

Synthese und biochemische Parameter zell-impermeabler Cyclosporine

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Viktoria Kahlert

geb. am 28.06.1984 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gunter Fischer, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
2. Prof. Dr. Mike Schutkowski, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Dr. Hans Fliri, Selcia

Halle (Saale), den 30.10.2013

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Danksagung | iii |
| Abkürzungsverzeichnis | iv |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Cyclosporine | 1 |
| 1.2 Cyclosporin A..... | 2 |
| 1.2.1 Biologische Wirkung | 2 |
| 1.2.2 Metabolismus und pharmakologische Aktivität von CsA..... | 4 |
| 1.2.3 Zelluläre Aufnahme und Auswirkungen von CsA | 6 |
| 1.2.4 Nicht-immunsuppressive, PPIase-inhibierende CsA-Derivate | 8 |
| 1.2.5 Modifizierungen des CsA-Moleküles | 9 |
| 1.3 Zellgängigkeit..... | 12 |
| 1.4 Cyclophiline..... | 14 |
| 1.4.1 Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen..... | 14 |
| 1.4.2 Humane Cyclophiline in Krankheiten..... | 17 |
| 1.4.2.1 Cyclophiline in viralen Erkrankungen | 17 |
| 1.4.2.3 Cyclophiline in neuronalen Erkrankungen..... | 19 |
| 1.4.3 Extrazelluläre Cyclophiline, ihre Rolle in Entzündungskrankheiten und vasculären Erkrankungen und ihre Interaktion mit CD147 | 20 |
| 1.4.3.1 Die Rolle der extrazellulären Cyclophiline CypA, CypB und CypC in Entzündungskrankheiten und vasculären Erkrankungen | 20 |
| 1.4.3.2 Der Cyclophilin-Rezeptor CD147 | 22 |
| 1.5 Zielstellung..... | 24 |
| 2 Ergebnisse und Diskussion | 25 |
| 2.1 Modifizierung der MeBmt ¹ -Seitenkette | 26 |
| Allylständige Bromierung und nucleophile Substitution an der [MeBmt] ¹ -Seitenkette | 27 |
| Derivatisierung der Säurefunktion von CsA-Analog 7 | 28 |
| Biochemische Daten der CsA-Derivate 6-45..... | 32 |
| CD-Spektroskopie von CsA und den CsA-Derivaten 7, 19 und 37 | 38 |
| Heterozyklen durch ‚Click-Chemie‘ und direkte Kupplung | 39 |
| Biochemische Daten der heterozyklischen CsA-Derivate | 42 |
| Derivatisierung durch Olefin-Metathese | 43 |
| Biochemische Daten der Derivate 62-71 | 45 |
| Derivatisierung durch oxidative Spaltung der Doppelbindung und reduktive Aminierung | 46 |
| Biochemische Daten der Produkte aus der reduktiven Aminierung | 48 |
| 2.2 Rückrat-NH Modifizierung der Positionen D-Ala ⁸ und Val ⁵ von CsA..... | 49 |
| Biochemische Daten von Val ⁵ - und D-Ala ⁸ -modifizierten CsA-Derivaten | 50 |
| 2.3. Testung ausgewählter CsA-Derivate in Modellsystemen für praktische Anwendungen | 53 |

| | |
|---|-----|
| Testung von CsA-Derivat 19 in Modellen für chronisches und akutes Asthma | 53 |
| Bestimmung von extrazellulärem Cyp aus Serum mit CsA-Analog 30 | 55 |
| Testung von CsA-Derivat 39 gegen bakterielle Toxine | 56 |
| Testung der CsA-Derivate 39 und 66 als Inhibitoren für das humane Coronavirus HCoV-229E | 59 |
| 3 Zusammenfassung | 61 |
| 4 Experimenteller Teil..... | 63 |
| 4.1 Material und Methoden | 63 |
| 4.2 Synthesevorschriften | 64 |
| 5 Literaturverzeichnis | 93 |
| Publikationen | 104 |
| Lebenslauf | 105 |
| Selbstständigkeitserklärung | 106 |

Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Gunter Fischer danken, für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und für die Ausgabe des interessanten sowie anspruchsvollen Themas.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Miroslav Malešević für die Betreuung meiner Arbeit, die fachliche Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Dr. Karl-Peter Rücknagel und Michael Schumann danke ich für die Messungen des PPlase-Assays.

Dr. Erik Prell und Martina Heidler danke ich für die Messungen des Zellpenetrationsassay, des indirekten und direkten Calcineurin-Inhibitionsassay und des NFAT-Reporter-Gen-Assays. Für die Messungen des Zellpenetrationsassays danke ich außerdem Jan Kühling.

Dr. Angelika Schierhorn und Christina Gersching gilt mein Dank für die zahlreichen massenspektrometrischen Analysen.

Besonderer Dank gebührt Dr. Christian Lücke und Monika Seidel für die Durchführung und Auswertung der NMR-Spektren zur Strukturbestätigung und -aufklärung.

Birgit Hökelmann und Ilona Kunze möchte ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor danken.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen Doktoranden, Diplomanden und Mitarbeitern der Max-Planck-Forschungsstelle für das angenehme Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Alexander Rentzsch, Stephanie Pösel, Martin Theuerkorn, Annika Manns, Dorothea Rohde, Dr. Erik Prell, Dr. Christian Beyer und Dr. Matthias Weiwad für die ergiebigen Gespräche und Diskussionen.

Dank gebührt auch Dr. Molly A. Balsley und Dr. Stephanie L. Constant von der Abteilung Mikrobiologie, Immunologie und Tropenmedizin der George Washington University, Washington DC (USA) für die Untersuchung an Tiermodellen. Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holger Barth vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Ulm danke ich für die Tests gegen bakterielle Toxine. Für die Tests am humanen Coronavirus HCoV-229E danke ich der Arbeitsgruppe von Dr. Albrecht von Brunn vom Max-von-Pettenkofer Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München. Bei Michael Schumann bedanke ich mich für die Durchführung der Untersuchungen zu Cyclophilin in Serum.

Großer Dank gilt besonders meinen Eltern und meiner Familie für die finanzielle und mentale Unterstützung während meines Studiums.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| aa | Aminosäure (amino acid) |
| Abu | L- α -Aminobuttersäure |
| AcAla | <i>N</i> -Acetyl-L-alanin |
| ACN | Acetonitril |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AIBN | Azobisisobutyronitril |
| Akt1/2 | (eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase) |
| APOE | Apolipoprotein E |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAL | Bronchoalveoläre Lavage |
| BuLi | Butyllithium |
| bzgl. | bezüglich |
| bzw. | beziehungsweise |
| C2 | (Toxin aus <i>Clostridium botulinum</i>) |
| C2I | Enzymkomponente des C2-Toxins |
| C2II | Bindungs- und Translokationskomponente des C2-Toxins |
| C2IIa | aktivierte Form von C2II |
| CaM | Calmodulin |
| CaN | Calcineurin |
| CD | Circulardichroismus |
| CVB3 | Coxsackievirus B3 |
| CoV | Coronavirus |
| CsA | Cyclosporin A |
| Cyp | Cyclophilin |
| DB | Doppelbindung |
| DBU | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en |
| DCB | 1,2-Dichlorbenzen |
| DCF-DA | 2'-7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat |
| d.h. | das heißt |
| DIC | <i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid |
| DIPEA | <i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin |
| DMAP | 4-(Dimethylamino)-pyridin |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonucleinsäure |
| EC ₅₀ | mittlere effektive Konzentration |
| EDO | 2,2'-(Ethylendioxy)bis(ethylamin) |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |

| | |
|-------------------|--|
| ERK | Extracellular signal regulated kinase |
| ESI | Elektrospray Ionisation |
| et al. | und andere |
| FACS | Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorting) |
| FKBP | FK506-bindendes Protein |
| GST | Glutathion S-Transferase |
| HATU | 2-(1 <i>H</i> -7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat |
| HCC | Hepatozelluläres Karzinom (hepatocellular carcinoma) |
| HCV | Hepatitis C-Virus |
| HEK293 | humane embryonische Nierenzellen |
| HGII | Hoveyda Grubbs Katalysator der zweiten Generation |
| HIV | Humanes Immunodefizienz Virus |
| HKT | Hämatokrit |
| HOBT | <i>N</i> -Hydroxybenzotriazol |
| HOSu | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid |
| HPLC | Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography) |
| HPV16 | Humanes Papilloma Virus des Types 16 |
| HSA | Humanes Serumalbumin |
| Ia | Enzymkomponente des Iota-Toxins |
| Ib | Bindungs- und Translokationskomponente des Iota-Toxins |
| IC ₅₀ | Inhibitorkonzentration der halbmaximalen Inhibierung |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| Ig1, Ig2 | Immunoglobulinartige Domänen |
| IL | Interleukin |
| Jak | Janus activated kinase |
| kat. | katalytisch |
| k.I. | keine Inhibition |
| L2 | <i>(kleineres Capsid-Protein des HPV16)</i> |
| LDA | Lithiumdiisopropylamid |
| LDL | Low-Density-Lipoprotein |
| LDLr | Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor |
| λ | Wellenlänge |
| M | molar (mol/l) |
| M1 | <i>(ein Matrix-Protein des Influenza A-Virus)</i> |
| MALDI-TOF | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation mit Flugzeit-Analysator |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| M _{ber.} | berechnete Masse |
| MeAla | <i>N</i> -Methyl-L-alanin |
| MeBmt | (4 <i>R</i>)-4-[(<i>E</i>)-Butenyl]-4, <i>N</i> -dimethyl-L-threonin |
| Melle | <i>N</i> -Methyl-L-isoleucin |

| | |
|------------------|--|
| MeLeu | <i>N</i> -Methyl-L-leucin |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| MPT | mitochondrialer Permeabilitätsübergang (mitochondrial permeability transition) |
| mRNA | Messenger-RNA |
| MS | Massenspektrometrie |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| MW | Mikrowelle |
| NAD ⁺ | Nikotinamidadenindinucleotid |
| NBS | <i>N</i> -Bromsuccinimid |
| NFAT | nuclear factor of activated T cells |
| NF-κβ | nuclear factor- κβ |
| n.g. | nicht getestet |
| NK-Zellen | natural killer-Zellen |
| NMR | Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance) |
| NOE | Kern Overhauser Effekt (Nuclear Overhauser effect) |
| NP | Nucleoprotein |
| NS | non-structural protein (des HCV) |
| Nsp | non-structural protein (des CoV) |
| o.ä. | oder ähnliches |
| OVA | Ovalbumin |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline) |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat |
| pNA | 4-Nitroanilin |
| PPIase | Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase |
| PRL | Prolactin |
| PRLr | Prolactin-Rezeptor |
| PyBOP | (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat |
| Raf | <i>(ein Signalprotein)</i> |
| rek. | rekombinant |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| ROS | reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies) |
| RP | Reverse Phase |
| RT-PCR | reverse transcription polymerase chain reaction |
| Sar | Sarcosin (<i>N</i> -Methyl-glycin) |
| SARS | severe acute respiratory syndrom |
| SKIP | SKI-Protein (ein nucleares Protooncogen) |
| sn | Überstand (supernatant) |
| SNW1 | <i>(ein Gen aus der SNW-Gen-Familie)</i> |
| Sos | <i>(ein Signalprotein)</i> |
| stöch. | stöchiometrisch |

| | |
|---------------|---|
| Suc | Succinimid |
| TAMRA | 5,6-Carboxytetramethylrhodamin |
| TBAI | Tetrabutylammoniumiodid |
| TFA | Trifluoressigsäure (Trifluoro acetic acid) |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TMSCI | Trimethylsilylchlorid |
| TNF- α | tumor necrosis factor-alpha |
| TOCSY | Total correlation spectroscopy |
| t_R | Retentionszeit |
| Trt | Trityl |
| θ | molare Elliptizität |
| U | Einheit (unit) |
| u.a. | unter anderem |
| usw. | und so weiter |
| v.a. | vor allem |
| VCAM | vascular cell adhesion molecule (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül) |
| VSMC | vascular smooth muscle cell (vasculäre glatte Muskelzellen) |
| VSV | vesicular stomatitis virus |
| VSV-IND | Indiana-Serumtyp des VSV |
| VSV-NJ | New-Jersey-Serumtyp des VSV |
| WW | Wechselwirkung |
| z.T. | zum Teil |

Zur Abkürzung der Aminosäuren wurde die Drei-Buchstaben-Abkürzungen verwendet.

1 Einleitung

1.1 Cyclosporine

Cyclosporine sind eine Gruppe biologisch aktiver Naturstoffe, die als Stoffwechselprodukte von den Pilzen *Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum* gebildet werden. Die Hauptmetaboliten bilden Cyclosporin A und Cyclosporin C (Dreyfuss et al., 1976). Die anderen Cyclosporine sind z.T. nur als Spurenmetabolite in den Extrakten der Pilze vorhanden (Traber et al., 1982), wobei das Verhältnis durch externe Steuerung während der Pilzanzucht variiert werden kann (Kobel et al., 1982). Die Struktur von Cyclosporin A wurde 1976 von Rügger et al. aufgeklärt. Die Strukturaufklärung der Cyclosporine C, B und D gelang ein Jahr später durch Traber et al. (Traber et al., 1977 (1) und (2)). Für die Cyclosporine E, F, G, H und I erfolgte die Strukturaufklärung 1982 (Traber et al., 1982). Die Strukturen der Cyclosporine A bis I sind in **Abbildung 1** wiedergegeben.

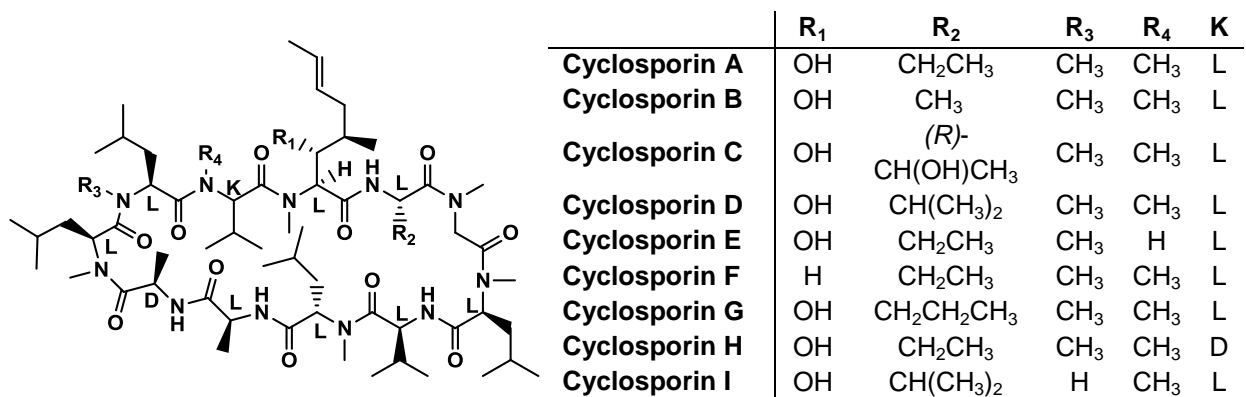


Abbildung 1: Struktur der Cyclosporine A bis I. (K = Konfiguration der Aminosäure 11) (nach Traber et al., 1982)

Die Cyclosporine A bis I sind neutrale Oligo-Peptide aus elf Aminosäuren, welche teilweise am Stickstoffatom methyliert sind. Für Cyclosporin E und Cyclosporin I ist dies für sechs Aminosäuren der Fall. Die Cyclosporine A, B, C, D, F, G und H enthalten jeweils sieben am Stickstoff methylierte Aminosäuren. Charakteristisch für alle neun Cyclosporine ist die ungesättigte C₉-Aminosäure in Position 1 und das D-Alanin in Position 8. Die Aminosäure in Position 1 trägt - mit Ausnahme im Cyclosporin F - eine sekundäre Hydroxylgruppe, die eine N,O-Acylwanderung zu den jeweiligen Isocyclosporinen ermöglicht (**Abbildung 2**). Neben dem bereits erwähnten D-Alanin in Position 8 enthält nur Cyclosporin H mit dem N-Methyl-D-valin in Position 11 noch eine weitere D-Aminosäure (Traber et al., 1982).

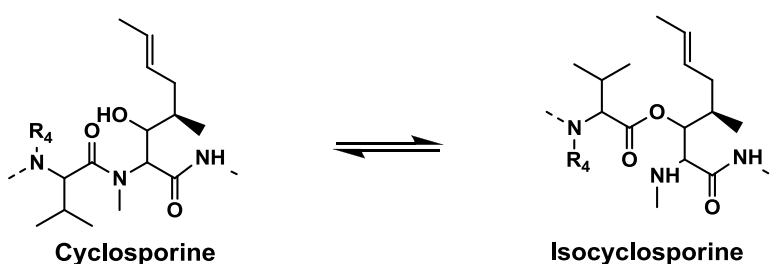


Abbildung 2: Umlagerung von Cyclosporinen in Isocyclosporine durch N,O-Acylwanderung. Dargestellt sind jeweils die allgemeinen Teilstrukturen. (R₄ = CH₃ oder H) (nach Traber et al., 1982)

1.2 Cyclosporin A

1.2.1 Biologische Wirkung

Cyclosporin A (CsA) wurde erstmals 1976 durch Borel et al. als Metabolit des Pilzes *Tolypocladium inflatum* isoliert und in seinen biologischen Eigenschaften beschrieben. CsA ist ein hydrophobes Peptid aus 11 Aminosäuren, von denen sieben *N*-methyliert sind und die restlichen vier ein Amidproton tragen. Ungewöhnlich im Molekül sind das D-Alanin in Position 8 (D-Ala⁸) und das (4*R*)-4-[(*E*)-butenyl]-4,*N*-dimethyl-L-threonin in Position 1 (MeBmt¹) (Rüegger et al, 1976) (**Abbildung 3**).

