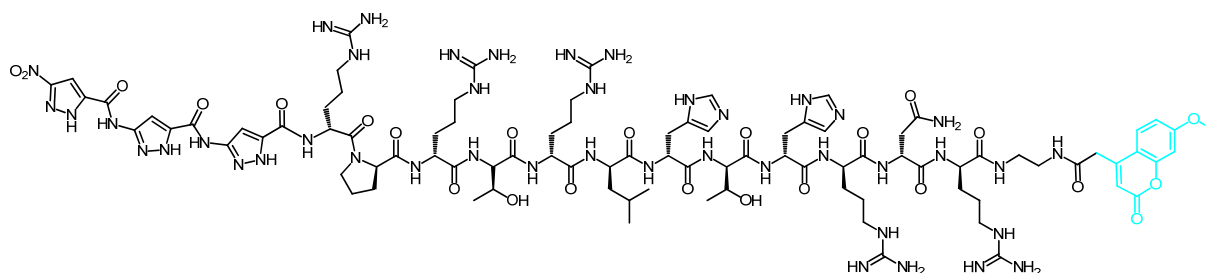
5.5.3. Darstellung von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-(*R*)-argininyl-(*R*)-prolinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-leucinyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-asparaginyl-(*R*)-argininyl-amidoethylenamino-dansyl (88)



252.3 mg mit D3-Dansyl beladenes Harz (0.050 mmol, 1.0 eq.) wurden mit 3 mL absolutem DMF versetzt und 2 h gequellt. Anschließend wurden 55.0 mg Trimer-Säure **57** (0.075 mmol, 1.5 eq.), 92.8 mg HCTU (0.224 mol, 3.0 eq.) und 65.0 μ L DIEA (0.374 mmol, 5.0 eq.) hinzugegeben und 24 h bei RT geschüttelt. Der Kupplungsschritt wurde nochmals 10 min bei 65 °C und 8 Watt in der Mikrowelle durchgeführt. Dann wurde das Harz über eine Glasfritte abfiltriert und dieses nochmals mit circa 30 mL DMF und mit 30 mL Dichlormethan gewaschen. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde das Peptid vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz mit 3.72 mL TFA, 0.20 mL Triisopropylsilan und 0.08 mL bidestilliertem Wasser versetzt und 4 h bei RT geschüttelt. Dann wurde die Lösung filtriert und das Rohprodukt mit kaltem Diethylether gefällt. Das noch teilweise mit PMB-Schutzgruppen behaftete Peptid wurde schließlich unter Argonatmosphäre mit 4 mL trockener TFA 5 h bei 70 °C unter erhöhtem Druck gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Produkt fraktionierend mit kaltem Diethylether gefällt. Der ausgefallene Feststoff wurde jeweils dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit 0.1% TFA in bidestilliertem Wasser aufgenommen und schließlich gefriergetrocknet. Dabei wurden drei saubere Fraktionen erhalten. Die anderen Fraktionen beinhalteten sowohl das gewünschte Trimer-Hybrid als auch das ungekuppelte Peptid. Es wurden 48.2 mg (0.016 mmol) des gewünschten Produktes als siebenfaches TFA-Salz erhalten.

Ausbeute: 32% über drei Stufen, bezogen auf das eingesetzte Harz. **HPLC:** 97-99% (Retentionszeit: 20.8 min, RP 18 Säule, 214 nm Detektion, Flussrate: 1.0 mL/min, linearer Gradient 95-40% Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1% TFA in bidestilliertem Wasser, Eluent B: Acetonitril). **HRMS (ESI):** für $C_{91}H_{140}N_{44}O_{22}S$: berechnet: 1117.0462, gefunden: 1117.0275, für $C_{91}H_{141}N_{44}O_{22}S$: berechnet: 745.0332, gefunden: 745.0335, für $C_{91}H_{142}N_{44}O_{22}S$: berechnet: 559.0267, gefunden: 559.0341, für $C_{91}H_{143}N_{44}O_{22}S$: berechnet: 447.4228, gefunden: 447.4300.

5.5.4. Darstellung von 3-(3-(3-Nitro-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido)-1*H*-pyrazol-5-carboxamido-(*R*)-argininyl-(*R*)-prolinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-leucinyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-threoninyl-(*R*)-histidinyl-(*R*)-argininyl-(*R*)-asparaginyl-(*R*)-argininyl-amidoethylenamino-coumarin (89)



330.1 mg mit D3-Coumarin beladenes Harz (0.05 mmol, 1.0 eq.) wurden mit 3 mL absolutem DMF versetzt und 2 h gequell. Anschließend wurden 55.0 mg Trimer-Säure **57** (0.075 mmol, 1.5 eq.), 92.8 mg HCTU (0.224 mol, 3.0 eq.) und 65.0 µL DIEA (0.374 mmol, 5.0 eq.) hinzugegeben und 24 h bei RT geschüttelt. Der Kuppelungsschritt wurde nochmals 10 min bei 65 °C und 8 Watt in der Mikrowelle durchgeführt. Dann wurde das Harz über eine Glasfritte abfiltriert und dieses nochmals mit circa 30 mL DMF und mit 30 mL Dichlormethan gewaschen. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde das Peptid vom Harz abgespalten. Dazu wurde das Harz mit 3.72 mL TFA, 0.20 mL Triisopropylsilan und 0.08 mL bidestilliertem Wasser versetzt und 4 h bei RT geschüttelt. Dann wurde die Lösung filtriert und das Rohprodukt mit kaltem Diethylether gefällt. Das noch teilweise mit PMB-Schutzgruppen behaftete Peptid wurde schließlich unter Argonatmosphäre mit 4 mL trockener TFA 5 h bei 70 °C unter erhöhtem Druck gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Produkt fraktionierend mit kaltem Diethylether gefällt. Der ausgefallene Feststoff wurde jeweils dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit 0.1% TFA in bidestilliertem Wasser aufgenommen und schließlich gefriergetrocknet. Dabei wurden vier saubere Fraktionen erhalten. Die anderen Fraktionen beinhalteten sowohl das gewünschte Trimer-Hybrid als auch das ungekuppelte Peptid. Es wurden 53.7 mg (0.018 mmol) des gewünschten Produktes als siebenfaches TFA-Salz erhalten.

Ausbeute: 36% über drei Stufen, bezogen auf das eingesetzte Harz. **HPLC:** 92-98% (Retentionszeit: 20.7 min, RP 18 Säule, 214 nm Detektion, Flussrate: 1.0 mL/min, linearer Gradient 95-40% Eluent A in 30 min, Eluent A: 0.1% TFA in bidestilliertem Wasser, Eluent B: Acetonitril). **HRMS (ESI):** für $C_{91}H_{138}N_{43}O_{24}$: berechnet: 739.3636, gefunden: 739.3639, für $C_{91}H_{139}N_{43}O_{24}$: berechnet: 554.7745, gefunden: 554.7777, für $C_{91}H_{140}N_{43}O_{24}$: berechnet: 444.0211, gefunden: 444.0246, für $C_{91}H_{141}N_{43}O_{24}$: berechnet: 370.1855, gefunden: 370.0233.

5.6. UV/Vis-Spektroskopie

Für die UV/Vis-Messungen wurden 480 μL einer Probe des Liganden, welche dieselbe Zusammensetzung wie bei den ThT-Tests aufwies, verwendet (Abschnitt 5.7). Die Messung erfolgte jeweils einmal vor und nach Zentrifugation (20 min, 13400 g) in einer Glasküvette bei 25 °C und einem Wellenlängenbereich von 200-500 nm. Die Ligandenstammlösungen wurden je nach Löslichkeit in bidestilliertem Wasser oder DMSO angesetzt. Trimer-D3 **43**, Trimer-GABA-D1 **41**, Trimer-TEG-D1 **44** und Trimer-TEG-TEG-D1 **42** waren jeweils wasserlöslich. Die Stammlösungen von Trimer-GABA-OH **39**, Aminotrimer **38** und Trimer-Diamin **40** wurden jeweils in DMSO angesetzt. Die Zusammensetzungen der Proben für 60 μM Ligand sind Tab. 10 zu entnehmen.

Tab. 10: Zusammensetzung der Proben für UV/Vis-Messungen.

	Ligand- Stammlsg. 600 μM [μL]	DMSO [μL]	H ₂ O _{bidest.} [μL]	10x PBS [μL]
Probe	48 \Rightarrow 60 μM	16	368	48
Puffer	—	16	416	48

Zur Ermittlung der aktiven Konzentrationen der Liganden nach Zentrifugation wurden anschließend Konzentrationsreihen angesetzt. Dabei wurden von derselben Stammlösung unterschiedliche Volumina entnommen und mit der Menge an bidestilliertem Wasser ausgeglichen. Die angesetzten Endkonzentrationen waren 90.0 μM , 75.0 μM , 60.0 μM , 45.0 μM , 30.0 μM , 15.0 μM und 7.5 μM . In den Abbildungen sind Spektren der 60 μM Ligand-Lösung, der zentrifugierten Lösung und des reinen Puffers für den direkten Vergleich dargestellt. Außerdem sind Spektren der Konzentrationsreihen im Vergleich mit dem reinen Puffer gezeigt (Abbildungen 173-175).

Für die Lambert-Beer-Quantifizierung wurden die Absorptionswerte bei 260 nm gewählt. Über lineare Regression konnte die aktive Konzentration ermittelt werden.

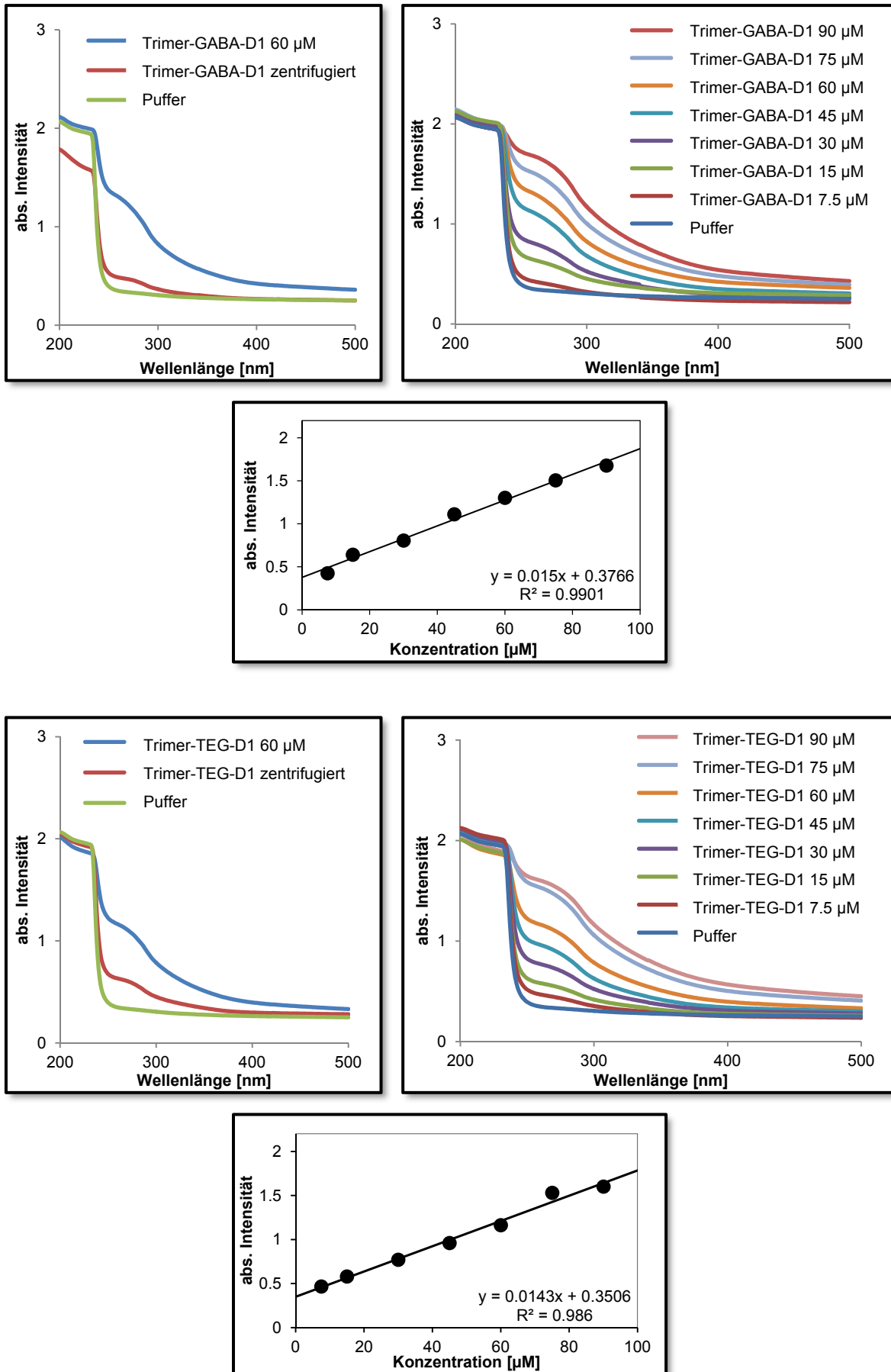


Abb. 173: UV/Vis-Spektren und lineare Regression der Verbindungen 41 und 44.