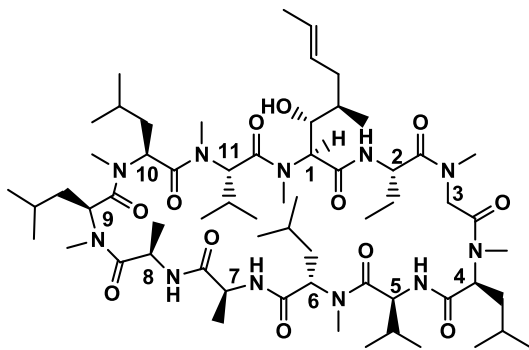


Abbildung 3: Struktur von CsA mit Nummerierung der Aminosäuren.

Die Totalsynthese des CsA-Moleküls gelang 1984 durch Wenger, stellt aber für die CsA-Gewinnung als Edukt neuer Derivate eher eine geringe Bedeutung dar, da sie an die vorhergehende Synthese von MeBmt geknüpft ist.

Bereits mit der Entdeckung wurden die immunsuppressiven und anti-inflammatorischen Eigenschaften des CsA beschrieben. So zeigten Mäuse nach Hauttransplantationen eine längere Überlebensdauer unter Gabe von CsA als die unbehandelte Vergleichsgruppe. Ein ähnlicher Effekt konnte sowohl an Mäusen als auch an Ratten für die sogenannte *Graft-versus-host*-Krankheit nachgewiesen werden und bei der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis zeigten Ratten nach CsA-Behandlung einen ausbleibenden bzw. verzögerten Krankheitseintritt und ebenso im Arthritis-Modell (Borel et al., 1976). In Tier-Modellen zeigte CsA eine spezifische Wirkung auf T-Zellen, während B-Lymphozyten nicht durch CsA beeinflusst werden, und eine inhibitorische Wirkung auf Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut (Borel et al., 1977).

Die immunsuppressive Wirkung von CsA wird seit rund 30 Jahren in der Transplantationsmedizin zur Behandlung und Vorbeugung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen von z.B. Niere, Knochenmark oder Leber genutzt (Calne et al., 1979; Powles et al., 1980; Calne et al., 1981). Patienten mit einer Nierentransplantation zeigten nach Behandlung mit CsA keine bakteriellen Infektionen und weniger Infektionen durch Pilze oder Viren als mit anderen Immunsuppressiva behandelte Patienten (Block et al., 1982; Dummer et al., 1983). Nach Herz- bzw. Herz-Lungen-Transplantationen trug die Beeinflussung der Entzündungsantwort durch CsA zu einer verbesserten Wundheilung bei und beugte Infektionen und bronchialen Rupturen vor. Bei Transplantationen der Bauchspeicheldrüse ist die Verwendung von CsA von Vorteil, da der Kohlenhydratstoffwechsel durch CsA nicht beeinflusst wird (Block et al., 1982). Powles et al. (1980) zeigten, dass die Gabe von CsA zusammen mit der Knochenmarktransplantation die Überlebensrate verbessert. CsA wirkt

hauptsächlich auf die T-Helferzellen, deren Wachstumsfaktor Interleukin (IL)-2 durch CsA auf mRNA-Ebene inhibiert wird (Krönke et al., 1984). Nickell et al. zeigten 1982 die inhibitorische Wirkung von CsA gegen Malaria. Die Autoren wiesen *in vivo* die Aktivität des CsA gegen *Plasmodium yoelii* und *Plasmodium berghei* in Mäusen nach und zeigten *in vitro* dessen wachstumshemmende Wirkung auf die Erreger der humanen Form der Malaria *Plasmodium falciparum*. Des Weiteren zeigte die Medikation mit CsA auch in der Therapie von Diabetes mellitus Typ I (Stiller et al., 1984), rheumatoider Arthritis (Weinblatt et al., 1987) und anderen Autoimmun-Krankheiten, wie z.B. Psoriasis (Griffiths et al., 1986), Neurodermitis (Gold et al., 1989), Asthma (Nizankowska et al., 1995) und chronischer Augenentzündung (Nussenblatt et al., 1983), Erfolge. Die Behandlung mit CsA wird jedoch von zum Teil schweren Nebenwirkungen begleitet und bedarf daher eines engen therapeutischen Monitoring der zu behandelnden Patienten. Das größte Problem bei der Therapie mit CsA stellt hierbei die Toxizität gegenüber den Nieren dar. Weiterhin wurden u.a. Bluthochdruck, Zahnfleischwucherungen, Übelkeit, Missempfindungen in Händen und Füßen und Hypertrichose als Nebenwirkungen beobachtet. Alle Nebenwirkungen sind reversibel und lösen sich nach Beendigung der CsA-Medikation wieder auf (Weinblatt et al., 1987; Dougados et al, 1988; Mihatsch et al, 1988). Durch Interaktion mit dem Lipoproteinmetabolismus und der Gallensäureproduktion durch CsA besteht die Möglichkeit zu einer Hyperlipidämie und damit verbunden zu einem erhöhten Risiko für Artherosklerose (Kockx et al., 2012).

Nachdem 1984 Cyclophilin A als ein intrazellulärer Bindungspartner für CsA gefunden wurde (Handschuhmacher et al., 1984), konnte 1991 die Wechselwirkung des CypA-CsA-Komplexes mit der Proteinphosphatase Calcineurin (CaN) als Ursache für die immunsuppressive Wirkung des CsA identifiziert werden (Liu et al., 1991). CaN bewirkt in der Zelle die Dephosphorylierung des zytoplasmatischen Teils des NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), der dadurch in den Zellkern wandert und dort die Transkription verschiedener Interleukine aktiviert. Die Bildung des ternären Komplexes aus Cyp, CsA und CaN hemmt diese Dephosphorylierung und verhindert somit den Eintritt von NFAT in den Zellkern und die damit verbundene Transkription der Interleukine (**Abbildung 4**).

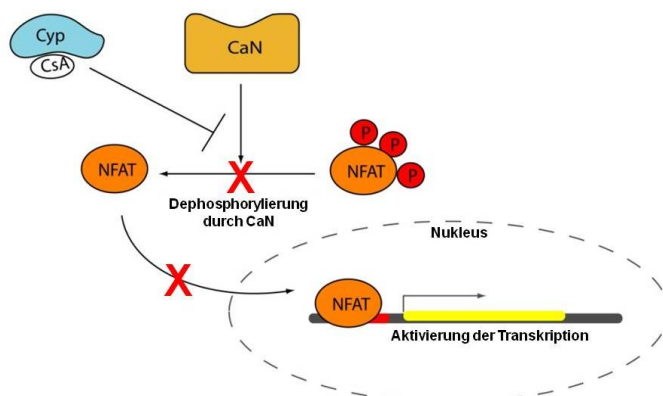


Abbildung 4: Immunsuppressive Wirkungsweise von CsA. Durch CaN vermittelte Dephosphorylierung des NFAT führt zu dessen Aktivierung. Die Bildung des ternären Komplexes aus CypA-CsA und CaN verhindert die Dephosphorylierung und führt zur Immunsuppression.

Die Kristallisation und damit verbunden die Strukturaufklärung des CypA-CsA-CaN-Komplexes konnte 2002 sowohl durch Huai et al. als auch durch Jin et al. realisiert werden (**Abbildung 5**). Dabei zeigte sich, dass die Konformationen des CsA-Rückrates und die der Seitenketten im Bereich der CypA-Bindungsstelle im ternären Komplex jener im CypA-CsA-Komplex sehr ähnlich sind. Die Bindung des

CsA erfolgt weitestgehend über das Peptidrückrat. Änderungen gibt es bzgl. der Torsionswinkel bei den Seitenketten der Aminosäuren, die in die CaN-Bindung involviert sind.

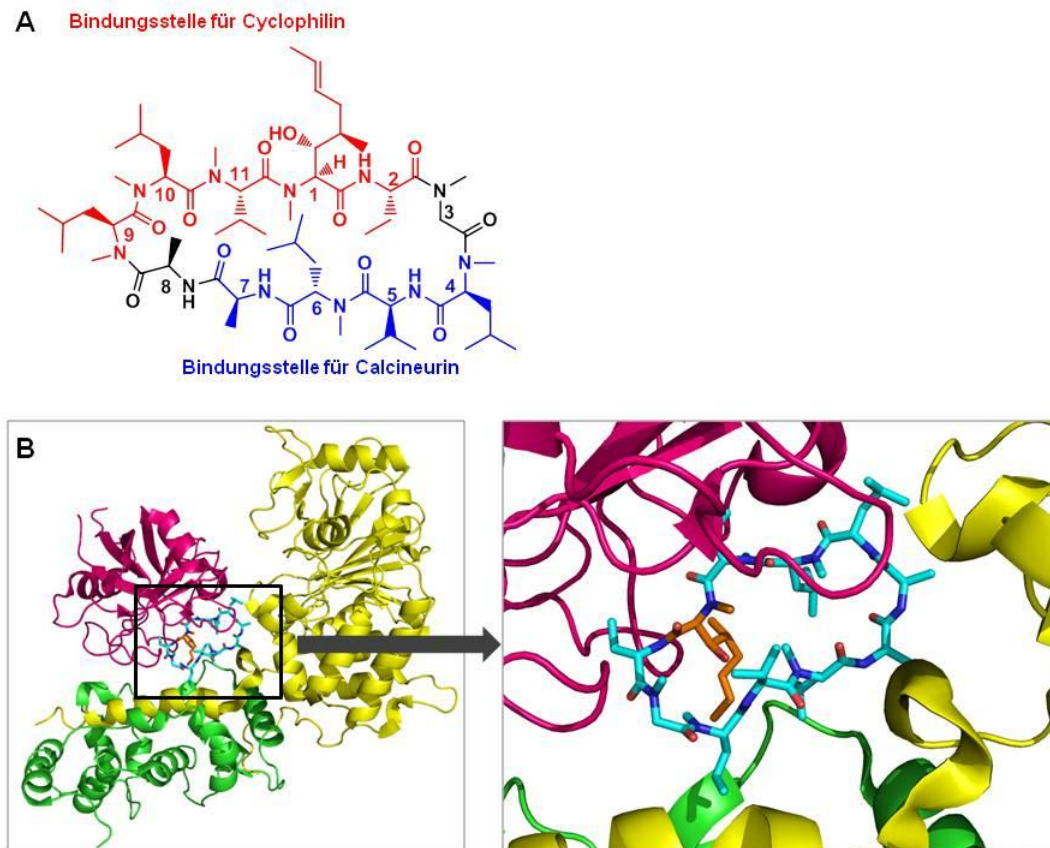


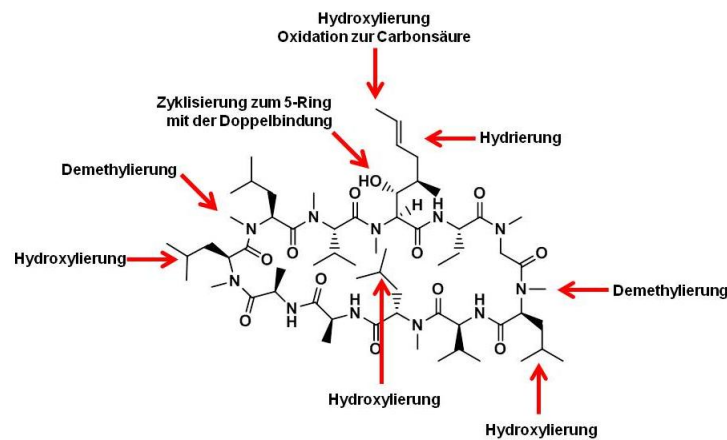
Abbildung 5: CsA-Bindungsstellen für CypA und CaN. A) CypA bindet an CsA im Bereich zwischen L- α -Aminobuttersäure in Position 2 (Abu²) und N-Methyl-leucin (MeLeu) in Position 9 (rot) und CaN im Bereich der Aminosäuren MeLeu⁴ und Alanin in Position 7 (Ala⁷) (blau). B) Kristallstruktur des ternären CypA-CsA-CaN-Komplexes: CypA (magenta), CaN A-Untereinheit (gelb), CaN B-Untereinheit (grün), CsA (blau) und MeBmt¹ (orange) (nach Huai et al., 2002; pdb: 1M63).

Die Inhibition der PPIase-Aktivität von CypA durch CsA und nicht-immunsuppressive CsA-Derivate stellt einen Ansatz zur Therapie bei Infektionen mit dem Hepatitis C-Virus dar, für das CypA als wichtiger Regulator während der Replikation agiert (Fischer et al., 2010; Ciesek et al., 2009; Kaul et al., 2009). CsA ist außerdem imstande proteolytische Abläufe zu inhibieren, indem es z.B. die Abspaltung der Plasmamembran-gebundenen Proteinkinase C (von Ruecker et al., 1988) und den Abbau von Typ-I-Kollagen inhibiert, woraus Wucherungen des Zahnfleisches als eine Nebenwirkung der CsA-Therapie resultieren (Kataoka et al., 2000).

1.2.2 Metabolismus und pharmakologische Aktivität von CsA

CsA wird zu rund 90 % in der Leber metabolisiert. Vorrangig geschieht dies durch Monooxygenasen aus der Gruppe der Cytochrom P₄₅₀-Enzyme (Shaw et al., 1987). Bisher konnten 15 CsA-Metaboliten isoliert und charakterisiert werden, wobei Hydroxylierungen der Aminosäuren MeBmt¹ (am C₇), MeLeu⁴, MeLeu⁶ und MeLeu⁹ (jeweils an C_γ) und Demethylierungen des Stickstoffes von MeLeu⁴ und

MeLeu⁹ sowie der Verlust der Doppelbindung zum Dihydro-Cyclosporin oder unter Ringschluss zum Tetrahydrofuran-yl-Derivat beobachtet werden (**Abbildung 6**) (Brooks et al., 1993).



| Strukturelle Bezeichnung | Abkürzung (nach Hawk's Cay) |
|---|-----------------------------|
| ⁴ N-Desmethyl-Cyclosporin | AM4N |
| ^{1η} Hydroxy- ⁴ N-desmethyl-Cyclosporin | AM1,4N |
| ^{9ν} Hydroxy- ⁴ N-desmethyl-Cyclosporin | AM4N,9 |
| ^{9ν} Hydroxy- ⁹ N-desmethyl-Cyclosporin | AM9,9N |
| ^{1η} Hydroxy-Cyclosporin | AM1 |
| ^{9ν} Hydroxy-Cyclosporin | AM9 |
| ^{9ν} Hydroxy- ^{1ε,1ζ} dihydro-Cyclosporin | AM1DI |
| ^{1η} Hydroxy- ^{1ε} tetrahydrofuran-yl-Cyclosporin | AM1c |
| ^{6ν} Hydroxy-Cyclosporin | AM6 |
| ^{6ν,9ν} Hydroxy- ⁴ N-desmethyl-Cyclosporin | AM4N,6,9 |
| ^{1ζ} -Carboxyl-Cyclosporin | AM1A |
| ^{1ν,9ν} Dihydroxy-Cyclosporin | AM1,9 |
| ^{4ν,9ν} Dihydroxy-Cyclosporin | AM4,9 |
| ^{6ν,9ν} Dihydroxy-Cyclosporin | AM6,9 |

Abbildung 6: Übersicht über die Metabolite des CsA (nach Brooks et al., 1993)

Wechselwirkungen von CsA mit anderen Medikamenten treten hauptsächlich im Bereich des Stoffwechsels auf. Besonders Medikamente, welche die enzymatische Aktivität von Cytochrom P₄₅₀ induzieren, führen zu einer herabgesetzten CsA-Konzentration im Blut. Eine erniedrigte CsA-Konzentration ergibt sich auch nach der intravenösen Applikation von einigen Antibiotika, wie z.B. Trimethoprim. Das Antimykotikum Ketoconazol hingegen führt bei Transplantationspatienten zu erhöhten CsA-Konzentration (Shaw et al., 1987). Eine Übersicht über die Auswirkungen von einigen Medikamenten während einer Therapie mit CsA gibt **Tabelle 1**.

Die Konzentration von CsA im Blut kann außer durch Medikamente auch durch andere Faktoren beeinträchtigt werden. Diarrhoe oder eine Funktionsstörung des Darmes, beispielsweise verursacht durch eine Darmentzündung aufgrund von Hefepilzinfektion des Darmes oder durch Radiochemotherapie nach einer Transplantation, führen zu einer verschlechterten Aufnahme von CsA

nach oraler Verabreichung. Galle und Gallensalze hingegen begünstigen die CsA-Aufnahme, woraus eine Erhöhung der CsA-Konzentration im Blut resultiert (Shaw et al., 1987).

Tabelle 1: Übersicht über die Wechselwirkung von CsA mit anderen Medikamenten (Nach Shaw et al., 1987)

| Medikament | Verwendung | Effekt in Zusammenhang mit CsA |
|----------------------------------|--|-----------------------------------|
| Aminoglykoside | Antibiotika | erhöhte Nephrotoxizität |
| Amphotericin B | Antimykotikum | erhöhte Nephrotoxizität |
| Carbamazepin | Behandlung von Epilepsie; Psychopharmaka | erniedrigte Konzentration im Blut |
| Erythromycin | Antibiotikum | erhöhte Konzentration im Blut |
| Desogestrel; Ethinylestradiol | Empfängnisverhütung | erhöhte Konzentration im Blut |
| Ketoconazol | Antimykotikum | erhöhte Konzentration im Blut |
| Melphalan | Chemotherapeutikum | erhöhte Nephrotoxizität |
| Phenobarbital | Behandlung von Epilepsie; Narkosemittel | erniedrigte Konzentration im Blut |
| Phenytoin | Behandlung von Epilepsie; Behandlung von Herzrhythmusstörungen | erniedrigte Konzentration im Blut |
| Prednison | Immunsuppressivum | erniedrigte Ausscheidung |
| Rifampin | Antibiotikum | erniedrigte Konzentration im Blut |
| Sulphadimidin; Trimethoprim | Antibiotika | erniedrigte Konzentration im Blut |
| Sulfamethoxazol- Trimethoprim | Antibiotika-Kombination | erhöhte Nephrotoxizität |

1.2.3 Zelluläre Aufnahme und Auswirkungen von CsA

Die Bioverfügbarkeit von CsA beträgt ca. 30% (Shaw et al., 1987). Da CsA eine extrem lipophile Substanz ist, liegt es im Plasma zu 98% an Proteine – davon zum großen Teil an Lipoproteine gebunden - und im gesamten Blut zu rund 60% an Erythrozyten gebunden vor.

Untersuchungen von O'Leary et al. (1986) an Modellsystemen für Biomembranen zeigten, dass CsA in dem Modellsystem dieselbe Struktur wie im kristallinen Zustand besitzt und keinen Konformationsänderungen unterworfen ist. In derselben Studie konnten die Autoren nachweisen, dass die Membran von Erythrozyten in ihrer Integrität durch CsA nicht beeinflusst wird, da durch CsA weder eine Hämolyse der Erythrozyten eintritt noch die hypotonische Hämolyse verhindert wird.

Die CsA-Konzentration in den Erythrozyten hängt sowohl von der CsA-Konzentration im Blut als auch von der Konzentration des humanen Serumalbumins (HSA), der Lipid-Konzentration im Plasma und dem Hämatokrit (HKT) ab, wobei die Konzentration an CsA in den Erythrozyten mit steigender Konzentration des CsA im Blut steigt und mit steigender HSA-, Lipid- und HKT-Konzentration absinkt (Shibata et al., 1993). An *in vitro*-Efflux-Studien konnte durch Shibata et al. (1993) ferner gezeigt werden, dass der Transport von CsA aus den Erythrozyten weder durch HSA noch andere Proteine oder Lipide beeinflusst wird. Dies legt die Vermutung nahe, dass in den Erythrozyten gebundenes CsA in diesen verbleibt. Reichel et al. (1994) konnten zeigen, dass pro Erythrozyt maximal $2,6 \cdot 10^5$ Moleküle CsA gebunden werden können. Die Bindungskapazität ist dabei zwischen 10 °C und 42 °C temperatur-unabhängig, während die Aufnahmekinetik des CsA temperatur-abhängig ist (Reichel et al., 1994). Die durch die Autoren dieser Studie berechnete Aktivierungsenergie für den CsA-

Aufnahmeprozess ist mit $1,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ sehr niedrig, sodass ein aktiver Transport von CsA in die Erythrozyten ausgeschlossen werden kann.

In isolierten Ratten-Hepatozyten erfolgt die CsA-Aufnahme durch einfache Diffusion und steigt linear mit der extrazellulären CsA-Konzentration an. Durch Bindung an intrazelluläre Bindeproteine (z.B. Cyclophiline) und Löslichkeit von CsA in der Lipidphase der Membranen kann eine Anreicherung an CsA in den Hepatozyten von bis zum 30-fachen erreicht werden (Ziegler et al., 1988). Die Tatsache, dass CsA mit Lipoproteinen assoziiert, veranlasste Leon et al. (2008) den Zusammenhang zwischen der Expression des Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Rezeptors (LDLr) und der CsA-vermittelten Zytotoxizität zu untersuchen. Die Autoren dieser Studie fanden an transfizierten Zellen heraus, dass hohe Dosen an CsA die LDLr-Proteinexpression herabsetzen und eine Erniedrigung des LDLr zu einer reduzierten Zytotoxizität führt. Die Überexpression an LDLr führt hingegen zu einer erhöhten Aufnahme an radioaktiv-markiertem CsA (Leon et al., 2008). Studien mit CsA an einem *in vitro*-Hautmodell und einem Barrierefunktionsmodell ergaben, dass CsA durch die Oberhaut (Epidermis) und Lederhaut (Dermis) aufgenommen wird. Durch die langsame Permeation gelangen aber hauptsächlich Metaboliten in den Blutkreislauf und die systemische Konzentration an CsA fällt sehr gering aus (Vickers et al., 1995). An humanen Keratinozyten konnte nach Gabe von CsA die Freisetzung von CypB aus dem ER und eine Sekretion von CypB durch die Zellen nachgewiesen werden (Fearon et al., 2011). Die Autoren zeigten dabei, dass die CsA-induzierte CypB-Sekretion zum einen durch die Blockade des Transportes vom ER in den Golgiapparat gehemmt wird und zum anderen unabhängig von CaN ist. Für die Absorption von CsA durch Darmzellen konnte an Caco-2-Zellen eine Beteiligung des P-Glykoproteins an der CsA-Sekretion nachgewiesen werden (Fricker et al., 1996). Die P-Glykoprotein-vermittelte aktive Ausschleusung ist auch für die sehr geringe Permeabilität von CsA durch die Blut-Hirn-Schranke ausschlaggebend, die für ein derartig lipophiles Molekül unerwartet niedrig ist (Sakata et al., 1994).

Nach Sensibilisierung von Ratten mit Ovalbumin führte die Behandlung mit CsA zu einer Herabsetzung der Eosinophile in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und unter der Schleimhaut der Luftwege, sowie der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und einer herabgesetzten Expression von IL-2, IL-4, IL-5 und Interferon (IFN)- γ . Die Gabe von CsA hatte jedoch weder Einfluss auf die Anzahl der Neutrophile noch die Expression von IL-10 oder die Hyperreaktivität der Atemwege (Huang et al., 1999). Für das Hydroxyethyl-Derivat des [D-Ser]⁸-CsA konnte im Gegensatz zum CsA nach topischer Applikation außer einer Reduktion der Eosinophil- und Lymphozytenanzahl in der BAL und im Gewebe, eine reduzierte CD8⁺-T-Zellzahl und die reduzierte Expression von IL-4, IL-5 und IFN- γ nachgewiesen werden (Huang et al., 2002). An Ratten konnte im Modell der Antigen-induzierten Entzündung und Überreaktion der Lungen nachgewiesen werden, dass die lokale CsA-Applikation in die Luftwege eine Reduktion der Antigen-induzierten Anreicherung an Eosinophilen und T-Lymphozyten in den Lungen bewirkt. Dieselben Studien zeigten aber ebenfalls, dass die Konzentration im Plasma und die gesamte systemische Aufnahme nach Verabreichung einer effektiven intratrachealen Dosis nur 26% bzw. 19% des Wertes erreichen, der nach einer vergleichbar effektiven oralen Dosis gemessen wurde (Underwood et al., 2001). Zur Untersuchung der CsA-induzierten Nephrotoxizität führten Lamoureux et al. (2012) massenspektrometrische Studien an humanen embryonischen Nierenzellen (HEK293) durch und fanden nach Behandlung der Zellen mit

CsA eine erhöhte Sekretion an CypA und vor allem eine besonders erhöhte Sekretion von CypB, sowie eine herabgesetzte Regulation von 11 weiteren Proteinen, die für die Zelladhäsion bzw. die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix von Bedeutung sind und als mögliche Biomarker für die durch CsA verursachte Nephrotoxizität von Bedeutung sein könnten.

1.2.4 Nicht-immunsuppressive, PPlase-inhibierende CsA-Derivate

Bereits 1988 beschrieb Twentyman den positiven Effekt von nicht-immunsuppressiven CsA-Analoga auf multidrug-resistente Krebszellen. Bedeutung erlangten jedoch vor allem nicht-immunsuppressive und CypA-bindende CsA-Derivate als mögliche Wirkstoffe in der antiviralen Therapie (Rosenwirth et al., 1994; Ptak et al., 2008; Coelmont et al., 2009; Hopkins et al., 2010). Deren bedeutendste Vertreter sind NIM-811, DEBIO-025 (Alisporivir) und SCY-635 (**Abbildung 7**), welche bereits in klinischen Studien zur Therapie von HCV erfolversprechende Resultate erzielten (Fischer et al., 2010).

[Melle]⁴-CsA (NIM-811), welches nach Fermentation von *Tolypocladium inflatum* unter Zusatz von D-Threonin gewonnen worden ist, wurde 1994 als erstes nicht-immunsuppressives, PPlase-inhibierendes CsA-Derivat beschrieben (Traber et al., 1994). Die Testung auf immunsuppressive Aktivität erfolgte sowohl als *mixed lymphocyte reaction* durch die Inhibition der Proliferation von Lymphozyten als auch durch die Inhibition der Proliferation von Tumorzellen. Desweiteren wurde NIM-811 ebenfalls *in vivo* am *Graft-versus-host*-Modell an Ratten auf immunsuppressive Aktivität getestet (Rosenwirth et al., 1994).

[2-(Dimethylamino)-ethylthio-Sar]³-[(4'-OH)MeLeu]⁴-CsA (SCY-635) wurde erstmals 2003 durch Evers et al. synthetisiert. Die Synthese beinhaltet neben der enzymatischen Hydroxylierung des CsA an MeLeu⁴ die selektive Alkylthiolierung an Sar³. Für die Inhibition der IL2-Produktion in Jurkat-Zellen zeigte SCY-635 eine stark verminderte immunsuppressive Aktivität (Evers et al., 2003).

Das Fehlen einer immunsuppressiven Aktivität zeigte sich für [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (DEBIO-025) darin, dass die Substanz die IL2-Produktion in Jurkat-Zellen nicht inhibiert, im *in vitro*-Modell bzgl. der Proliferation von CD4⁺-Zellen inaktiv ist und die tägliche Gabe von DEBIO-025 an Ratten bei diesen keinen Effekt auf die Immunglobulin M-Produktion hat (Paeshuysse et al., 2006).

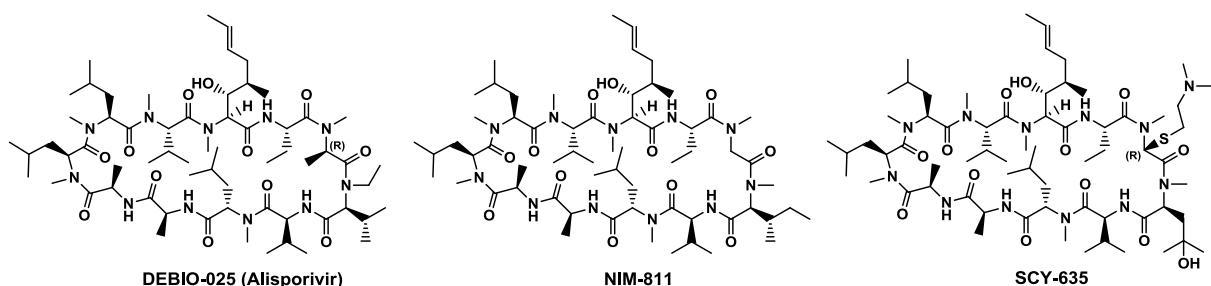


Abbildung 7: Strukturen der nicht-immunsuppressiven CsA-Derivate DEBIO-025, NIM-811 und SCY-635.

1.2.5 Modifizierungen des CsA-Moleküles

Seit über 20 Jahren werden CsA-Analoga durch die vielfältigsten Synthesestrategien erzeugt. Eine Übersicht über die Vielzahl der durchgeführten Modifikationen des CsA-Moleküls gibt **Abbildung 8**.

Via Totalsynthese wurde Abu² durch verschiedene Reste modifiziert (Papageorgiou et al., 1993), das Sarcosin an Position 3 (Sar³) durch D-Ala und das Ala⁷ durch ein Phenylalanin ausgetauscht (Hu et al., 1995). Des Weiteren wurden mittels Totalsynthese das Dihydro-CsA-Analoga, sowie [MeVal]⁴-CsA, [MeAbu]⁴-CsA, [Me(α -methyl)Thr]⁴-CsA und [DehydroAla]⁸-CsA (Wei et al., 2004) und [D-Lys]⁸-CsA hergestellt werden (Colucci et al., 1990). Die Darstellung von [D-Cys]⁸-CsA gelang ausgehend von [D-Ser]⁸-CsA durch eine intramolekulare Schwefeltransferreaktion (Eberle et al., 1993). An die Hydroxylgruppe des [D-Ser]⁸-CsA konnten nach Veretherung verschieden substituierte Azobenzene geknüpft werden, welche durch Licht ausgewählter Wellenlängen schaltbar sind (Zhang et al., 2009). Sie diente nach Veretherung mit Bromessigsäure ebenfalls als Verknüfungsstelle für ein 5,6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-Derivat, eine Oligo-(D-Glu)-Kette bzw. einen mehrfach funktionalisierten Rest aus Trimesinsäure, die mit einer Oligo-(D-Glu)-Kette und über einen gut wasserlöslichen Linker TAMRA und dem CsA-Molekül verbunden ist (Malešević et al., 2010). Das letztere CsA-Derivat gelangt nachweislich nicht in das Zellinnere.

Mit [D-Cys]⁸-CsA als Edukt konnte ein CsA-Derivat mit einem Pseudo-Prolin dargestellt werden (Guichou et al., 2002). An Sar³ sind eine Vielzahl von Substitutionen durch Erzeugung des Enolates mittels Butyllithium (BuLi) oder Lithiumdiisopropylamid (LDA) und anschließender Umsetzung mit Elektrophilen realisiert worden (Seebach et al., 1993, Papageorgiou et al., 1996, Evers et al., 2003, Malouitre et al., 2010). Die allylständige Methylgruppe der MeBmt¹-Seitenkette, sowie MeLeu⁴ und MeLeu⁹ konnten durch mikrobielle Konversion hydroxyliert bzw. demethyliert werden, was der synthetischen Erzeugung von CsA-Metaboliten entspricht (Kuhnt et al., 1996, Papageorgiou et al., 1996, Carry et al., 2004 und Ohta et al., 2005). MeLeu⁴ wurde außerdem via Ringöffnung, Aminosäureaustausch und anschließender Re-Zyklisierung durch verschiedenen *N*-Ethyl-Aminosäuren substituiert (Hubler et al., 2000). Melle¹¹-CsA konnte ebenfalls ausgehend vom CsA durch Ringöffnung und anschließenden Austausch des Valins (Val) in Position 11 dargestellt werden (Belshaw et al., 1995). Aus der selektiven Ringöffnung nach Erzeugung der Thioamide mittels Lawesson's Reagenz, Edman-Abbau und anschließender Kupplung mit der gewünschten Aminosäure konnten Derivate mit Modifizierungen an Val⁵, Ala⁷ bzw. D-Ala⁸ semi-synthetisch gewonnen werden (Eberle et al., 1994, Eberle et al., 2010, Scribner et al., 2010). Bérard nutzte 2008 ein zyklisches Sulfat zur *N*-Alkylierung des D-Ala⁸ und führte ausgehend davon eine intramolekulare Umlagerung mit anschließendem Edman-Abbau durch.

Die MeBmt¹-Seitenkette wurde von Aebi et al. (1990) bzgl. der Methylgruppe an C4 und der Doppelbindung variiert. Die Methylgruppe an C4 wurde sowohl um eine weitere Methylgruppe an C4 ergänzt, durch ein Wasserstoffatom substituiert und in ihrer Konfiguration invertiert. Die Doppelbindung wurde dabei z.T. durch eine gesättigte C-C-Bindung bzw. eine Dreifachbindung ausgetauscht.