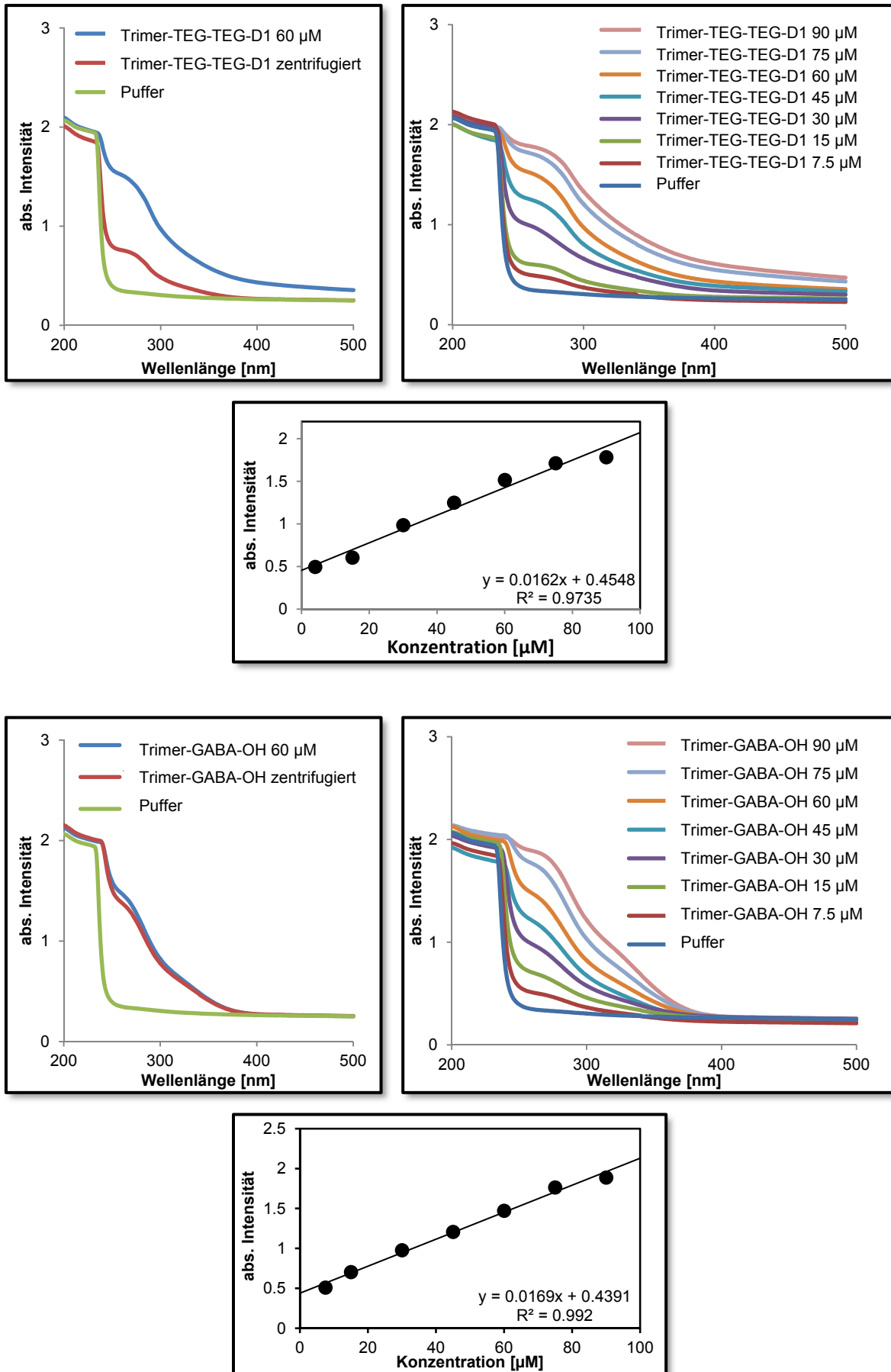


Abb. 174: UV/Vis-Spektren und lineare Regression der Verbindungen 42 und 39.

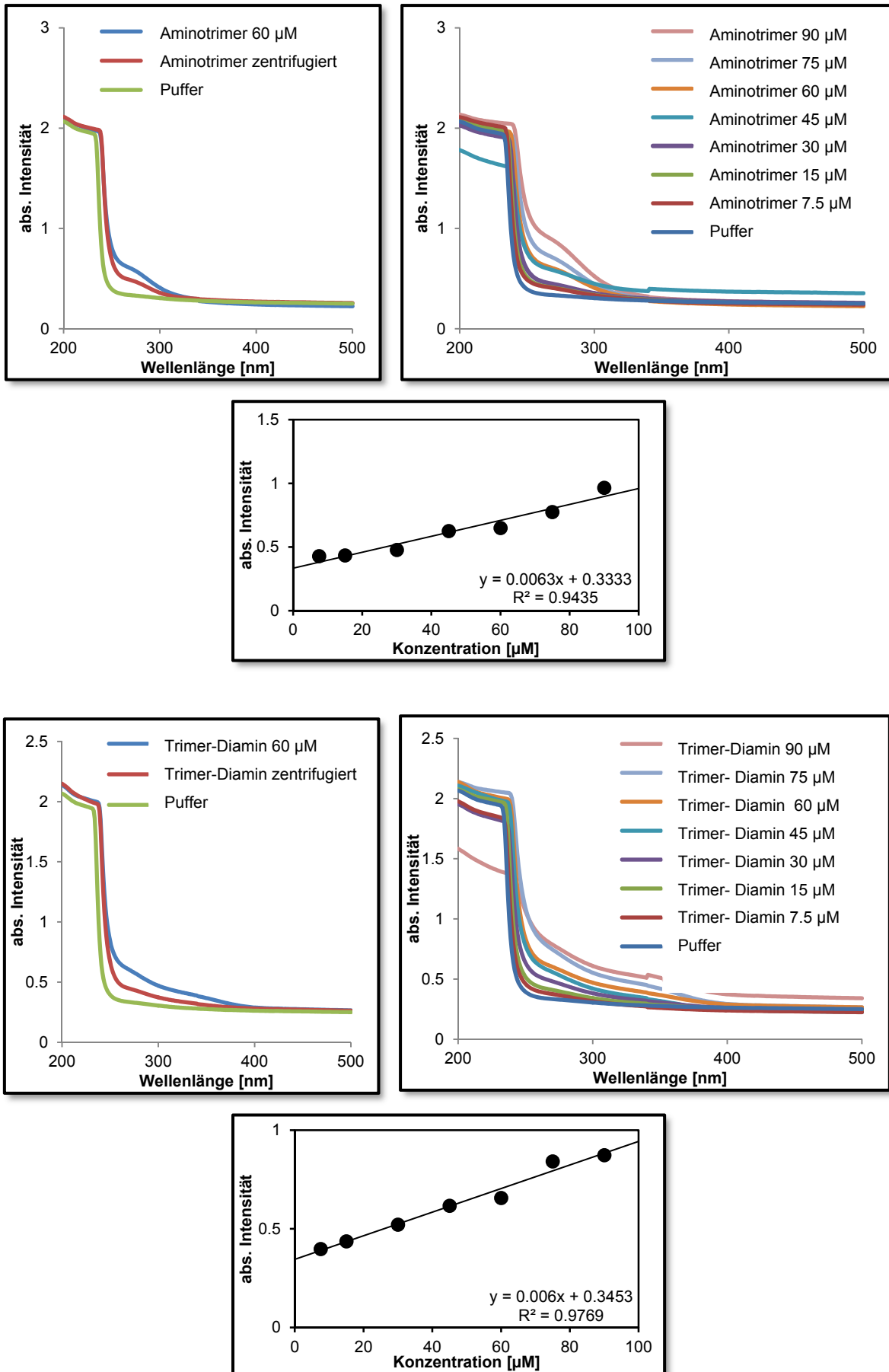


Abb. 175: UV/Vis-Spektren und lineare Regression der Verbindungen 38 und 40.

5.7. ThT-Fluoreszenzmessungen

1 mg A β (1-42) wurde über Nacht in 300 μ L HFIP monomerisiert und schließlich lyophilisiert. Anschließend wurde aus dem lyophilisierten A β eine 300 μ M Stammlösung in DMSO angesetzt. Ebenfalls wurden eine 62.7 μ M Stammlösung von Thioflavin T in bidestilliertem Wasser, sowie eine 1.50 mM Stammlösung der Liganden in bidestilliertem Wasser oder DMSO hergestellt. Trimer-D3 **43**, Trimer-GABA-D1 **41**, Trimer-TEG-D1 **44**, Trimer-TEG-TEG-D1 **42**, Trimer-D3-Lys **45** und Trimer-tris(NTA)-Cyclam **62** waren jeweils wasserlöslich. Die Stammlösungen von Trimer-GABA-OH **39**, Aminotrimer **38**, Trimer-Diamin **40** Trimer-dodecyl-Cyclen **86**, Trimer-D3-Dansyl **88** und Trimer-D3-Coumarin **89** wurden jeweils in DMSO angesetzt. Der sechsfache Überschuss an Ligand war für anfängliche Messungen zunächst der Standard. Es wurden Proben angesetzt, welche nur A β enthielten und als Kontrolllösungen dienten. Ebenfalls wurden Lösungen von A β mit den Liganden hergestellt sowie Proben zur Überprüfung der Eigenfluoreszenz des Liganden ohne Peptid sowohl mit als auch ohne ThT angesetzt. Die Liganden alleine zeigten jeweils keine Eigenfluoreszenz im gemessenen Wellenlängenbereich und keine Wechselwirkungen mit ThT. Tab. 10 zeigt die einzelnen Zusammensetzungen der Ansätze.