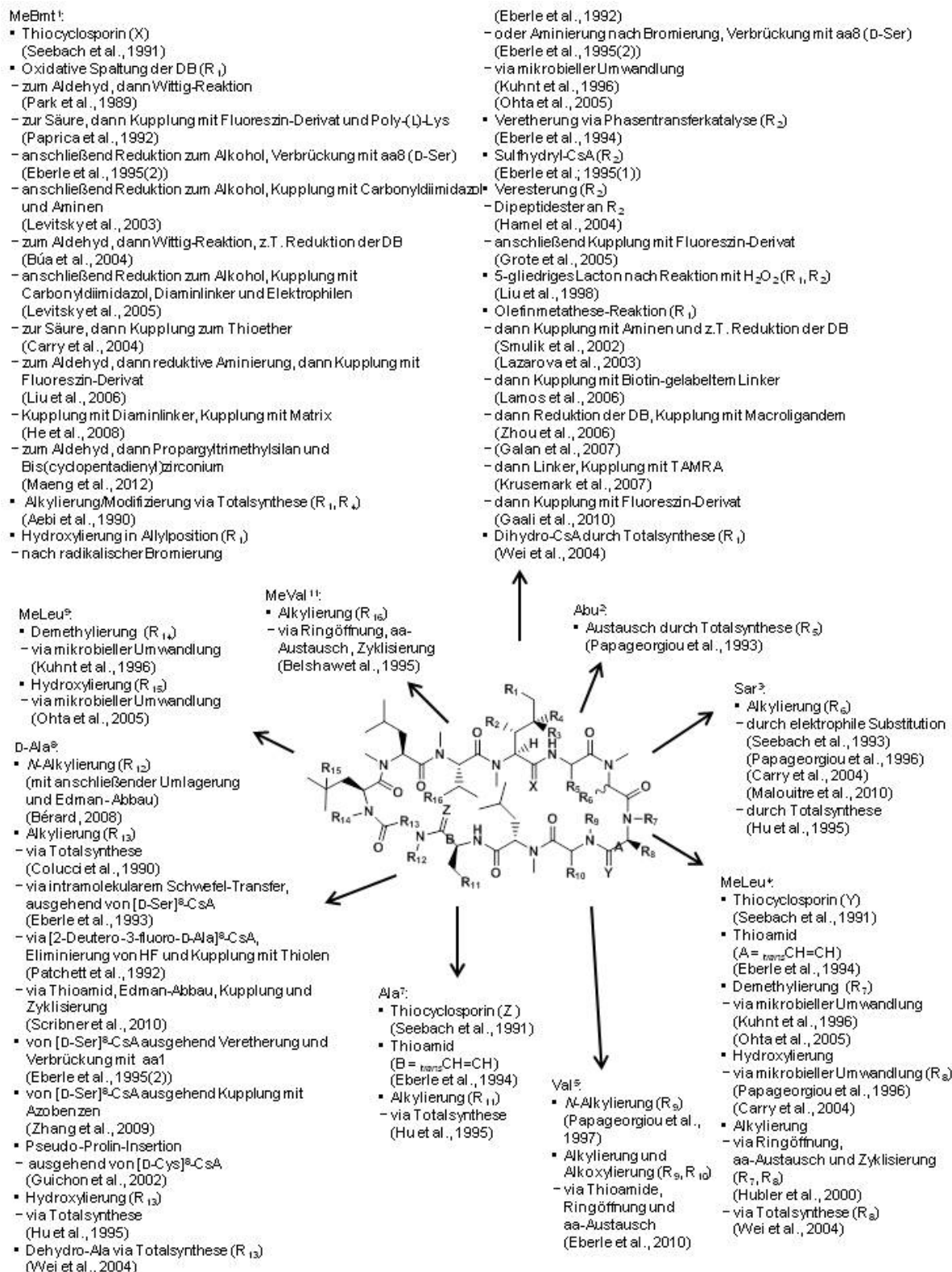


Abbildung 8: Schematische Übersicht über Modifikationen des CsA-Moleküls¹. Für CsA gilt R₁ = CH=CHCH₃; R₂ = OH; R₃ = CH₃; R₄ = H; R₅ = CH₂CH₃; R₆ = H; R₇ = CH₃; R₈ = CH₂CH(CH₃)₂; R₉ = H; R₁₀ = CH(CH₃)₂; R₁₁ = H; R₁₂ = H; R₁₃ = (S)-CHCH₃; R₁₄ = CH₃; R₁₅ = H; R₁₆ = CH₃; A, B = - ; X, Y, Z = O. (aa = Aminosäure; DB = Doppelbindung; TAMRA = 5,6-Carboxytetramethylrhodamin)

¹ Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die veränderten Reste in Klammern angegeben, die anderen entsprechen denen des CsA. Die die Modifikationen überschreibenden Aminosäurebezeichnungen beziehen sich auf das underivatisierte CsA-Molekül.

Die Doppelbindung ermöglicht nach oxidativer Spaltung zum Aldehyd die Wittig-Reaktion durch die Umsetzung mit entsprechenden Yliden, wobei als erster Schritt der Schutz der Hydroxy-Gruppe unerlässlich ist (Park et al., 1989 und Búa et al., 2004). Den so erzeugten Aldehyd nutzte Liu et al. (2006) zur reduktiven Aminierung und daran anschließende Kupplung mit 6-Aminomethylfluorescein, um ein fluoreszierendes CsA-Derivat zu erzeugen, welches die Grundlage für einen fluoreszenzbasierten PPLase-Assay liefert. Der Aldehyd bildet außerdem das Edukt für die organozirkonium-katalysierte stereoselektive Synthese von CsA-Analoga mit konjugierten Doppelbindungen (Maeng et al., 2012).

Die Hydrierung des Aldehyds zum primären Alkohol diente Levitsky et al. (2003) für dessen Veresterung und daran anschließende Kupplungen. Auf diese Weise wurden beispielsweise elektrophile Gruppen an dieser Stelle des Moleküls eingeführt (Levitsky et al., 2005). Eine Oxidation über den Aldehyd hinaus zur resultierenden CsA-Säure verwendeten Paprica et al. (1992) für deren Kupplung mit einem Fluorescein-Derivat bzw. einer Poly-L-Leucin-Kette. Diese Säure bildete ebenfalls die Vorstufe zur Darstellung eines CsA-Thioethers (Carry et al., 2004) (**Abbildung 9**).

Die oxidative Spaltung der Doppelbindung ohne vorherigen Schutz der Hydroxy-Funktion führt zum Lacton, nach dessen Umsetzung mit 1,2-Ethylendiamin ein CsA-Derivat mit einer reaktiven Aminofunktion resultierte, das darüber an ein Harz gebunden werden konnte (He et al., 2008).

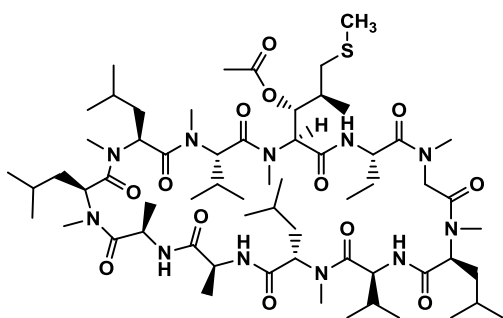


Abbildung 9: Aus der CsA-Säure zugänglicher Thioether. (nach Carry et al., 2004)

Über die radikalische Bromierung der allylständigen Methylgruppe und anschließender Hydrolyse ist der CsA-Metabolit AM1, welcher an der MeBmt¹-Kette in Allyl-Position eine Hydroxy-Gruppe trägt, synthetisch zugänglich (Eberle et al., 1992). Diese allylständige Hydroxyfunktion sowie auch die entsprechende Aminofunktion wurden neben dem durch Ozonolyse und Reduktion des entstandenen Aldehyds erhaltenen kettenverkürzten CsA-Alkohol ausgehend von [D-Ser]⁸-CsA zu verbrückten CsA-Derivaten umgesetzt (Eberle et al., 1995 (2)).

Die Hydroxy-Gruppe der MeBmt¹-Seitenkette konnte via Phasentransferkatalyse unter Verwendung der entsprechenden Chloride oder Bromide selektiv verethert werden (Eberle et al., 1994 (2)). Einschränkend auf mögliche Substituenten wirkten sich hierbei sterische Effekte aufgrund der Faltung des CsA-Moleküls aus. Eberle et al. (1995 (1)) generierten außerdem mittels Lawesson's Reagenz Sulfhydryl-CsA-Derivate aus dieser Hydroxyl-Gruppe. Weiterhin konnte durch die Umsetzung mit Lawesson's Reagenz unter Variation der Reaktionsbedingungen Thioxocyclosporine erzeugt werden, bei denen die Carbonylgruppen von MeBmt¹, MeLeu⁴ und Ala⁷ durch einen Schwefel ersetzt worden sind (Seeberg et al., 1991). Durch die Veresterung der Hydroxy-Funktion mit Bromessigsäure und anschließender Kupplung von Dipeptiden konnten CsA-Derivate mit einer verbesserten

Wasserlöslichkeit als Wirkstoffvorstufen (Prodrugs) generiert werden (Hamel et al., 2004). Grote et al. (2005) nutzten die Veresterung zur Einführung eines Fluorescein-Derivates in diese Position. Durch die Umsetzung des ungeschützten CsA erzeugten Liu et al. (1998) aus der MeBmt¹-Kette fünfgliedrige Lactone.

Die Doppelbindung der MeBmt¹-Seitenkette bietet die Möglichkeit der Umsetzung in einer Olefin Metathese-Reaktion. Sowohl Smulek et al. (2002) als auch Zhou et al. (2006) nutzten diese, um funktionelle Gruppen in Form von Aktivestern bzw. primären Aminen in das CsA-Molekül einzuführen und somit Kupplungen zur Darstellung einer CsA-Affinitätsmatrix zu ermöglichen. Ebenfalls gelang die Verknüpfung mit TAMRA mittels eines Linkers an eine durch diese Reaktion eingeführte Carbonsäurefunktion (Krusemark et al., 2007). Die derartige Modifizierung mit einem aminofunktionalisiertem Rest lieferte die Zwischenstufe für ein Fluorescein-markiertes CsA-Derivat (Gaali et al., 2010). Die Olefin Metathese bildete auch den Ausgangspunkt für die Darstellung eines Gemisches aus Biotin-markierten CsA-Konjugaten mit einem leichten bzw. schweren Linker zur Verbesserung der massenspektroskopischen Bestimmung von Interaktionspartnern des CsA (Lamos et al., 2006). Lazarova et al. (2003) führte mit der Olefin Metathese eine Carbonsäure-Funktion in Allylposition, also ohne jegliche Verlängerung der Kohlenstoffkette, ein und konnte durch die Verwendung verschiedener Malonsäurediester als Reagenzien bzw. Umesterung eine breite Variation an veresterten CsA-Derivaten erhalten und nach Hydrierung der Doppelbindung auch die entsprechenden gesättigten Ester bzw. die freie Säure.

1.3 Zellgängigkeit

Damit Substanzen in eine Zelle hinein gelangen können, müssen diese durch die Zellmembran hindurch transportiert werden. Die Zellmembran besteht im Wesentlichen aus einer Lipiddoppelschicht, in die verschiedene Proteine eingelagert oder integriert sind. Der Transport durch die Zellmembran ist durch passiven Transport und durch aktiven Transport möglich. Während der passive Transport durch Diffusion nur den Konzentrationsausgleich zwischen dem extrazellulären und dem intrazellulären Raum erlaubt, ermöglicht der aktive Transport durch die integralen Membranproteine die Anreicherung von Substanzen gegen ein Konzentrationsgefälle.

Die einfache Diffusion durch die Phospholipiddoppelschicht ist z.B. für Wasser möglich. Der Transport durch substratspezifische Kanalproteine, welche in der Membran Poren bilden, erlaubt das schnelle Ein- und Ausströmen von Wasser und Ionen. Während Wasserkanäle dauerhaft geöffnet sind, erfolgt der Transport in Ionenkanälen durch einen Wechsel zwischen zwei Konformationen des kanalbildenden Proteins.

Carrier-Proteine ermöglichen zum einen die erleichterte Diffusion (auch passive, Carrier-vermittelte Diffusion genannt) für ‚Nicht-Ionen‘ und Glucose und zum anderen den aktiven Transport durch die Zellmembran, wobei zwischen primär aktivem und sekundär aktivem Transport unterschieden wird.

Ionen-Pumpen, die aus einer Proteinkette oder aus mehreren Proteinuntereinheiten von membranintegrierten Proteinen bestehen, erlauben einen äußerst selektiven Transport des jeweiligen Ions, da dieses sehr genau in den durch die Proteinkette bzw. Untereinheiten gebildeten Spalt im Transmembran-Bereich passen muss. Die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) unter Protein-Phosphorylierung der Ionenpumpe führt zu einer

Konformationsänderung des Proteins, sodass das Ion in den wässrigen Spalt eindringen und nach ‚Umklappen‘ der Protein-Ketten auf die andere Seite der Membran gelangen kann. Nach jeder Pumpleistung folgt die Dephosphorylierung des Proteins. Ein Beispiel für eine Ionenpumpe ist die Na^+/K^+ -Pumpe (Na^+/K^+ -ATPase), welche Na^+ gegen ein Konzentrationsgefälle aus der Zelle und K^+ in Zelle hinein befördert (Antiport) und somit die Voraussetzung für das Membranpotential der Zelle liefert. Ein weiteres Beispiel ist die Ca^{2+} -ATPase, die Ca^{2+} aus der Zelle pumpt (Uniport) und dadurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration niedrig hält. Ohne einen direkten Energieverbrauch verläuft beispielsweise die Aufnahme von Glukose durch die Epithelzellen im Darm, die gemeinsam mit der Aufnahme von Na^+ erfolgt (Symport). Im Fall eines solchen sekundär aktiven Transportes wird nur indirekt ATP verbraucht, wenn Na^+ wieder aus der Zelle hinaus gepumpt wird (Löffler et al., 2007; Plattner et al., 2011).

Substanzen, welche die Zellmembran nicht über spezifische Transporter passieren können, müssen durch die Lipiddoppelschicht diffundieren. Die Zellmembran ist undurchlässig für geladene hydrophile Moleküle und Makromoleküle (Proteine, Polysaccharide und Nucleinsäuren). Dies ist sinnvoll, um den unkontrollierten Aus- und Einstrom von Nährstoffen und besonders von Zwischenprodukten des zellulären Stoffwechsels zu unterbinden (Löffler et al., 2007).

Die Durchlässigkeit der Membran für einen potentiellen Wirkstoff wird folglich durch dessen Lipophilie und elektronische Eigenschaften beeinflusst.

Besonders deutlich wird dies am Beispiel der Blut-Hirn-Schranke. Polare Verbindungen wie Adrenalin und Dopamin können die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und wirken nur auf den Kreislauf. Ephedrin, ein Molekül mittlerer Polarität, wirkt sowohl peripher als auch im Gehirn. Amphetamin und 3,4-Methyldioxyamphetamin (MDMA, „Ecstasy“), beides schwache Basen, sind in ihren Neutralformen unpolar und dadurch geeignet die Blut-Hirn-Schranke leicht zu überwinden und ihre Wirkung auf das Zentralnervensystem auszuüben (**Abbildung 10**). Eine Ausnahme bildet die sehr polare Aminosäure L-Dopa, welche vom Aminosäure-Transporter aktiv durch die Membran ins Gehirn befördert wird (Klebe, 2009).

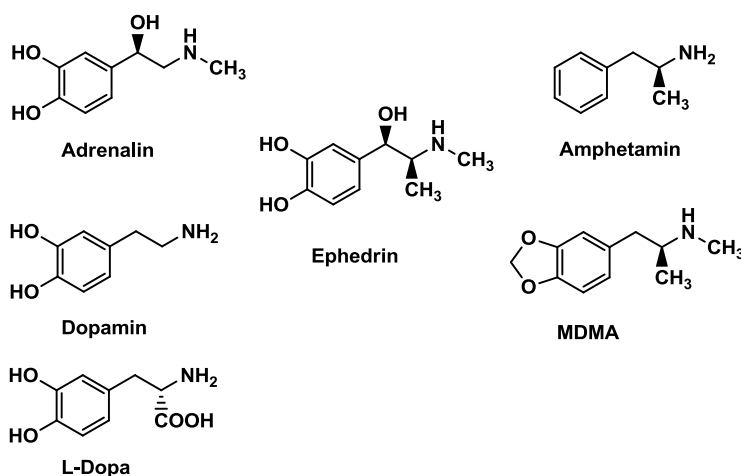


Abbildung 10: Strukturen von als Neurotransmitter wirksamen Verbindungen mit unterschiedlicher Polarität (nach Klebe, 2009)

Des Weiteren ist für einige Stoffe eine zelluläre Aufnahme durch Endozytose möglich. Potentielle Wirkstoffe können z.B. in einer durch ein Polymer gebildeten Mizelle durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden und somit die Zellmembran überwinden (Chang et al., 2010). Kationisch

modifiziertes Albumin kann durch Endozytose schneller in Zellen aufgenommen werden (Shen et al., 1978) als natives Albumin und sogar die Blut-Hirn-Schranke passieren (Kumagai et al., 1987). Die sogenannten *cell-penetrating peptides*, welche den Transport von Makromolekülen z.B. für Viren durch Endozytose erleichtern, sind meistens Polykationen (Sheng et al., 2009).

Behr et al. (1995) konnten durch vorherige Applikation kationischer Aminosäuren die Aufnahme von radioaktiv-markierten Antikörpern in die Nieren reduzieren. Für ein radio-markiertes Minigastrin-Derivat mit sieben sauren Aminosäuren konnte eine verringerte Aufnahme in die Nierenzellen nach vorheriger Applikation von Poly-L-Glutamin mit einer Kettenlänge von fünf oder mehr L-Glu erreicht werden (Béhé et al., 2005).

Durch die Kombination aus einem anionischen Rest und einem lipophilen Molekül können Substanzen dagegen extrazellulär gehalten werden, wie Malešević et al. (2010) am Beispiel eines mit einer Oligo-D-Glutaminsäurekette am Cyclosporin zeigen konnten.

1.4 Cyclophiline

1.4.1 Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Die Aminosäuren in Proteinen und Peptiden sind durch Peptidbindungen miteinander verknüpft, welche nach Wasserabspaltung der Aminogruppe einer Aminosäure und der Carbonylgruppe einer weiteren Aminosäure entstehen und formal Säureamid-Bindungen darstellen. Die Carbonylkohlenstoffatome bilden zusammen mit den Amidstickstoffatomen und den C $_{\alpha}$ -Atomen das Peptidrückgrat. Durch den planaren Charakter der Peptidbindung ergeben sich für deren Torsion nur zwei Strukturen mit Energieminima - bei einem Torsionswinkel von 0° (*cis*) und bei einem Torsionswinkel von 180° (*trans*), die durch eine Rotationsbarriere von 75 kJ/mol separiert werden (**Abbildung 11A**) (Fischer et al., 2003). Diese Rotationsbarriere kann durch enzymatische Katalyse mittels Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen), deren Existenz erstmals 1984 nachgewiesen worden ist (Fischer et al., 1984), auf ≤ 50 kJ/mol herabgesetzt werden (**Abbildung 11B**).

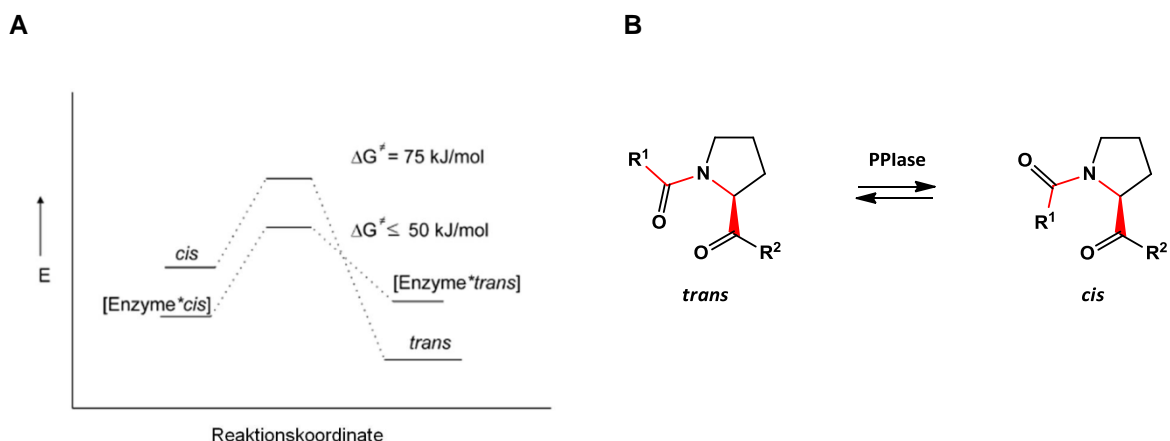


Abbildung 11: A) Diagramm des Übergangszustandes für die unkatalysierte und die enzym-katalysierte *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindung. Die relativen freien Energien sind auf ein an CypA gebundenes Tetrapeptid bezogen. (Nach Fischer et al., 2003) B) *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Peptidbindung.

In den meisten Fällen ist die *trans*-Konformation energetisch rund $15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ begünstigt, sodass die Peptidbindungen zu (fast) 100% in dieser vorliegen (Scherer et al., 1998). Eine Ausnahme bilden die Peptidyl-Prolyl-Bindungen, welche durch das sterisch gehinderte Prolin (Pro) einen *cis*-Gehalt von bis zu 50% aufweisen. Verzeichnen ‚normale‘ sekundäre Amidbindungen für die Isomerisierung von *cis* zu *trans* Geschwindigkeitskonstanten von $k_{cis \rightarrow trans} \sim 0,3 - 2 \text{ s}^{-1}$, so verläuft die der Peptidyl-Prolyl-Bindung mit $k_{cis \rightarrow trans} \sim 8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ um gut drei Zehnerpotenzen langsamer (Fischer et al., 1984; Scherer et al., 1998). Die Rückfaltungsrate der leichten Kette des murinen Immunoglobulins wird durch PPlasen-Katalyse bereits bei einem molaren Verhältnis von 1:20 (PPlase/leichte Kette) verdoppelt. Ebenso verhält es sich mit dem S-Protein, einem Fragment der bovinen RNase A, dessen Rückfaltung durch den Einsatz von PPlase im Verhältnis 1:5 (PPlase/Protein) in ihren beiden langsamen Faltungsschritten um das Zweifache beschleunigt wird (Lang et al., 1987). PPlasen fungieren hierbei als Faltungshelferenzyme in der *native-state*-Isomerisierung von Proteinen und sind somit in vielfältigen zellulären Prozessen involviert (Ivery, 2006). Nach ihren strukturellen Gemeinsamkeiten werden sie in drei große Gruppen eingeteilt: Je eine PPlase-Familie bilden die FK506-bindenden Proteine (FKBP), welche größtenteils durch FK506/Tacrolimus und ebenfalls durch Rapamycin/Sirolimus inhibiert werden, und die Parvuline, inklusive deren humanem Homologen Pin1. Die dritte PPlase-Familie stellen die Cyclophiline (Cyp) dar, deren Inhibition durch Cyclosporin A und Sanglifehrin A (**Abbildung 12**) erreicht wird (Galat, 1993; Marks, 1996; Ivery, 2000; Fanghänel et al., 2004). Obwohl bereits 1984 sowohl die PPlase-Eigenschaft als auch die Affinität für Cyclosporin A gefunden worden sind, wurde erst fünf Jahre später der Nachweis erbracht, dass es sich bei dem isomerase-aktiven Protein aus Schweinenieren und CypA um ein und dasselbe Protein handelt (Fischer et al., Nature 1989).

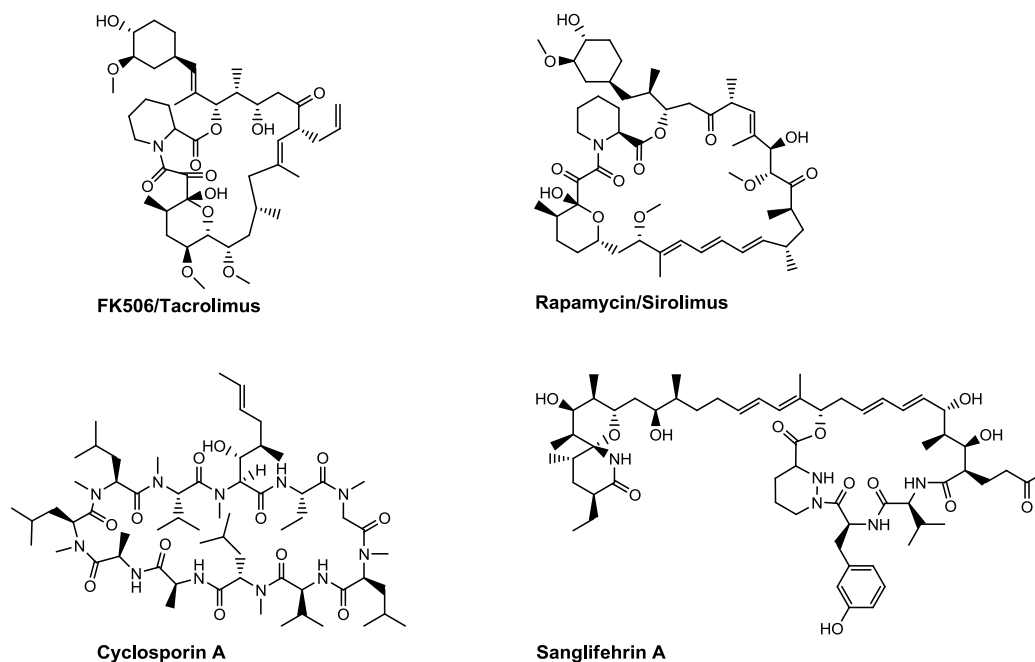


Abbildung 12: Strukturen von FK506, Rapamycin, Cyclosporin A und Sanglifehrin A.

Die Cyclophiline, die sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Zellen gefunden worden sind, und von denen für den Menschen bisher 18 beschrieben wurden, sind in vielen Zellkompartimenten vorhanden, wie z.B. im Cytosol, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern und in den Mitochondrien. Diese ubiquitäre Verbreitung (Ryffel et al., 1991) geht mit einer Vielzahl an physiologischen Funktionen einher. Eine Übersicht über die am besten untersuchten menschlichen Cyclophiline (Wang et al, 2005), ihre Lokalisierung und ihre wesentliche Funktion gibt **Tabelle 2** wieder.

Tabelle 2: Übersicht über die am besten erforschten humanen Cyclophiline

| Cyclophilin | Lokalisation | Funktion | Literatur |
|-------------------------|--|---|--|
| CypA (Cyp18) | Zytosol | Gentranskription | Harding et al., 1986 |
| CypB (Cyp23) | ER | Interferon-Regulation | Price et al., 1991 |
| CypC | ER | <i>(unbekannt)</i> | Schneider et al., 1994 |
| PPID/Cyp40 ² | Cytosol | Teil des multimeren Steroidrezeptor-Komplexes | Kieffer et al., 1992 |
| CypE | Nucleus/Spliceosom | evtl. an RNA-Splicing beteiligt | Mi et al., 1996 |
| CypF ³ | Mitochondrien | Apoptose; mPT-Pore | Connern et al., 1992 Waldmeier et al., 2003 |
| CypNK | Zelloberfläche humaner NK-Zellen | möglicherweise Teil eines Komplexes zur Tumorerkennung | Anderson et al., 1993 |
| COAS2 (PPIL4A) | Zytoplasma | <i>(unbekannt)</i> | Meza-Zepeda et al., 2002 |
| CypL1 (PPIL1) | Spliceosom | evtl. an RNA-Splicing beteiligt | Xu et al., 2006 |
| CypJ (PPIL3) | Zytoplasma/Spliceosom | evtl. an RNA-Splicing beteiligt | Zhou et al., 2001 |
| CypH | Nucleus Speckles | wirkt an RNA-Splicing mit | Teigelkamp et al., 1998 |
| PPIL4 | Nucleus | <i>(unbekannt)</i> | (pdb: Q8WUA2) |
| Cyp60 (PPIL2) | Nucleus | <i>(unbekannt)</i> | (pdb: Q13356) |
| PPWD1 | Spliceosom | evtl. an RNA-Splicing beteiligt | Davis et al., 2008 |
| CypG | Nucleus-Matrix, Nucleus Speckles | evtl in Proteinfaltung und –transport involviert; evtl. an RNA-Splicing beteiligt | Lin et al., 2004 |
| RanBP2 | nuclearer Porenkomplex | in den transportfaktor-vermittelten Kernimport involviert; Komponente des nuclearen Exportweges | Kirsh et al., 2002 Pichler et al., 2002 |
| PPIase CWC27 | Nucleus | <i>(unbekannt)</i> | (pdb: Q6UX04) |
| PPIL6 | <i>(nur auf dem Transkriptionslevel bekannt)</i> | <i>(unbekannt)</i> | (pdb: Q8IXY8) |

² Da Cyps in der Regel auch nach ihrem Molgewicht benannt sind, ist an dieser Stelle die für dieses Cyp weitverbreitete Bezeichnung Cyp40 zusätzlich angegeben. Um die Cyp-Nomenklatur innerhalb dieser Arbeit einheitlich zu halten, wird fortan jedoch ausschließlich die in der Proteindatenbank geführte Bezeichnung CypD verwendet.

³ Das mitochondrial vorkommende Cyp wird in der Literatur vielfach als CypD deklariert. Da dies nicht ganz richtig ist und, um Verwechslungen mit dem ‚richtigen‘ CypD entgegen zu wirken, wird das mitochondriale Cyp in dieser Arbeit als CypF bezeichnet, was auch in Übereinstimmung mit der uniprot-Proteindatenbank ist.

Cyclophiline konnten nicht nur in den Zellen sondern auch extrazellulär nachgewiesen werden und stehen in Zusammenhang mit zahlreichen Krankheiten. Erhöhte Werte an extrazellulären CypA und CypB wurden beispielsweise bei verschiedenen Entzündungskrankheiten gefunden. Hierbei induzieren diese u.a. die Chemotaxis unterschiedlichster humaner Leukozytenpopulationen, wie Monozyten, Eosinophile und Neutrophile.

1.4.2 Humane Cyclophiline in Krankheiten

1.4.2.1 Cyclophiline in viralen Erkrankungen

Wichtige Wechselwirkungen von Wirts-Cyclophilinen mit viralen Proteinen konnten für eine Vielzahl von Viren nachgewiesen werden, z: B. für das Humane Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1), das Hepatitis C-Virus (HCV), das Influenza A Virus, das Vesicular stomatitis virus (VSV) und für den Erreger des schweren akuten Atemwegssyndroms (englisch *severe acute respiratory syndrome* = SARS), dem SARS-assoziierten Coronavirus (SARS-CoV) (**Tabelle 3**).

Tabelle 3: Vorkommen und Funktion von Cyclophilinen in verschiedenen viralen Erkrankungen

| Virus | involviertes Cyclophilin | Funktion | Literatur |
|---|--------------------------|---|--|
| Humanes Immundefizienz Virus-1 (HIV-1) | CypA | Viruspartikelbildung und Einbau in die Wirtszelle Stimulation der Replikation durch hohe Cyp-Konzentrationen WW mit viralem Protein R | Franke et al., 1994 Luban, 1996 Sherry et al., 1998 Bosco et al., 2002 Zander et al., 2003 |
| Hepatitis C-Virus (HCV) | CypA | negative Regulation der Replikation | Yang et al., 2008 Chatterji et al., 2009 Kaul et al., 2009 |
| | CypB | Replikation des HCV-Genomes durch Regulation der RNA Polymerase NS5B | Watashi et al., 2005 Hanoulle et al., 2009 |
| Vesicular stomatitis virus New Jersey serotype (VSV-NJ) | CypA | wichtig für Replikation durch Wechselwirkung mit Nucleocapsid | Bose et al., 2003 |
| Influenza A Virus | CypA | Wechselwirkung mit Matrix-Protein beschränkt Replikation | Liu et al., 2009 |
| | CypE | Inhibition von Replikation und Transkription | Wang et al, 2011 |
| SARS-Coronavirus | CypA, CypB, CypG, CypH | Wechselwirkung mit Nsp1 | Pfefferle et al., 2011 |
| Humanes Papillomavirus (HPV16) | CypA, CypB | CypA und CypB begünstigen jeweils unterschiedliche Schritte in der Infektion | Bienkowska-Haba et al., 2009 |

(RNAi = RNA-Interferenz)

Im HIV-1 erfolgt die Bindung und der Einbau von CypA vermittelt durch die Prolin-reiche Region des viralen Gag-Polyproteins, wobei vor allem die *trans*-Konformation des Pro90 im Capsidprotein des Virus einen entscheidenden Einfluss auf die Cyclophilin-Bindung hat (Franke et al., 1994, Gamble et

al., 1996). Der Einbau von CypA ist nicht für die Virionbildung wichtig, aber er bildet eine notwendige Voraussetzung für die Ausbildung infektiöser Viruspartikel. Hierbei ist mehr die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen dem viralen Capsidprotein und CypA entscheidend, als die PPlase-Eigenschaft des CypA (Luban, 1996). Trotzdem spielt diese eine nicht zu vernachlässigende Rolle, da eine effektive Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung der Gly⁸⁹-Pro⁹⁰-Bindung in der N-terminalen Domäne des viralen Capsids nachgewiesen werden konnte (Bosco et al., 2002). *In vitro* konnten auch Bindungen des HIV-Gag-Polyproteins an CypB und CypC nachgewiesen werden, welche aber durch deren Lokalisation im ER als relevante Bindungspartner vernachlässigt werden können (Franke et al., 1994). Des Weiteren bildet das virale Protein R des HIV-1, ein Hilfsprotein, das im Lebenszyklus des Retrovirus' mehrere wichtige Funktionen inne hat, einen möglichen Interaktionspartner für CypA, wobei besonders der ungewöhnlich hohe *cis*-Gehalt der Prolin-Reste im N-Terminus des viralen Proteins R eine funktionelle Wechselwirkung bzgl. der Isomeraseaktivität des CypA vermuten lässt (Zander et al., 2003). Sherry et al. (1998) konnten am Beispiel von T-Zellen zeigen, dass die HIV-1-Infektion durch anti-CypA-Antiserum inhibiert wird und eine hohe CypA-Konzentration zu einer Zellaktivierung führt, die mit einer erhöhten Virus-Produktion einher geht.

Außer für das HIV spielen Cyclophiline auch für das HCV eine wichtige Rolle. So wird dessen Replikation maßgeblich durch CypA beeinflusst. Dieses bindet über das aktive Zentrum an das *nonstructural protein* (NS)5A. Wie an Studien mit der NS5A D2-Domäne gezeigt werden konnte, spielen die Prolin-Reste des viralen Peptides in Bezug auf die Stärke der Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle (Hanouille et al., 2009). Ebenfalls nachgewiesen ist eine Interaktion zwischen CypA und der RNA Polymerase NS5B (Yang et al., 2008). Ein weiteres Target für CypA stellt - neben NS5A und NS5B - möglicherweise das NS2 dar, welches sich selbst vom NS3 abspaltet und evtl. bei der anschließenden Faltung durch CypA unterstützt wird (Kaul et al., 2009). CypA ist demnach als wichtiger Co-Faktor in die Replikation von HCV involviert und folglich für dessen Infektiosität von Bedeutung. Wofür CypA während der Virus-Replikation genau benötigt wird und inwiefern die PPlase-Eigenschaft dabei eine Rolle spielt, bedarf jedoch noch weiterer Forschungen. Zur Bedeutung von CypB sowie anderer Cyclophiline (CypC, CypD, CypE, CypF und CypH) in Zusammenhang mit HCV existieren gegensätzliche Ergebnisse. So konnte für CypB neben der Bindung an NS5A, eine Wechselwirkung mit NS5B nachgewiesen werden, die zur Stimulation der RNA-Bindungsaktivität führt und somit zur Replikation des HCVs beitragen könnte (Watashi et al., 2005), jedoch in Experimenten anderer Gruppen nicht bestätigt wurde (Ishii et al., 2006). Ursachen für diese widersprüchlichen Ergebnisse liegen womöglich in der Verwendung verschiedener HCV-Stämme bzw. Zellen oder Replikationssystemen oder in der Tatsache begründet, dass CypA *in vivo* um ein vielfaches höher exprimiert wird als alle anderen Cyclophiline, so dass *in vitro* gefundene Wechselwirkungen *in vivo* keinen nennenswerten Beitrag mehr zu leisten vermögen (Yang et al., 2008; Chatterji et al., 2009).