Tab. 11: Zusammensetzung und Endkonzentrationen der Inhibierungsansätze.

	A β - Stammlsg. 300 μ M [μ L]	Ligand- Stammlsg. 1.50 mM [μ L]	DMSO [μ L]	H ₂ O _{bidest.} [μ L]	10x PBS [μ L]	ThT- Stammlsg. 62.7 μ M [μ L]
Kontrollsg.	2.0 \Rightarrow 10 μ M	—	—	49.1	6.0	2.9 \Rightarrow 3.03 μ M
A β + Ligand	2.0 \Rightarrow 10 μ M	2.4 \Rightarrow 60 μ M	—	46.7	6.0	2.9 \Rightarrow 3.03 μ M
Ligand allein	—	2.4 \Rightarrow 60 μ M	2.0	49.6	6.0	—
Ligand + ThT	—	2.4 \Rightarrow 60 μ M	2.0	46.7	6.0	2.9 \Rightarrow 3.03 μ M

Die angesetzten Lösungen wurden dann 5 d bei 37 °C und 650 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben 7 s bei 13.4 rpm zentrifugiert und diese direkt in eine 384er Mikrotiterplatte überführt und letztlich bei 37 °C, einer Excitationswellenlänge von 446 nm und einer Emissionswellenlänge von 490 nm vermessen, wobei die Proben nach dem Temperieren vorerst noch für 30 s orbital geschüttelt wurden. Die ma-

nuelle Verstärkung betrug 100%. Es wurden drei Messungen mit jeweiliger Vierfachbestimmung durchgeführt. Die zu analysierenden Proben ohne A β (1-42) wurden ohne Inkubationszeit direkt vermessen. Ebenfalls wurden leere Nöpfchen der Mikrotiterplatten vermessen und von den gemessenen Werten im Mittel abgezogen.

Für die Herstellung der Lösungen mit den bestimmten aktiven Konzentrationen wurden stets 25fach höhere Konzentrationen als Stammlösungen hergestellt.

Für die Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden folgende Ligand-Stammlösungen angesetzt: 1.50 mM, 750.00 μ M, 250.00 μ M, 125.00 μ M, 50.00 μ M, 12.50 μ M und 6.25 μ M. Unter denselben Bedingungen wie oben beschrieben wurden dann ThT-Assays durchgeführt. Die Ligandkonzentrationen waren dann 60.00 μ M, 30.00 μ M, 10.00 μ M, 5.00 μ M, 2.00 μ M, 0.50 μ M und 0.25 μ M bezogen auf 10 μ M A β (1-42). Die Ergebnisse wurden schließlich zu einem Graphen (relative Fluoreszenz gegen die Ligandkonzentration in logarithmischer Auftragung) zusammengetragen, wobei 100% bei 0.001 μ M mit einbezogen wurden. Die erhaltenen Punkte wurden letztlich mit einer sigmoidalen Funktion angepasst. Die IC₅₀-Werte wurden bei 50% relativer Fluoreszenzintensität am Graphen abgelesen. Beim Einsatz von Trimer-Diamin **40** wurde kein IC₅₀-Wert bestimmt, da bei circa 40% relativer Fluoreszenzintensität ein Plateau erreicht wurde (Abb. 56).

5.8. CD-Spektroskopie

Für die Messungen von CD-Spektren wurden im Allgemeinen Lösungen verwendet, welche das A β (1-42)-Peptid alleine, A β (1-42)-Peptid mit Liganden und die Liganden alleine enthielten. Die Stammlösung von 500 μ M A β (1-42) wurde in HFIP hergestellt, nachdem A β (1-42) monomerisiert und lyophilisiert worden war. Die Stammlösungen der Liganden Trimer-D3 **43**, Trimer-TEG-TEG-D1 **42** und Trimer-tris(NTA)-Cyclam **62** wurden in bidestilliertem Wasser hergestellt. Die Lösungen der Liganden Trimer-Diamin **40** und Trimer-dodecyl-Cyclen **86** wurden in HFIP präpariert. Der verwendete Puffer war 10 mM KaPi mit einem pH-Wert von 7.0. Die verwendeten Zusammensetzungen sind in Tab. 12 gezeigt.

Tab. 12: Zusammensetzung und Endkonzentrationen der Inhibierungsansätze.

	KaPi 10 mM [μ L]	A β -Stammlsg. 500 μ M [μ L]	Ligand in HFIP/H ₂ O 250/500 μ M [μ L]	HFIP [μ L]
A β (1-42) alleine	980	20	—	—
A β (1-42) + Ligand	960	20	20	—
Ligand alleine	960	—	20	20

Die Endkonzentrationen beliefen sich für A β (1-42) auf 10 μ M, für Trimer-D3 **43**, Trimer-TEG-TEG-D1 **42** und Trimer-Diamin **40** auf 5 μ M und für Trimer-dodecyl-Cyclen **86** auf 10 μ M. Die Proben wurden insgesamt 4 d bei 25 °C und 850 rpm inkubiert. Nach 0 h, 1 h, 1 d, 2 d, 3 d und 4 d wurden die Proben jeweils vermessen. Die Lösungen mit den Liganden alleine wurden ohne Inkubation direkt nach dem Ansetzen vermessen (Abb. 57, 58, 80, 104).

Die Inkubation mit 10 μ M Trimer-tris(NTA)-Cyclam **62** ergab zu konzentrierte Messergebnisse, wohingegen zwischen 200 und 230 nm keine gut erkennbaren Kurvenverläufe zu erkennen waren. Somit wurde in diesem Fall 5 μ M A β (1-42) mit 5 μ M Trimer-tris(NTA)-Cyclam **62** vermessen. Jeweils wurden die Spektren für die Liganden alleine von den Spektren mit A β (1-42) und Ligand subtrahiert. Die CD-Spektren der Liganden alleine sind in Abb. 176-178 dargestellt.

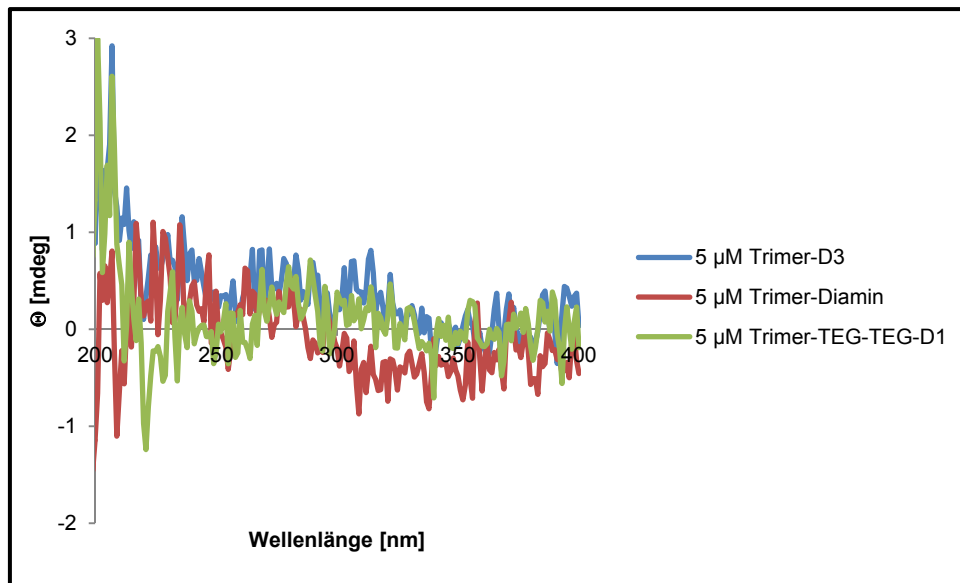


Abb. 176: CD-Spektren der Liganden Trimer-D3 43, Trimer-Diamin 40 und Trimer-TEG-TEG-D1 42.