Ähnlich verhält es sich mit CypB im Influenza A Virus: Auch hier zeigte sich *in vitro* eine Bindung an das virale Matrix Protein M1, für die weder nach Überexpression noch nach Knockdown ein Einfluss auf die Replikation gefunden worden ist. Für CypA hingegen fanden dieselben Studien nicht nur die Wechselwirkung mit M1, sondern konnten dessen Wirkung als negativer Regulator der Virus-Replikation nachweisen. Die Bindung an M1 vermittelt vermutlich die Inkorporation des CypA in die Viruspartikel und wirkt sich so auf deren Infektiosität aus. An transfizierten Zellen wurde dargelegt,

dass die Isomerase-Aktivität nicht für die Virus-Replikation notwendig ist, was eine Chaperon-Aktivität des CypA bzgl. M1 vermuten lässt (Liu et al., 2009). Als ein weiterer negativer Regulator des Influenza A Virus wirkt CypE. Es bindet an das virale Nucleoprotein (NP), welches nach einer Infektion mit CypE zusammen im Nukleus co-lokalisiert ist und verhindert somit dessen für Replikation und Transkription wichtige Aggregation. Auch eine PPIase-defekte Variante zeigte die Inhibition der viralen Replikation und liefert somit den Beweis dafür, dass die antivirale Aktivität des CypE von dessen PPIase-Aktivität unabhängig ist (Wang et al, 2011).

Pfefferle et al. (2011) identifizierten verschiedene Cyclophiline und andere Immunophiline als Bindungspartner für das *non-structural protein* (Nsp) 1 des Coronavirus (CoV). Dessen Expressierung übt über die Aktivierung des *nuclear factors of activated T cells* (NFAT) Einfluss auf die IL-2-Promoter aus. Die biologische Funktion zwischen Nsp1 und seinen zellulären Partnern ist jedoch noch nicht aufgeklärt und die Beziehung von Nsp1 im viralen Kontext konnte bisher nicht durch Knockout-Experimente o.ä. bestätigt werden.

Für Humane Papilloma Viren des Types 16 (HPV16) konnte nach Knockdown von CypA und CypB eine reduzierte Infektiosität nachgewiesen werden, wobei der Effekt im CypB-Knockdown stärker ausfiel. Eine Blockade der PPIase-Aktivität von CypB führt zu einer erhöhten Reaktivität der aufgenommenen Viruspartikel. CypB auf der Zelloberfläche wird für den Eintritt und den Transport von HPV16 in der Wirtszelle benötigt. Der kombinierte und separate Knockdown von CypA und CypB legt einen Beitrag der beiden Cyclophiline an verschiedenen Stellen der Infektion nahe, wobei der CypA-benötigende Schritt noch nicht aufgeklärt werden konnte. Ein mögliches Substrat stellt hierbei das kleinere Capsid-Protein L2 dar (Bienkowska-Haba et al., 2009).

Als Bindungspartner für das Vesicular stomatitis virus (VSV) ist CypA ein wichtiger Faktor für die Replikation dieses Virus. Unterschiede finden sich in den beiden verschiedenen Serumtypen VSV New Jersey (VSV-NJ) und VSV Indiana (VSV-IND): Eine Inhibition der enzymatischen Aktivität bewirkt eine starke Reduktion der Gen-Expression des VSV-NJ, nicht aber der des VSV-IND. Abgesehen davon interagiert CypA mit dem Nukleocapsidprotein von sowohl VSV-NJ als auch VSV-IND und wird in die freigesetzten Viruspartikel beider eingebaut. Vermutlich wirkt es dabei als Chaperon und trägt so zum Erreichen einer optimalen Transkription des viralen Genoms bei (Bose et al., 2003).

1.4.2.3 Cyclophiline in neuronalen Erkrankungen

Zellstress oder Schädigungen, die den Zelltod verursachen können, stehen in engem Zusammenhang mit dem mitochondrialen Permeabilitätsübergang (*mitochondrial permeability transition* MPT). Wenn die innere Mitochondrienmembran durchlässiger wird, schwellen die Mitochondrien an und es werden Apoptose-auslösende Faktoren durch die Zelle freigesetzt. Die MPT-Pore besteht aus der äußeren Membran, der inneren Membran und der mitochondrialen Matrix, deren wesentlicher Bestandteil CypF ist. Da die Inhibition des MPT einen therapeutischen Ansatz für die Behandlung neurodegenerativer Krankheiten, Schlaganfall, Trauma u.a. bieten könnte, stellt die Inhibition von CypF und die damit verbundene Verhinderung der Öffnung der MPT-Pore einen möglichen Weg dorthin dar (Waldmeier et al., 2003). Die MPT-Pore ist außerdem am Ca^{2+} -Ausfluss aus den Mitochondrien beteiligt. Ein Überschuss an axonalem Ca^{2+} wird als mögliche Ursache der Multiplen Sklerose vermutet. Im Modell der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) konnte an CypF-Knockout-Mäusen gezeigt

werden, dass Mitochondrien in Neuronen ohne CypF erhöhte Ca^{2+} -Werte besser vertragen und Resistenzen gegen Stoffe zeigen, die als ursächlich für die axonale Degeneration, wie sie in EAE und Multipler Sklerose beobachtet wird, aufweisen (Forte et al., 2007). Abgesehen von CypF konnte auch für CypA ein Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen über eine Beziehung zwischen CypA und dem Apolipoprotein E (APOE) aufgezeigt werden. So wurde an APOE-defizienten Mäusen und an solchen, die nur die Isoform APOE4, welche als ein genetischer Risikofaktor für die Alzheimer-Krankheit gilt, exprimieren, ein Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke beobachtet, der CypA-vermittelt via *nuclear factor $\kappa\beta$* (NF- $\kappa\beta$) und MMP-9 verläuft (Bell et al., 2012). APOE3 hingegen, das nicht am funktionalen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist, zeigt eine Wechselwirkung mit dem Rezeptorprotein LPR1 auf der Perizytenoberfläche und beugt so Entzündungsreaktionen vor (Carmeliet et al., 2012). Über das Zusammenspiel zwischen vaskulären Effekten und dem Nervensystem haben Cyclophiline so evtl. auch Einfluss auf andere neurodegenerative Erkrankungen. Erhöhte CypA-Werte wurden außerdem in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit amyotropher Lateralsklerose gefunden, sodass CypA als möglicher Biomarker für die rechtzeitige Erkennung dieser Krankheit dienen kann (Nardo et al., 2011).

1.4.3 Extrazelluläre Cyclophiline, ihre Rolle in Entzündungskrankheiten und vasculären Erkrankungen und ihre Interaktion mit CD147

1.4.3.1 Die Rolle der extrazellulären Cyclophiline CypA, CypB und CypC in Entzündungskrankheiten und vasculären Erkrankungen

Neben den bisher erwähnten intrazellulären Cyclophilinen sind in verschiedenen Entzündungskrankheiten auch erhöhte Werte an extrazellulären Cyclophilinen gefunden worden. Über erhöhte Cyclophilin-Level wurde beispielsweise im Serum von Patienten mit schwerer Blutvergiftung (Tegeeder et al., 1997), in den Gelenkflüssigkeiten von Patienten mit rheumatischer Arthritis (Billich et al., 1997) und in Zellen der glatten Muskulatur der Blutgefäße (*vascular smooth muscle cells* VSMCs) als Antwort auf Sauerstoffstress (Jin et al., 2000) berichtet. Außer dem am verbreitetsten vorkommenden und sekretierten CypA wird nachweislich auch CypB (Allain et al., 1995) sowie CypC (Peng et al., 2009) ins Plasma freigesetzt. Eine entscheidende Rolle spielen extrazelluläre Cyclophiline dabei vor allem als Vermittler von Entzündungsfaktoren (Bukrinsky, 2002). So löst CypA im Mauspfoten-Assay nach Injektion von Lipopolysaccharid eine Entzündungsantwort mit Neutrophilen als vorherrschendem Zelltypus aus (Sherry et al., 1992). Außer für Neutrophile konnte *in vitro* auch eine chemotaktische Aktivität für Eosinophile nachgewiesen werden, deren Peroxidase-Aktivität durch CypA freigesetzt wird (Xu et al., 1992). An Hasen-Blastozysten, die oxidativem Stress in Form von 20% O_2 ausgesetzt waren, wurde eine erhöhte PPIase-Aktivität durch CypA gefunden. Möglicherweise ist CypA dabei für die Faltung und Reifung neuer Proteine zum Schutz gegen Sauerstoffstress von Bedeutung (Santos et al., 2000). Durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermittelter oxidativer Stress bewirkt des Weiteren eine Wachstumsstimulation der Zellen der glatten Muskulatur der Blutgefäße, was als ursächlich für Bluthochdruck, Atherosklerose und andere kardiovaskuläre Erkrankungen betrachtet wird (Satoh et al., 2010 (2)). Muskelzellen, die ROS wie z.B. Wasserstoffperoxid, Superoxid O_2^- oder Hydroxyl-Radikal HO^\bullet , ausgesetzt wurden, sekretierten CypA verbunden mit der Aktivierung der ERK1/2, erhöhter DNS-Synthese und verminderter Apoptose.

Antioxidantien verhindern hingegen die CypA-Sekretion komplett, wie am Beispiel von *N*-Acetylcystein gezeigt werden konnte (Jin et al., 2000), sodass ROS als deren Ursache bestätigt wurde. Außerdem führte eine Inhibition der PPLase-Aktivität von CypA zu einer verminderten ERK1/2-Aktivierung, woraus auf deren Notwendigkeit für die Vermittlung der ERK1/2-Aktivität geschlossen werden kann. In dem mutmaßlichen Weg der ROS-induzierten CypA-Freisetzung sind neben der ERK1/2 auch die Kinasen Akt und Jak involviert (Satoh et al., 2010 (1)). Die Zusammenhänge zwischen der CypA-Expression und der Gefäßdeformation bzw. Umbildung nach Verletzung der Halsschlagader konnten an CypA-Knockout-Mäusen und CypA-überexprimierenden Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen bestätigt werden (Jin et al, 2000 und Satoh et al., 2008). Des Weiteren sind die Rho GTPasen (RhoA, Cdc42 und Rac1) für die Sekretion von CypA nötig, was durch die Inhibition der ROS-induzierten CypA-Sekretion durch die Expression negativer Mutanten für RhoA und Cdc42 bewiesen werden konnte (Satoh et al., 2010 (2)). Die ROS-induzierte CypA-Sekretion kann als Biomarker für Artherosklerose dienen, da eine Korrelation zwischen hohen CypA-Werten im Plasma von Patienten mit koronaren Herzerkrankungen und der Häufigkeit an einer akuten Form der Erkrankung nachgewiesen worden ist (Satoh et al., 2012). Einen weiteren Beitrag zu entzündlichen Veränderungen der Gefäßwände liefert der CypA-Rezeptor CD147, dessen erhöhte Expression mit einer verstärkten Plättchenaktivität einhergeht. Die CD147-vermittelte Aktivierung von NK- κ B führt dann zu einer erhöhten Sekretion von MMP-9 durch Monozyten (Schmidt et al., 2008). In Übereinstimmung damit zeigten Weit et al. (2010), dass die Aktivierung von NK- κ B und die begünstigte Freisetzung von IL-6 in Monozyten CypA-abhängig ist und die durch CypA erreichten Effekte durch Knockdown oder Neutralisation von CD147 mittels CD147-Antikörpern blockiert werden. Erhöhte CypA-Konzentrationen wurden außerdem im Serum von Patienten mit schwerer Blutvergiftung und in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatischer Arthritis gefunden (Tegeuder et al., 1997; Billich et al., 1997). Im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis konnte ein Zusammenhang zwischen extrazellulärem CypA und der CD147-vermittelten Chemotaxis aufgezeigt werden. Deren Inhibition durch anti-CD147-Antikörper trägt - bedingt durch den blockierten Zustrom von Neutrophilen, Monozyten und T-Zellen - nachgewiesenermaßen zu einer verzögerten und weniger schweren Entzündung der betroffenen Gelenke bei und kann diese *in vivo* zu mehr als 75% reduzieren (Damsker et al, 2008). Extrazelluläre Cyclophiline spielen auch bei der allergischen Entzündungsreaktion der Lunge eine Rolle. Arora et al. (2005) konnten dafür die Wechselwirkung von CypA mit CD147 *in vivo* nachweisen und fanden dabei eine höhere CD147-Expression auf zirkulierenden Neutrophilen als auf den Neutrophilen im Gewebe, sodass CD147 eine wichtige Rolle in der Leukozytenrekrutierung während der Entzündungsantwort zukommt. Die Autoren zeigten weiterhin, dass die Anzahl an Neutrophilen im entzündeten Gewebe sowohl durch Cyclophilin-Inhibition als auch durch anti-CD147-Antikörper reduziert werden konnte und die Kombination aus beiden ein nur wenig besseres Ergebnis liefert. Des Weiteren wurden im Maus-Modell nach einer Asthma-induzierten Entzündung der Lungen erhöhte Konzentrationen von CypA und CypB in der bronchoalveolären Lavage (BAL) der betroffenen Mäuse nachgewiesen, sowie eine erhöhte Expression von CD147 auf der Zelloberfläche der involvierten Eosinophile und T-Zellen (Gwinn et al., 2006). Durch die selektive Inhibition extrazellulärer Cyclophiline konnte das Vorkommen dieser Zellen in BAL und Lungengewebe Allergie-exponierter Mäuse und damit einhergehend die

Entzündungsreaktion des Lungengewebes signifikant reduziert werden (Balsley et al., 2010). Chevalier et al. (2012) fanden nach Bestrahlung von Brustkrebszellen verschiedene Isoformen an sekretiertem CypA, wobei die Menge an abgesondertem CypA von der Bestrahlungsempfindlichkeit der jeweiligen Zelllinie abhängig ist. In *in vitro*-Tests sekretierten Zellen der Nierenrinde von Hasen ebenfalls CypA, CypB und CypC, wobei CypA überwiegt. Dieses liegt nicht nur frei im Medium vor, sondern auch an Hensin gebunden – einem multifunktionalen Protein, das in der Regulation der epithalen Differenzierung eine Rolle spielt und in der extrazellulären Matrix morphologische Änderungen bewirkt (Peng et al., 2009). Die Autoren dieser Studien konnten außerdem zeigen, dass die Inhibition der PPlase-Aktivität durch die Inhibition der Hensin-Polymerisation in der extrazellulären Matrix eine Phänotypänderung der betreffenden Zellen hervorruft, wobei der Verlust der Hensin-Polymerisation auf der Inhibition der Hensin-Sekretion beruht. Tien et al. (2012) konnten sekretiertes CypA auch in der Co-Kultur einer Trophoblastenzelllinie und einer Endometriumepithelzelllinie identifizieren. Die Aktivierung von Kinasen (MAPK, ERK) und die erhöhte Expression von CD147 auf den Endometriumepithelzellen nach Stimulation mit CypA lassen auf eine spezifische Rolle von CypA in der Signalübertragung während der Embryo-Implantation schließen (Tien et al., 2012). Seizer et al. (2012) untersuchten die Rolle von CypA und CD147 in der durch das murine Coxsackievirus B3 (CVB3)-induzierten Myokarditis und konnten eine Hochregulierung von CypA und CD147 in den Mäusen mit CVB3-induzierter Myokarditis nachweisen, sowie eine Beteiligung von CypA an der Rekrutierung von Makrophagen und T-Zellen und in der Virusabwehr während der Anfangsphase der Infektion. Die Autoren konnten weiter zeigen, dass durch die Inhibition von CypA oder dessen Fehlen (in CypA-Knockout-Mäusen) myokardialen Fibrosen vorgebeugt wird.

1.4.3.2 Der Cyclophilin-Rezeptor CD147

Als Rezeptor für extrazelluläres CypA und CypB gilt das transmembrane Glykoprotein CD147 (Yurchenko et al., 2001), das von vielen Zelltypen, darunter Endothel- und Epithelzellen, Leukozyten, blutbildende Zellen und Tumorzellen exprimiert wird. Sowohl die Signalaktivität als auch die durch CypA- und CypB-induzierte Chemotaxis hängen dabei von der Gegenwart von Heparansulfat-Proteoglykanen ab, welche als primäre Bindungsstellen für CypA auf den Zielzellen fungieren (Yurchenko et al., 2002). Pushkarsky et al. zeigten 2005, dass Pro²¹¹ des CD147 eine Wechselwirkung mit Cyp60 eingeht, welches an der Expression von CD147 an der Zelloberfläche beteiligt ist. Der N-terminale extrazelluläre Teil des CD147 wird durch zwei immunoglobulinartige Domänen (Ig1 und Ig2) gebildet und der Transmembran-Bereich besteht aus einem hydrophoben Aminosäurestrang, welcher durch einen geladenen Rest unterbrochen wird. Dies lässt darauf schließen, dass CD147 mit anderen Membranproteinen Komplexe bildet, sodass die Ladung abgeschirmt wird (Yurchenko et al., 2005). CD147-Knockout-Mäuse zeigen Defekte in der Lymphozytenempfindlichkeit, Spermatogenese, sowie der retinalen und neuronalen Funktionen in frühen Entwicklungsstadien (Yurchenko et al., 2010). In Tumorzellen und den den Tumor umgebenden Zellen führt CD147 zur Stimulation der MMP-Produktion und begünstigt die Angiogenese durch Induktion von Wachstumsfaktoren der Gefäßzellen (Yurchenko et al., 2005). Durch die Wechselwirkung mit CypA spielt CD147 auch in einem frühen Schritt der HIV-1-Infektion eine Rolle (Pushkarsky et al., 2001). Des Weiteren verläuft bei der rheumatoiden Arthritis die CypA-vermittelte

Migration entzündungsfördernder Leukozyten in die Gelenke über CD147 (Damsker et al., 2008). Die Auswertung humaner Endomyokardialbiopsien bzgl. der Expression von CD147 und CypA an Proben von entzündlichen und nicht-entzündlichen Kardiomyopathien ergab für die entzündliche Kardiomyopathie eine erhöhte Expression an CD147 und CypA, während bei der nicht-entzündlichen Form lediglich CD147, nicht aber CypA, vermehrt exprimiert wurde, sodass CD147 und CypA als Marker für Kardiomyopathie in Frage kommen (Seizer et al., 2011).