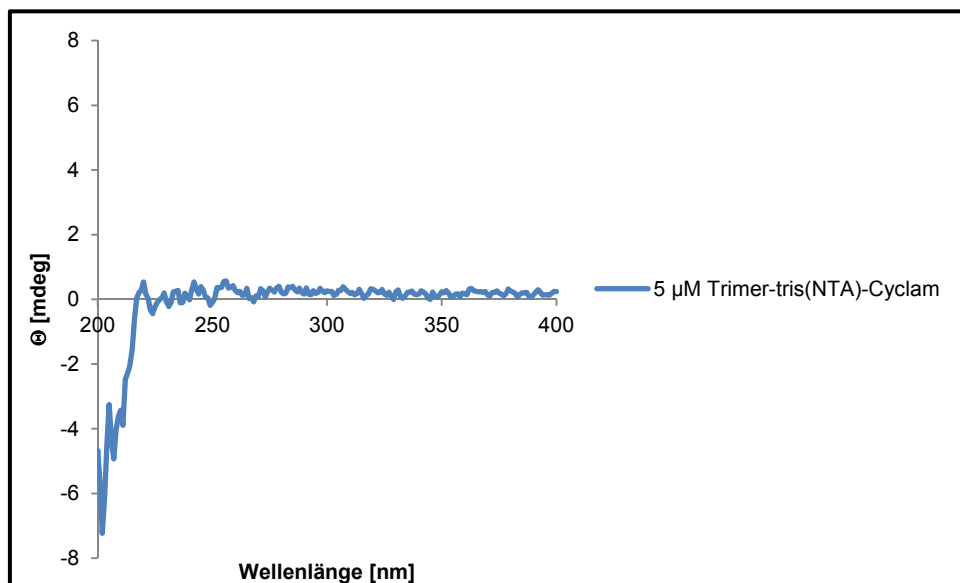


Abb. 177: CD-Spektrum des Liganden Trimer-tris(NTA)-Cyclam 62.

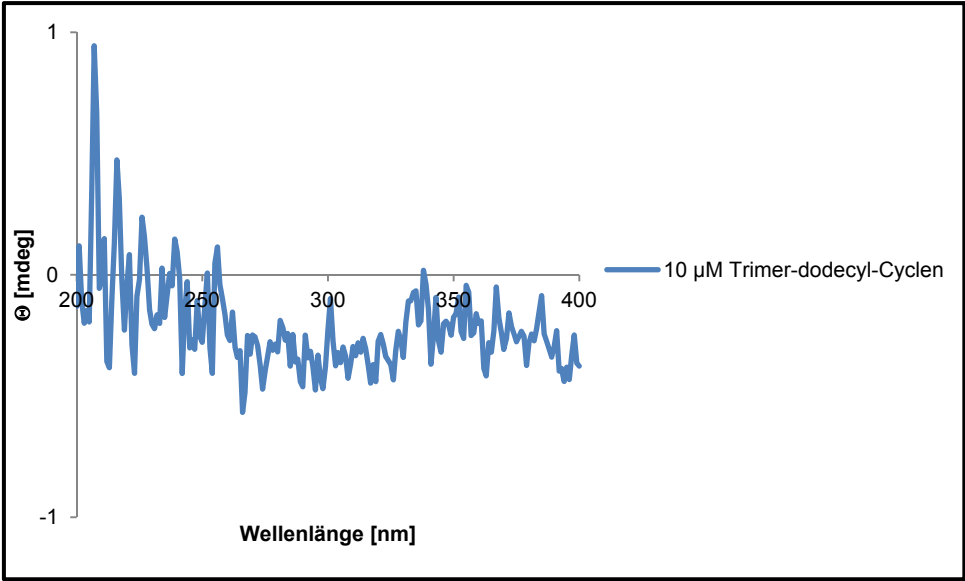


Abb. 178: CD-Spektrum des Liganden Trimer-dodecyl-Cyclen 86.

5.9. Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen

Die Anfertigung der TEM-Aufnahmen wurde von *Roychaudhuri* von der Arbeitsgruppe *Teplow* durchgeführt.

Als Referenz wurde einmal A β (1-42) alleine angesetzt und vermessen. Des Weiteren wurden Proben mit A β (1-42) und Ligand sowie Ligand alleine angesetzt. Die Zusammensetzungen der Lösungen sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Zusammensetzung der Ansätze für die TEM-Aufnahmen.

	A β - Stammlsg. 23.26 μ M [μ L]	NaPi 100 μ M [μ L]	DMSO [μ L]	Ligand in DMSO/H ₂ O 250 μ M [μ L]	H ₂ O _{bidest.} [μ L]
A β (1-42) alleine	43	5	2	—	—
A β (1-42) + Ligand	43	5	—	2	—
Ligand alleine	—	5	—	2	43

Die Endkonzentrationen beliefen sich für A β (1-42) auf 20 μ M und für die Liganden auf 10 μ M. Die angesetzten Proben wurden einmal direkt zu Beginn vermessen und einmal nach 5 d Inkubation mit 850 rpm bei RT (Abb. 63, 64, 65). Abb. 179 zeigt die TEM-Aufnahmen von A β (1-42) mit Ligand nach 0 d. Abb. 180 zeigt die TEM-Aufnahme von Trimer-D3 **43** alleine nach 0 d. Die anderen Liganden alleine zeigten bei sofortiger Vermessung keine Morphologien.