Der genaue Mechanismus der Funktionsweise des CD147-Rezeptors ist jedoch noch nicht gänzlich erforscht. Vorgeschlagen wird zum einen ein Cyclophilin-unabhängiger Weg via losgelöster Rezeptorproteine und zum anderen ist auch ein Cyclophilin-abhängiger Mechanismus unter Ausnutzung der PPlase-Aktivität zur Regulation der Signalstärke denkbar (Schlegel et al., 2009) (**Abbildung 13**). Die Intensität der Signalstärke wird dabei über das *cis/trans*-Verhältnis des Pro²¹¹ gesteuert.

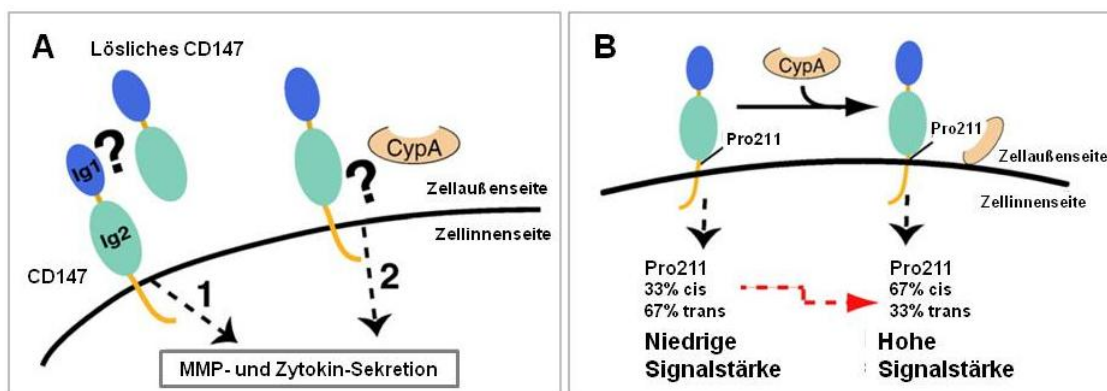


Abbildung 13: Funktionsweise des Rezeptorproteins CD147. A) Funktionsweise durch Cyclophilin-unabhängigen (links) und Cyclophilin-abhängigen Mechanismus, B) Modellmechanismus für die Aktivität von CD147. (nach Schlegel et al, 2009)

Hinweise auf andere mögliche Rezeptoren für extrazelluläres CypA geben hingegen zelltyp-abhängige CypA-Aktivitäten, die Bahmed et al. (2012) für zwei Pankreaskrebszelllinien und zwei monozytische Zelllinien nachgewiesen haben. Die Autoren fanden heraus, dass die verschiedenen Zelllinien in Bezug auf die IL-6- und IL-8-Expression, die ERK1/2-Phosphorylierung und die Expression von CD147 unterschiedlich auf die Stimulation durch extrazelluläres CypA reagieren.

1.5 Zielstellung

Cyclophiline spielen eine wesentliche Rolle in einer Vielzahl von Krankheiten (HIV, Hepatitis C, Asthma, Psoriasis etc.). Cyclosporin A (CsA) konnte als Cyclophilin-Inhibitor in einigen Studien einen möglichen Ansatzpunkt für deren Therapie liefern. Die immunsuppressive Wirkung des CsA und gravierende Nebenwirkungen, wie z.B. Nephrotoxizität, sind dabei aber unerwünscht und nachteilig. Nicht-immunsuppressive CsA-Analoga, wie beispielsweise NIM-811, SCY-635 und DEBIO-025/Alisporivir, wiesen bereits Erfolge bei der Inhibition der Replikation von HCV und HIV-1 auf. Ein [D-Ser]⁸-CsA-Derivat zeigte positive Effekte in Asthma-Studien. Diese Derivate sind aber nur über aufwendige mehrstufige Synthesen oder Fermentation zugänglich.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher CsA-Derivate synthetisiert werden, die leicht zugänglich sind, das heißt auf einfachen Synthesewegen ausgehend von CsA zu synthetisieren. Die CsA-Derivate sollten Cyclophilin-Inhibitoren sein und keine immunsuppressive Wirkung besitzen. Weiterhin sollten CsA-Analoga dargestellt werden, welche die Zellmembran nicht passieren und somit geeignet sind, selektiv extrazelluläre Cyclophiline zu inhibieren.

Die synthetisierten CsA-Derivate sollten in bereits evaluierten Assay-Systemen auf ihre biochemischen Eigenschaften bzgl. der Inhibition von PPIase-Aktivität und Calcineurin-Phosphatase-Aktivität, dem Vermögen zur Passage der Zellmembran, sowie im NFAT-Reporter-Gen-Assay vermessen werden.

Aus den erhaltenen Ergebnissen soll für die CsA-Derivate eine mögliche Struktur-Wirkungsbeziehung hergeleitet werden. Geeignete Derivate, welche gute Resultate im PPIase-Assay und Zellmembranpassage-Assay liefern und im Calcineurin-Phosphatase-Assay nicht immunsuppressiv sind, sollen in Kooperation mit auswärtigen Partnern an etablierten Krankheits-Modellen getestet werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

Für die Synthese leicht darzustellender selektiver Cyclophilin-Inhibitoren ist es von Vorteil, die funktionellen Substitutionen auf eine chemisch gut modifizierbare Position des CsA-Moleküls zu beschränken. Dass dies keine einfache Aufgabe ist, zeigt sich darin, dass bisher für CaN-inaktive CsA-Derivate Veränderungen an mehreren Positionen im CsA-Ring vorgenommen werden müssen (Fischer et al., 2010). Im Gegensatz dazu können schon kleinste Änderungen wie die Inversion der Konfiguration des MeVal¹¹ von L zu D im CsH oder der Austausch von Abu² durch L-Norvalin im CsG zu gravierenden Änderungen der Sekundärstruktur führen, welche mit einer veränderten Affinität für CypA einhergeht (Potter et al., 2003).

Als Ansatzpunkt für die Modifizierung des CsA-Moleküls wird die MeBmt¹-Seitenkette gewählt. Diese ist nachweislich von großer Bedeutung für die biologische Aktivität des CsA (Wenger, 1985). MeBmt¹ stellt zwar einen Teil der CypA-Bindungsstelle des CsA-Moleküls dar, aber die Seitenkette ist in der Kristallstruktur des CypA-CsA-CaN-Komplexes (Huai et al., 2002; Jin et al., 2002) in den Ring des Peptidrückrates des CsA-Moleküles ‚hineingedreht‘ und somit im Cyp-CsA-CaN-Komplex nicht an CypA gebunden. Die synthetische Zyklisierung der MeBmt¹-Seitenkette zu einem Iodo-Tetrahydrofuran-Derivat zeigte in der Röntgenstrukturanalyse dem CsA identische Konformationen für das Peptidrückrat und die Seitenketten (Petcher et al., 1976; Loosli et al., 1985). Dies lässt vermuten, dass eine Modifikation der MeBmt¹-Seitenkette über intramolekulare Interaktionen bzw. über direkte Wechselwirkungen mit CaN ebenfalls Einfluss auf die CaN-bewirkte Suppression der Immunantwort auszuüben vermag, die konformationellen Änderungen des Peptidrückrates dabei aber vergleichsweise gering ausfallen werden. **Abbildung 14** zeigt die Wechselwirkungen der MeBmt¹-Seitenkette mit den Seitenketten der relevanten Aminosäuren des CypA.

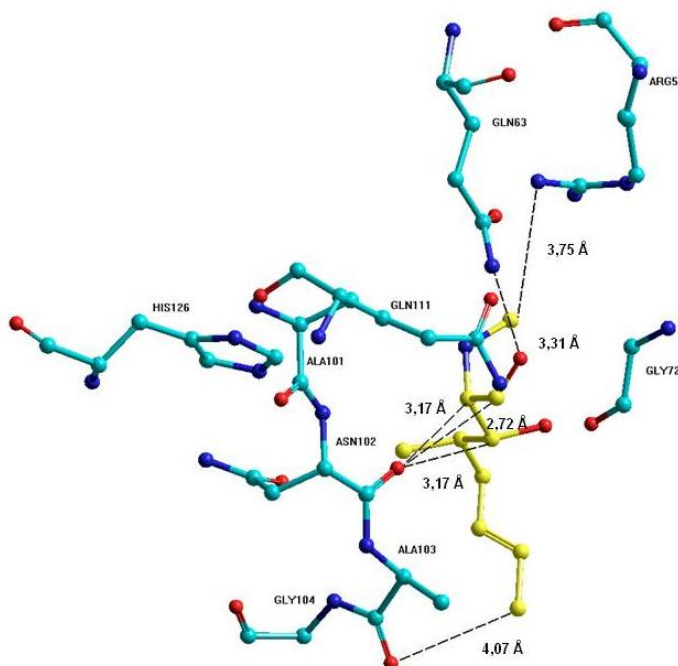


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen der MeBmt¹-Seitenkette des CsA (gelb) und der Seitenketten der CsA-Bindungstasche von CypA (hellblau) im CypA-CsA-CaN-Komplex.

Eine Wasserstoffbrückenbindung wird zwischen dem Carbonylsauerstoff von MeBmt¹ und dem N_ε des Glutamin63 (Gln⁶³) des CypA ausgebildet. Hydrophobe Wechselwirkungen von MeBmt¹ existieren mit den Seitenketten von Arginin55 (Arg⁵⁵), Asparagin102 (Asn¹⁰²) und Ala¹⁰³ des CypA (Ke et al., 1994).

2.1 Modifizierung der MeBmt¹-Seitenkette

Es ist wichtig, die Hydroxy-Gruppe der MeBmt¹-Seitenkette zu schützen, da sich gezeigt hat, dass diese für die Inhibition der PPLase-Aktivität des CsA **1** und seiner Derivate benötigt wird (Wenger, 1985). Ansonsten besteht die Möglichkeit, dass durch Acyl-Shift eine Isomerisierung zum Iso-CsA **2** eintritt (**Abbildung 15**) (Oliyai et al., 1992) bzw. eine Öffnung des Ringes mit Hydrolyse von ein oder zwei Aminosäuren stattfindet (Magni et al., 1997).

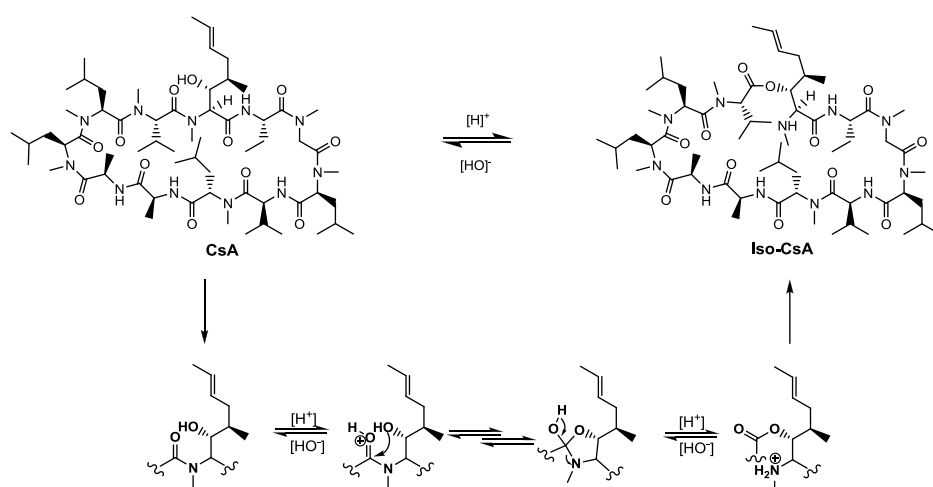


Abbildung 15: Acyl-Shift von CsA zu Iso-CsA (Oliyai et al., 1992).

Eine gängige Gruppe zum Schutz der Hydroxy-Funktion ist die Acetyl-Schutzgruppe. Diese wird durch die Umsetzung von CsA mit Essigsäureanhydrid (Ac₂O) in Gegenwart von 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) als Base in das Molekül eingeführt. Ac₂O dient dabei nicht nur als Reagenz sondern gleichzeitig auch als Lösungsmittel. Das resultierende [O-Acetyl-MeBmt]¹-CsA **3** kann aus dieser Reaktion quantitativ gewonnen werden und bildet somit einen optimalen Ausgangsstoff für weitere Reaktionen. Die Acetyl-Schutzgruppe ist jedoch für Reaktionen mit Butyllithium (BuLi) oder Lithiumdiisopropylamid (LDA) nicht geeignet, da in Gegenwart von BuLi oder LDA aufgrund der in der Schutzgruppe enthaltenen Carbonylgruppe Nebenreaktionen durch Deprotonierung an der α -ständigen Methylgruppe auftreten. Hierfür bietet sich der Schutz mittels eines Silylethers an. Ein weiterer Vorteil der Silylether-Schutzgruppe gegenüber der Acetyl-Schutzgruppe ist die selektive Spaltbarkeit der ersteren mit Fluorid-Ionen oder Säuren, wohingegen bei der basischen Hydrolyse der Acetyl-Schutzgruppe eine Racemisierung eintreten kann. Die Triisopropylsilylether-Schutzgruppe wurde gewählt, da die Trimethylsilylschutzgruppe unter basischen Reaktionsbedingungen sowie in Gegenwart von metallorganischen Verbindungen nur eine sehr eingeschränkte Stabilität aufweist. CsA wird mit 2,6-Lutidin als Base und Triisopropylsilyltrifluoromethansulfonat umgesetzt, um [O-Triisopropylsilyl-MeBmt]¹-CsA **4** zu erhalten (Bérard, 2008). Die Strukturen von [O-Acetyl-MeBmt]¹-CsA **3** und [O-Triisopropylsilyl-MeBmt]¹-CsA **4** sind in **Abbildung 16** wiedergegeben.

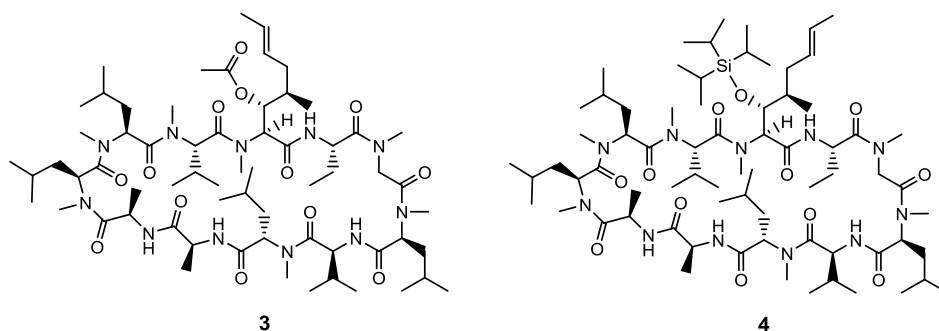


Abbildung 16: Strukturen von $[O\text{-Acetyl-MeBmt}]^1\text{-CsA}$ **3** und $[O\text{-Triisopropylsilyl-MeBmt}]^1\text{-CsA}$ **4**.

Allylständige Bromierung und nucleophile Substitution an der $[MeBmt]^1\text{-Seitenkette}$

Eine zentrale Rolle bei der Modifizierung der MeBmt¹-Seitenkette an der allylständigen Methylgruppe spielte die Bromierung eben dieser. Dazu wurde $[O\text{-Acetyl-MeBmt}]^1\text{-CsA}$ **3** mittels *N*-Bromsuccinimid (NBS) in Allylposition bromiert. Der Start dieser radikalische Kettenreaktion erfolgte durch Einsatz von Azo-bis-(*isobutyronitril*) (AIBN) (Eberle et al, 1992). Die Einführung des Bromsubstituenten erfolgt nahezu quantitativ und das $[O\text{-Acetyl-MeBmt-Br}]^1\text{-CsA}$ **5** wird als Rohprodukt für nucleophile Substitutionen an dieser Position verwendet. Diese Reaktion bietet den Vorteil, dass zusätzliche funktionale Reste an die Seitenkette angefügt werden können, ohne dass eine Veränderung der Konfiguration des CsA-Ringes zu erwarten ist. Diese Hypothese wurde durch die Messung des Circular dichroismus (CD) von CsA und ausgewählten Derivaten überprüft. Die CD-Spektren dieser Verbindungen zeigen alle keine Änderungen der Sekundärstruktur (siehe weiter unten), so dass diese Derivate als antiparalleles β -Faltblatt vorliegen, so wie auch CsA (Loosli et al., 1985).

Nach Substitution des Bromids unter basischen Bedingungen und anschließender Spaltung der Acetyl-Schutzgruppe konnten die Derivate **6-9** erhalten werden. Diese sind über einen Schwefel mit der MeBmt¹-Seitenkette verbunden und verfügen zusätzlich über eine Carbonsäure-Gruppe im Molekül, die im Fall von Derivat **7** mittels LiOH aus dem Methylester freigesetzt worden ist. Die Carbonsäurefunktion ermöglicht eine anschließende Kupplung zur weiteren Modifizierung der Seitenkette. Ein möglicher Rest ist die (D-Glu)₆-Kette, welche CsA zell-impermeabel macht (Malešević et al., 2010). Es ist jedoch unklar, wieviele D-Glu dafür in der Kette benötigt werden und ob derselbe Effekt auch mit anderen ladungstragenden Gruppen erzielt werden kann. Daher ist die Synthese von weiteren Derivaten notwendig, um den Einfluss dieser Gruppe auf die Zellgängigkeit zu untersuchen.