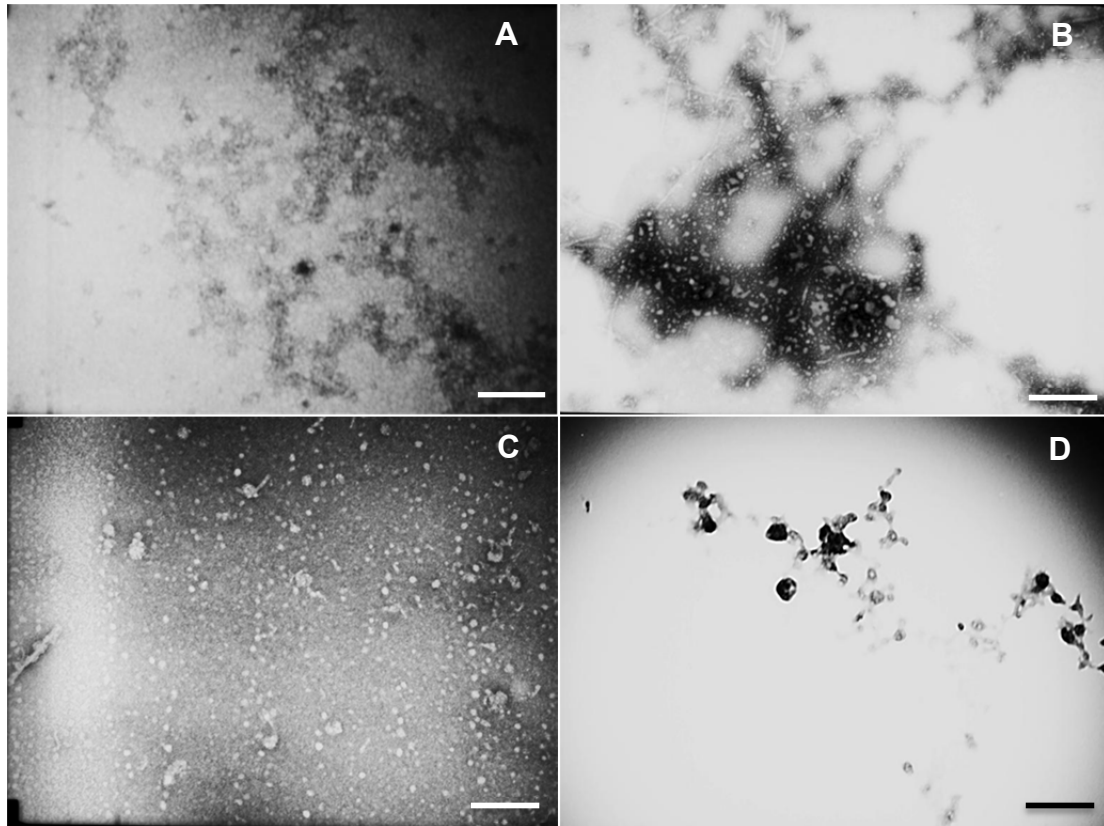


Abb. 179: TEM-Aufnahmen von 20 μM A β (1-42) mit 10 μM Trimer-D3 43 (A), mit 10 μM Trimer-Diamin 40 (B), mit 10 μM Trimer-TEG-TEG-D1 42 (C) und mit 10 μM Trimer-D3-Lys 45 (D) nach 0 d (Maßstabsskala 216 nm).

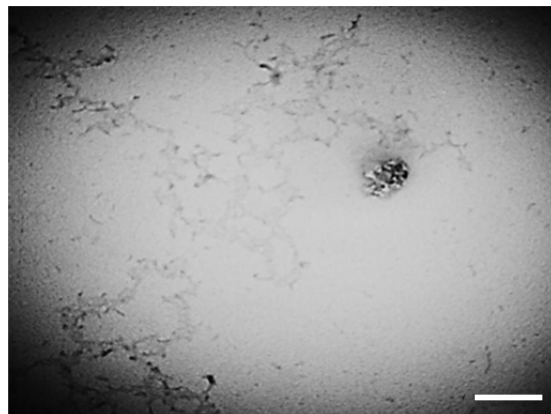


Abb. 180: TEM-Aufnahmen von 10 μM Trimer-D3 43 alleine nach 0 d (Maßstabsskala 216 nm).

6. Literaturverzeichnis

- [1] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 333.
- [2] R. Virchow, *Virch. Arch. f. path. Anat.* **1854**, 6, 416.
- [3] R. Virchow, *Virch. Arch. f. path. Anat.* **1855**, 8, 364.
- [4] C. A. Knutson, *Carbohydr. Polym.* **2000**, 42, 65.
- [5] D. Carter, K.-C. Chou, *Neurobiol. Aging* **1998**, 19, 37.
- [6] E. D. Eanes, G. G. Glenner, *J. Histochem. Cytochem.* **1968**, 16, 673.
- [7] M. Sunde, C. Blake, *Adv. Prot. Chem.* **1997**, 50, 123.
- [8] J. T. Jarett, T. Joseph, E. P. Berger, P. T. Lansbury, *Ann. New York Acad. Sci.* **1993**, 695, 144.
- [9] E. Scherzinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 4604.
- [10] S. J. Wood, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 19509.
- [11] A. Alzheimer, *Allg. Z. Psychiatr.* **1907**, 64, 146.
- [12] A. Alzheimer, *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* **1911**, 4, 356.
- [13] A. B. Clippingdale, J. D. Wade, C. J. Barrow, *J. Peptide Sci.* **2001**, 7, 227.
- [14] M. Pallas, A. Camins, *Curr.Pharm.Des.* **2006**, 12, 4389.
- [15] K. Hochdörffer, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2009**.
- [16] C. Haass, D. J. Selkoe, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2007**, 8, 101.
- [17] J. Kang, H.-G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K.-H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, B. Müller-Hill, *Nature* **1987**, 325, 733.
- [18] L. Minati, T. Edginton, M. Grazia Bruzzone, G. Giaccone, *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* **2009**, 24, 95.
- [19] D. J. Selkoe, *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 741.
- [20] Y.-H. Suh, F. Checler, *Pharmacol. Rev.* **2002**, 54, 469.
- [21] M. S. Wolfe, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2039.
- [22] S. A. Gravina, L. Ho, B. Eckman, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 7013.
- [23] D. M. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 25945.
- [24] J. H. Chyung, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 51035.
- [25] P. Rzepecki, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2004**.
- [26] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, 297, 353.
- [27] J. D. Harper, P. T. Lansbury, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 385.
- [28] D. M. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 22364.

- [29] J. D. Harper, S. S. Wong, C. M. Lieber, P. T. LANSBURY, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 119.
- [30] G. Bitan, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 34882.
- [31] C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C. L. Masters, K. Beyreuther, *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 460.
- [32] S. J. Wood, R. Wetzel, J. D. Martin, M. R. Hurle, *Biochem. J.* **1995**, 34, 724.
- [33] G. Bitan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 100, 330.
- [34] N. D. Lazo, M. A. Grant, M. C. Condrón, A. C. Rigby, D. B. Teplow, *Prot. Sci.* **2005**, 14, 1581.
- [35] M. D. Kirkitadze, M. M. Condrón, D. B. Teplow, *J. Mol. Biol.* **2001**, 312, 1103.
- [36] T. Ban, M. Hoshino, S. Takahashi, D. Hamada, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto, *J. Mol. Biol.* **2004**, 344, 757.
- [37] C. Goldsbury, P. Frey, V. Olivieri, U. Aebi, S. A. Müller, *J. Mol. Biol.* **2005**, 352, 282.
- [38] H. C. Vollmar, P. Mand, M. Butzlaff, *DEGAM Leitlinie 12: Demenz (Kurzfassung)*, Omikron publishing, Düsseldorf, **2008**.
- [39] A. J. J. Wood, J. L. Cummings, *N. Engl. J. Med.* **2004**, 351, 56.
- [40] M. Racchi, *Pharmacol. Res.* **2004**, 50, 441.
- [41] R. Bullock, *Expert Opin. Investig. Drugs* **2004**, 13, 303.
- [42] M. Mattson, *Exp. Gerontol.* **2000**, 35, 489.
- [43] G. Halliday, S. R. Robinson, C. Shepherd, J. Kril, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2000**, 27, 1.
- [44] C. Behl, B. Moosmann, *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 33, 182.
- [45] C. Talmard, A. Bouzan, P. Faller, *Biochemistry* **2007**, 46, 13658.
- [46] J. Ryu, K. Girigoswami, C. Ha, S. H. Ku, C. B. Park, *Biochemistry* **2008**, 47, 5328.
- [47] J. W. Karr, V. A. Szalai, *Biochemistry* **2008**, 47, 5006.
- [48] B.-K. Shin, S. Saxena, *Biochemistry* **2008**, 47, 9117.
- [49] M. R. Farlow, J. L. Cummings, *Am. J. Med.* **2007**, 120, 388.
- [50] M. R. Farlow, *Geriatrics* **2004**, 59, 22.
- [51] S. A. Lipton, *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, 2, 155.
- [52] P. M. Doraiswamy, *Psychopharmacol. Bull.* **2003**, 37, 41.
- [53] A. Monsonego, H. L. Weiner, *Science* **2003**, 302, 834.
- [54] D. L. Brody, D. M. Holtzman, *Annu. Rev. Neurosci.* **2008**, 31, 175.

- [55] T. Tomita, T. Iwatsubo, *Drug News Perspect.* **2004**, *17*, 321.
- [56] M. Citron, *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 677.
- [57] P. St George-Hyslop, C. Haass, *Nat. Med.* **2008**, *14*, 711.
- [58] L. Rajendran, A. Schneider, G. Schlechtingen, S. Weidlich, J. Ries, T. Braxmeier, P. Schwille, J. B. Schulz, C. Schroeder, M. Simons, G. Jennings, H.-J. Knolker, K. Simons, *Science* **2008**, *320*, 520.
- [59] J. C. Barrow, S. R. Stauffer, K. E. Rittle, P. L. Ngo, Z. Yang, H. G. Selnick, S. L. Graham, S. Munshi, G. B. McGaughey, M. K. Holloway et al., *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6259.
- [60] S. Zhou, H. Zhou, P. J. Walian, B. K. Jap, *Biochemistry* **2007**, *46*, 2553.
- [61] E. D. Roberson, L. Mucke, *Science* **2006**, *314*, 781.
- [62] L. Estrada, C. Soto, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 115.
- [63] A. Lorenzo, B. A. Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12243.
- [64] D. Allsop, G. Gibson, I. K. Martin, S. Moore, S. Turnbull, L. J. Twyman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 255.
- [65] M. Ono, H. Kawashima, A. Nonaka, T. Kawai, M. Haratake, H. Mori, M.-P. Kung, H. F. Kung, H. Saji, M. Nakayama, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2725.
- [66] S. Rizzo, C. Rivière, L. Piazzzi, A. Bisi, S. Gobbi, M. Bartolini, V. Andrisano, F. Morroni, A. Tarozzi, J.-P. Monti et al., *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2883.
- [67] J. H. Byun, H. Kim, Y. Kim, I. Mook-Jung, D. J. Kim, W. K. Lee, K. H. Yoo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5591.
- [68] R. Kisilevsky, L. J. Lemieux, P. E. Fraser, X. Kong, P. G. Hultin, W. A. Szarek, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 143.
- [69] S.-J. Lin, Y.-J. Shiao, C.-W. Chi, L.-M. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1173.
- [70] T. Tomiyama, A. Shoji, K.-i. Kataoka, Y. Suwa, S. Asano, H. Kaneko, N. Endo, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6839.
- [71] S. J. Konturek, P. C. Konturek, T. Brzozowski, G. A. Bubenik, *J. Physiol. Pharmacol.* **2007**, *58 Suppl 6*, 23.
- [72] Y. García-Mesa, L. Giménez-Llort, L. C. López, C. Venegas, R. Cristòfol, G. Escames, D. Acuña-Castroviejo, C. Sanfeliu, *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 1124.e13.
- [73] C. W. Ritchie, A. I. Bush, A. Mackinnon, S. Macfarlane, M. Mastwyk, L. MacGregor, L. Kiers, R. Cherny, Q.-X. Li, A. Tammer, D. Carrington, C.

- Mavros, I. Volitakis, M. Xilinas, D. Ames, S. Davis, K. Beyreuther, R. E. Tanzi, C. L. Masters, *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 1685.
- [74] P. J. Crouch, K. J. Barnham, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1604.
- [75] R. Squitti, R. Polimanti, *J. Alzheimers Dis.* **2012**, *29*, 493.
- [76] R. Squitti, R. Polimanti, *Am. J. Neurodegener. Dis.* **2013**, *2*, 46.
- [77] K. Ono, Y. Yoshiike, A. Takashima, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, *J. Neurochem.* **2003**, *87*, 172.
- [78] Y. Goodman, M. R. Steiner, S. M. Steiner, M. P. Mattson, *Brain Res.* **1994**, *654*, 171.
- [79] K. Ono, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1690*, 193.
- [80] K. Ono, K. Hasegawa, H. Naiki, M. Yamada, *J. Neurosci. Res.* **2004**, *75*, 742.
- [81] F. Yang, *J. Biol. Chem.* **2004**, *280*, 5892.
- [82] L. O. Tjernberg, C. Iilliehöök, D. J. E. Callaways, J. Näslund, S. Hahne, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12601.
- [83] L. O. Tjernberg, J. Näslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlström, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8545.
- [84] M. M. Pallitto, J. Ghanta, P. Heinzelman, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3570.
- [85] T. L. Lowe, A. Strzelec, L. L. Kiessling, R. M. Murphy, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7882.
- [86] T. J. Gibson, R. M. Murphy, *Biochemistry* **2005**, *44*, 8898.
- [87] D. J. Gordon, R. Tappe, S. C. Meredith, *J. Peptide Res.* **2002**, *60*, 37.
- [88] M. A. Findeis, G. M. Musso, C. C. Arico-Muendel, H. W. Benjamin, A. M. Hundal, J.-J. Lee, J. Chin, M. Kelley, J. Wakefield, N. J. Hayward et al., *Biochemistry* **1999**, *38*, 6791.
- [89] C. Soto, E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R. Asok Kumar, E. M. Castaño, B. Frangione, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 822.
- [90] T. M. Wright, *Drugs Today* **2006**, *42*, 291.
- [91] K. Wiesehan, K. Buder, R. P. Linke, S. Patt, M. Stoldt, E. Unger, B. Schmitt, E. Bucci, D. Willbold, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 748.
- [92] K. Wiesehan, D. Willbold, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 811.
- [93] S. A. Funke, D. Willbold, *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 783.

- [94] D. Bartnik, S. A. Funke, L.-C. Andrei-Selmer, M. Bacher, R. Dodel, D. Willbold, *Rejuvenation Res.* **2010**, *13*, 202.
- [95] K. Wiesehan, J. Stohr, L. Nagel-Steger, T. van Groen, D. Riesner, D. Willbold, *Protein Eng. Des. Sel.* **2008**, *21*, 241.
- [96] T. van Groen, K. Wiesehan, S. A. Funke, I. Kadish, L. Nagel-Steger, D. Willbold, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1848.
- [97] T. van Groen, I. Kadish, K. Wiesehan, S. A. Funke, D. Willbold, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 276.
- [98] G. Bitan, B. Tarus, S. S. Vollers, H. A. Lashuel, M. M. Condrón, J. E. Straub, D. B. Teplow, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15359.
- [99] T. Sato, P. Kienlen-Campard, M. Ahmed, W. Liu, H. Li, J. I. Elliott, S. Aimoto, S. N. Constantinescu, J.-N. Octave, S. O. Smith, *Biochemistry* **2006**, *45*, 5503.
- [100] O. N. Antzutkin, J. J. Balbach, R. D. Leapman, N. W. Rizzo, J. Reed, R. Tycko, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13045.
- [101] M. Török, S. Milton, R. Kayed, P. Wu, T. McIntire, C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40810.
- [102] A. Frydman-Marom, M. Rechter, I. Shefler, Y. Bram, D. E. Shalev, E. Gazit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1981.
- [103] S. Sinha, Lopes, Dahabada H. J., Z. Du, E. S. Pang, A. Shanmugam, A. Lomakin, P. Talbiersky, A. Tennstaedt, K. McDaniel, R. Bakshi et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16958.
- [104] Lopez del Amo, Juan Miguel, U. Fink, M. Dasari, G. Grelle, E. E. Wanker, J. Bieschke, B. Reif, *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 517.
- [105] F. L. Palhano, J. Lee, N. P. Grimster, J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7503–7510.
- [106] W. Froestl, A. Pfeifer, A. Muhs, *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *34*, 1.
- [107] T. Y. Lee, J. Suh, *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81*, 255.
- [108] J. Suh, S. H. Yoo, M. G. Kim, K. Jeong, J. Y. Ahn, M.-s. Kim, P. S. Chae, T. Y. Lee, J. Lee, J. Lee et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7064.
- [109] W. S. Chei, H. Ju, J. Suh, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 511.
- [110] J. Suh, W. S. Chei, *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12*, 207–213.
- [111] S. Dornieden, A. Müller-Schiffmann, H. Sticht, N. Jiang, Y. Cinar, M. Wördehoff, C. Korth, S. A. Funke, D. Willbold, R. Yan, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e59820.

- [112] K. Yamada, C. Yabuki, P. Seubert, D. Schenk, Y. Hori, S. Ohtsuki, T. Terasaki, T. Hashimoto, T. Iwatsubo, *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 11393.
- [113] T. H. Schrader, C. N. Kirsten, *Chem. Commun.* **1996**, 2089.
- [114] C. N. Kirsten, T. H. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12061.
- [115] P. Rzepecki, M. Wehner, O. Molt, R. Zadmard, K. Harms, T. Schrader, *Synthesis* **2003**, 1815.
- [116] P. Rzepecki, H. Gallmeier, N. Geib, K. Cernovska, B. König, T. Schrader, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5168.
- [117] P. Rzepecki, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3016.
- [118] P. Rzepecki, L. Nagel-Steger, S. Feuerstein, U. Linne, O. Molt, R. Zadmard, K. Aschermann, M. Wehner, T. H. Schrader, D. Riesner, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 47497.
- [119] K. Hochdörffer, J. März-Berberich, L. Nagel-Steger, M. Epple, W. Meyer-Zaika, A. H. Horn, H. Sticht, S. Sinha, G. Bitan, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4348.
- [120] J. März-Berberich, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2010**.
- [121] A. Müller-Schiffmann, J. März-Berberich, A. Andreyeva, R. Rönicke, D. Bartnik, O. Brener, J. Kutzsche, Horn, Anselm H. C., M. Hellmert, J. Polkowska et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8743.
- [122] A. Müller-Schiffmann, J. März-Berberich, A. Andreyeva, R. Rönicke, D. Bartnik, O. Brener, J. Kutzsche, Horn, Anselm H. C., M. Hellmert, J. Polkowska et al., *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8925.
- [123] T.-L. Ho, G. A. Olah, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, *15*, 774.
- [124] M. F. Jung, M. A. Lyster, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 968.
- [125] A. Pellicer, Bravo, María del Carmen, *Sem. Fet. Neonat. Med.* **2011**, *16*, 42.
- [126] H. Levine, *Amyloid* **2005**, *12*, 5.
- [127] V. Rangachari, B. D. Moore, D. K. Reed, L. K. Sonoda, A. W. Bridges, E. Conboy, D. Hartigan, T. L. Rosenberry, *Biochemistry* **2007**, *46*, 12451.
- [128] S. M. Kelly, N. C. Price, *Curr. Prot. Pept. Sci.* **2000**, *1*, 349.
- [129] G. Bitan, *Methods Enzymol.* **2006**, *413*, 217.
- [130] F. Rahimi, P. Maiti, G. Bitan, *J. Vis. Exp.* **2009**, e1071.
- [131] G. Bitan, D. B. Teplow, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 357.
- [132] G. Bitan, A. Lomakin, D. B. Teplow, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35176.

- [133] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205.
- [134] J. T. Heeres, S.-H. Kim, B. J. Leslie, E. A. Lidstone, B. T. Cunningham, P. J. Hergenrother, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18202.
- [135] K. Kassler, A. Horn, H. Sticht, *J. Mol. Model.* **2010**, *16*, 1011.
- [136] F. Wan, C. Li, L. Jiang, Y. Li, *Res. Chem. Intermed.* **2012**, *38*, 2085.
- [137] R. Reichenbach-Klinke, M. Kruppa, B. König, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12999.
- [138] D. Abramowski, K.-H. Wiederhold, U. Furrer, A.-L. Jaton, A. Neuenschwander, M.-J. Runser, S. Danner, J. Reichwald, D. Ammaturo, D. Staab et al., *J. Pharm. Exp. Ther.* **2008**, *327*, 411.
- [139] P. G. Szekeres, K. Leong, T. A. Day, A. E. Kingston, E. H. Karran, *J. Biomol. Screen.* **2008**, *13*, 101.
- [140] M. E. Fortini, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 673.
- [141] M. Okochi, *Eur. Mol. Biol. Org.* **2002**, *21*, 5408.
- [142] R. Yan, J. B. Munzner, M. E. Shuck, M. J. Bienkowski, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 34019.
- [143] G. Basi, N. Frigon, R. Barbour, T. Doan, G. Gordon, L. McConlogue, S. Sinha, M. Zeller, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31512.
- [144] T. Arai, H. Akiyama, K. Ikeda, H. Kondo, H. Mori, *Brain Res.* **1999**, *823*, 202.
- [145] J. D. Buxbaum, G. Thinakaran, V. Koliatsos, J. O'Callahan, H. H. Slunt, D. L. Price, S. S. Sisodia, *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 9629.
- [146] R. Bausinger, K. von Gersdorff, K. Braeckmans, M. Ogris, E. Wagner, C. Bräuchle, A. Zumbusch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1568.
- [147] Y. Cheng, A. C. Samia, J. D. Meyers, I. Panagopoulos, B. Fei, C. Burda, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10643.
- [148] G. Sahay, D. Y. Alakhova, A. V. Kabanov, *J. Con. Rel.* **2010**, *145*, 182.
- [149] V. Sokolova, O. Rotan, J. Klesing, P. Nalbant, J. Buer, T. Knuschke, A. M. Westendorf, M. Epple, *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14*, 910.
- [150] I. Canton, G. Battaglia, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2718.
- [151] V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1382.
- [152] A. Maitra, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2005**, *5*, 893.
- [153] R. Ramachandran, W. Paul, C. P. Sharma, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2009**, *88B*, 41.

- [154] V. Uskoković, D. P. Uskoković, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2011**, 96B, 152.
- [155] V. Sokolova, D. Kozlova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf, M. Epple, *Acta Biomater.* **2013**, 9, 7527.
- [156] S. Chernousova, J. Klesing, N. Soklakova, M. Epple, *RSC Adv.* **2013**, 3, 11155.
- [157] B. Carr, M. Wright, *Nanoparticle Tracking Analysis. A Review of Applications and Usage 2010 - 2012*, NanoSight Ltd, **2013**.
- [158] K. Fischinger, *Diplomarbeit*, Universität Wien, **2008**.
- [159] M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan, *Biotechnol. Annu. Rev.* **2005**, 11, 127.
- [160] J. C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R. W. Horobin, Á. Villanueva, *Acta Histochem.* **2012**, 114, 785.
- [161] V. Uryga-Polowy, D. Kosslick, C. Freund, J. Rademann, *ChemBioChem* **2008**, 9, 2452.
- [162] N. Sanvicens, M. P. Marco, *Trends Biotechnol.* **2008**, 26, 425.