Das Derivat **10** verfügt anstatt einer Carbonsäurefunktion über eine Sulfonsäuregruppe. Die Alkylierung an der Methylgruppe in der Allylposition der MeBmt¹-Seitenkette wurde mittels NMR bestätigt.

In Analogie wurden ebenfalls die über ein Stickstoffatom verknüpften Derivate **11-16** synthetisiert. Hierbei variieren die Substituenten von der 2-Aminobenzoesäure, über (Aminomethan)phosphonsäure bis hin zu Glycin und β -Alanin inklusive der *N*-acetylierten und *N*-methylierten Form des Letzteren (**Abbildung 17**).

Durch die sauren Gruppen - insbesondere die Sulfon- und Phosphonsäurefunktion- wird eine Wasserlöslichkeit unter physiologischem pH-Wert erreicht.

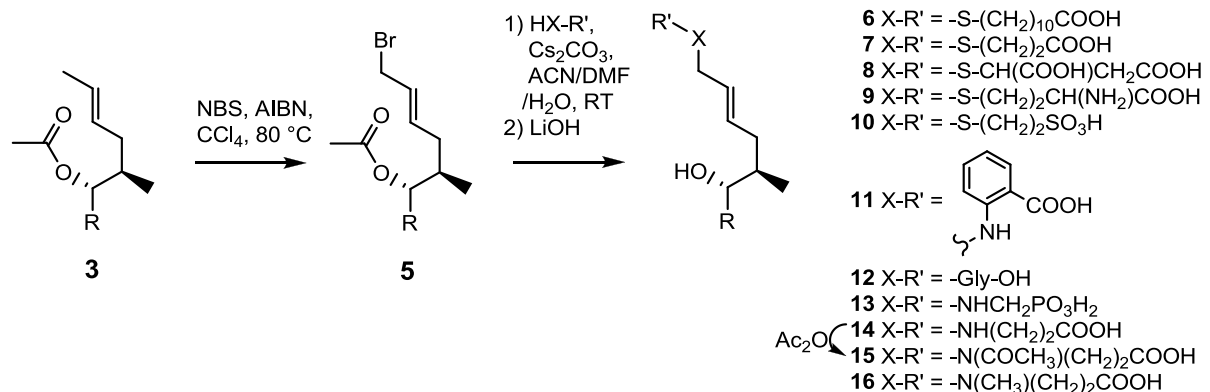


Abbildung 17: Syntheschema für die Darstellung des [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** und die anschließende Kupplung. (R = Ring des CsA-Moleküls)

Derivat **14** wurde durch Umsetzung mit Ac₂O am Stickstoffatom acetyliert, um Derivat **15** zu erhalten. Für die Darstellung der N-methylierten Verbindung **16** hat es sich am effektivsten erwiesen, erst NH(CH₃)(CH₂)₂COOCH₃ durch Alkylierung von Methylamin mittels des 3-Bromopropionsäuremethylesters herzustellen und dieses dann an das [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** zu koppeln.

Derivatisierung der Säurefunktion von CsA-Analog **7**

Von Verbindung **7**, welche neben einem dem CsA (IC₅₀ = 9,1 ± 0,8 nM) vergleichbaren IC₅₀-Wert von 8,0 ± 1,4 nM für die Inhibition der PPIase-Aktivität auch eine merklich reduzierte Inhibition der CaN-Aktivität und eine extrazelluläre Lokalisation zeigt (siehe weiter unten), wurden verschiedene Amide hergestellt. Dadurch sollten funktionelle Gruppen in das Molekül eingeführt werden, um die Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen zu gewährleisten und den Transport in die Zelle zu unterbinden ohne dabei die CypA-Inhibition negativ zu beeinflussen. Die Knüpfung einer solchen Amidbindung stellt eine nucleophile Reaktion an einer polaren Doppelbindung dar. Da die Reaktion unter milden Bedingungen erfolgen muss, ist eine Aktivierung der Carbonylgruppe der Carboxykomponente notwendig. Die Einführung von Substituenten, welche die Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff sowie am Carbonylsauerstoff-Atom verringern, begünstigt den nucleophilen Angriff der Aminokomponente. Die Reaktionen erfolgten daher mit dem Kupplungsreagenz HATU (2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) (**Abbildung 18A**) in Gegenwart von DIPEA in DMF. Mit HATU wird *in situ* ein Aktivester des CsA-Derivates **7** gebildet und die Aminokomponente wird im zyklischen Übergangszustand durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke in einer günstigen Position fixiert (**Abbildung 18B**) (Jakubke, 1996).

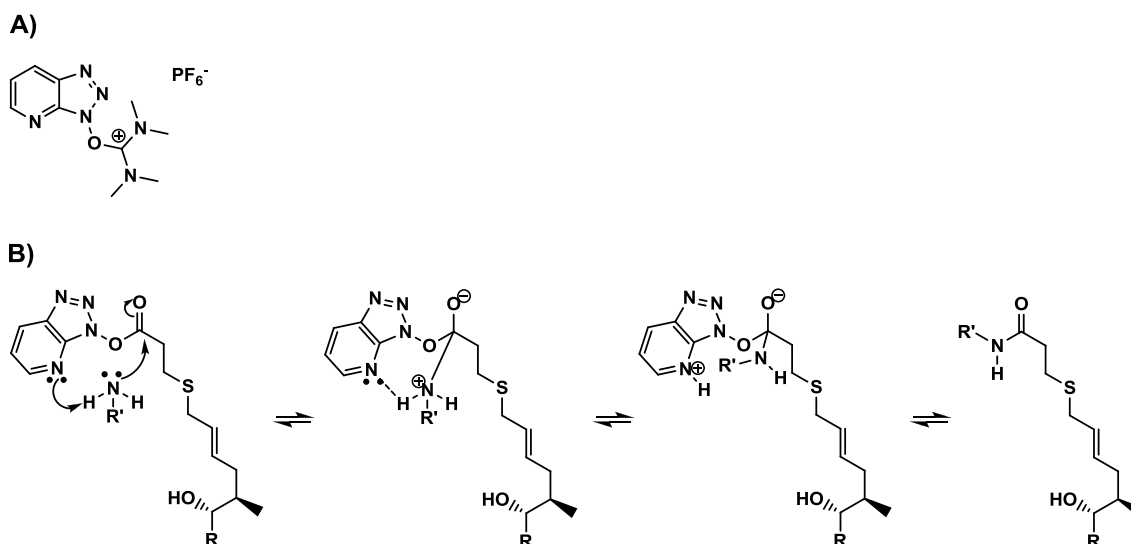


Abbildung 18: Amidsynthese mit HATU. A) Struktur von HATU. B) Mechanismus für die HATU-vermittelte Kupplung zum Säureamid. (nach Jakubke, 1996)

Ausgegangen wurde von der (D-Glu)₆-Gly-OH-Kette, die nachweislich geeignet ist, ein CsA-Derivat außerhalb von Jurkat-Zellen zu halten (Malešević et al., 2010). Die (D-Glu)₆-Gly-OH-Kette wurde in einer schrittweisen Festphasenpeptidsynthese mit Fmoc-Schutzgruppenchemie im Synthese-Roboter am Wang-Harz gekuppelt (Sieber, 1987). Die Kondensation zum Amid **17** erfolgte - nach Abspaltung der Peptidkette vom Harz und Aufarbeitung - in Lösung. Die Carbonsäuregruppen der Seitenketten wurden dabei als Methylester geschützt, um Nebenreaktionen zu verhindern. Zur Optimierung der benötigten D-Glu-Anzahl in der Kette wurden in analoger Art und Weise die entsprechenden Verbindungen **18-23** mit 1-6 D-Glu, sowie ohne D-Glu nur mit Gly (**24**) synthetisiert. Als Aminosäuren zur Amidbildung wurden weiterhin H-β-Ala-OH, 12-Aminododecansäure und Cystein in äquivalenten Reaktionen zu den Derivaten **25-27** umgesetzt.

Neben dem Einsatz einer Oligo-(D-Glu)-Kette an der modifizierten MeBmt¹-Seitenkette bieten Sulfonsäuren und Phosphonsäuren die Möglichkeit in Form von ladungstragenden Gruppen die Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen zu verbessern. So wurde für das CsA-Derivat **28** 3-Amino-1-propansulfonsäure und für Verbindung **29** (Aminomethyl)phosphonsäure als Amino-Komponente für die Kupplung eingesetzt. Eine weitere Alternative bietet Biotin, welches in Verbindung **30** über ein 2,2'-(Ethylendioxy)bis(ethylamin) (EDO) an das Derivat **7** gebunden ist. Die Verknüpfung mit Biotin ermöglicht die Herstellung einer CsA-modifizierten Agarosematrix. Die Einbringung von Peptoid-Resten, wie in den Derivaten **31** und **32**, stellt ebenfalls eine vielversprechende Variation der Säurefunktion dar, da Peptoide proteolytisch stabil sind. In Ersterem ist der Peptoid-Rest direkt an **7** kondensiert und in Letzterem ist der entsprechende Rest über Ethylendiamin als Linker angebunden. Verbindung **33** trägt zu Vergleichszwecken nur diesen Linker als Amid. Derivat **30** wurde über Festphasensynthese am Rinkamid-Harz unter Verwendung von *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) als Aktivierungsmittels hergestellt (Zuckermann et al., 1992), während für **32** die Kupplung in Lösung durchgeführt wurde. Zu Vergleichszwecken wurde außerdem Derivat **33**, das nur über den Ethylendiamin-Linker verfügt, synthetisiert. Die Strukturen der Verbindungen **17-33** sind in **Abbildung 19** wiedergeben.

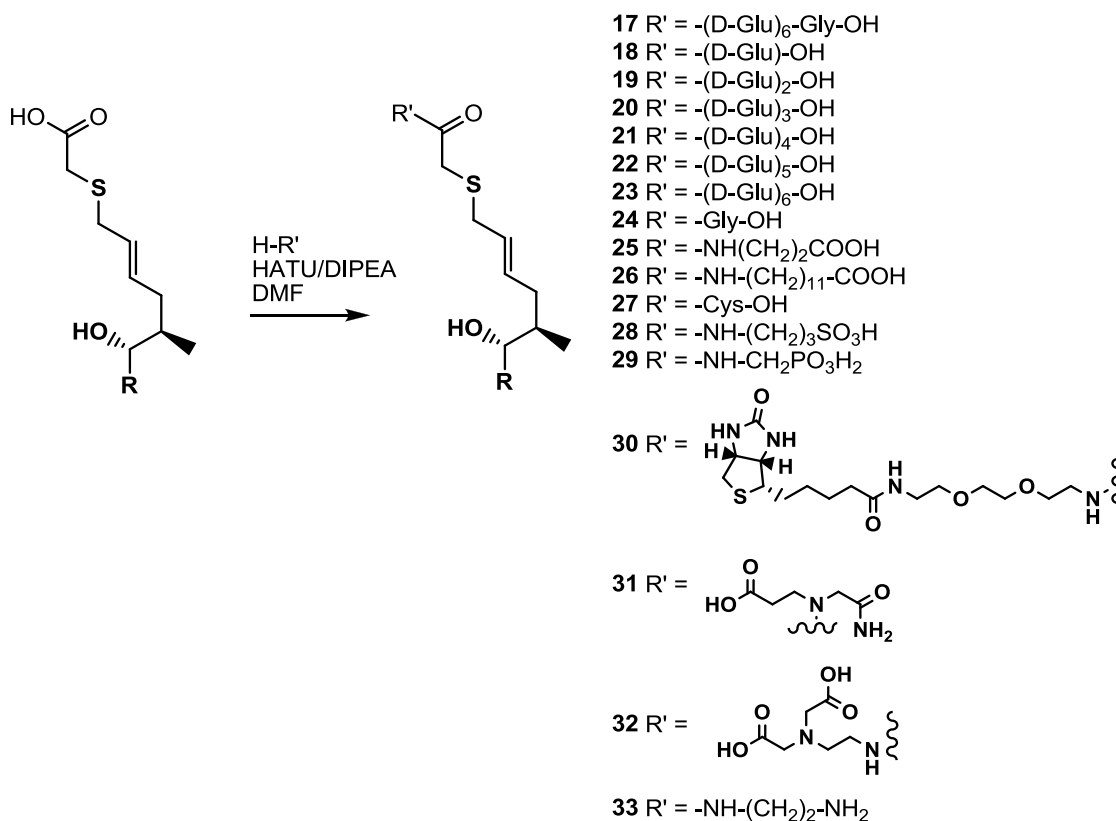


Abbildung 19: Strukturen der Amide **17-33** von CsA-Analog **7**. (R = CsA-Ring)

Einfluss des (D-Glu)₂-Restes auf die Zellpermeabilität

Die (D-Glu)₂-Kette liefert bzgl. der Verbesserung der Inhibition der PPLase-Aktivität, Unterdrückung der immunsuppressiven Eigenschaften und der Verhinderung der Zellpenetration den erfolgversprechensten Ansatzpunkt. Das Schwefelatom, das den Propionsäurerest mit dem CsA-Molekül verbindet wird aber im Organismus möglicherweise leicht oxidiert und daher wurden auch von anderen CsA-Derivaten, welche über eine Carbonsäurefunktion verfügen, die entsprechende (D-Glu)₂-Amide in Analogie zur Synthese von Verbindung **19** dargestellt. So entstanden die Amide der modifizierten β-Ala-CsA-Derivate **14-16**. Die resultierenden Produkte **34-36** sind in **Abbildung 20** zusammengefasst.

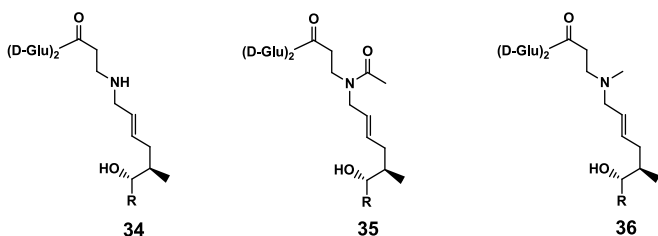


Abbildung 20: Strukturen der Verbindungen **34-36**. (R = CsA-Ring)

Derivate mit verschiedenen substituierten Aminen wurden hergestellt, um einen Vergleich bzgl. möglicher Substituenteneffekte zu ermöglichen. So wurden die CsA-Derivate **37-44** erhalten (**Abbildung 21**), aus welchen sich der Einfluss primärer, sekundärer und tertiärer Amine und des quartären Ammoniumions sowie sekundärer und tertiärer Amide auf die Inhibition der PPLase-

Aktivität und die Zellpermeabilität abschätzen lässt. Für die Amine nimmt die durch das freie Elektronenpaar am Stickstoff begründete Basizität mit steigender Anzahl an Substituenten zu, da durch diese Alkylreste Elektronendichte auf den Stickstoff übertragen wird. In wässrigen Lösungen wird die Basizität jedoch außerdem noch durch die Hydratisierung der Amin-Gruppe und durch deren sterische Hinderung beeinflusst, sodass tertiäre Amine die geringste Basizität aufweisen sollten, gefolgt von primären und sekundären Aminen. In den Amiden und im quaternären Ammoniumion ist der Stickstoff nicht mehr basisch.

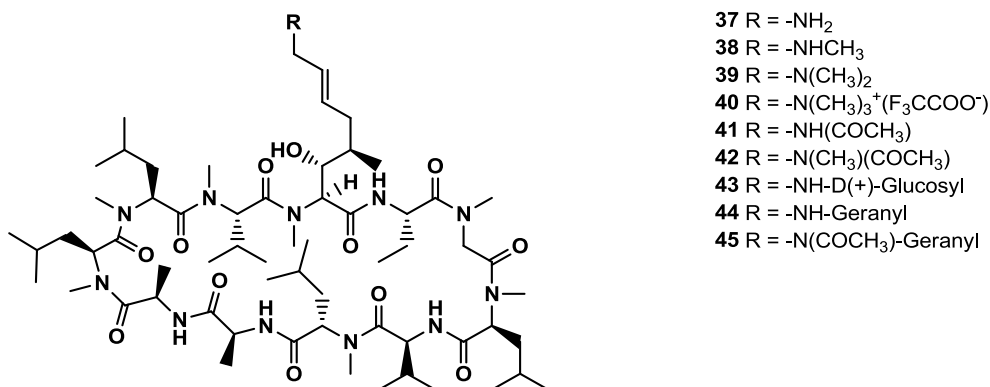


Abbildung 21: Strukturen der verschieden substituierten 1-Amino- und Amido-Derivate **37-44** des CsA.

Das primäre CsA-Amin **37** konnte sowohl durch Umsetzung mit wässriger Ammoniak-Lösung in Gegenwart von Cäsiumcarbonat als auch in einer Gabriel-Synthese durch die Reaktion mit Kaliumphthalimid und anschließender Hydrazinolyse (**Abbildung 22**) synthetisiert werden. Die Gabriel-Synthese führte dabei zu einer wesentlich höheren Ausbeute, was darauf zurückzuführen ist, dass bei der Reaktion mit wässriger Ammoniak-Lösung die gegenwärtigen Hydroxid-Ionen die besseren Nucleophile sind und somit eine Hydrolyse von **5** als Konkurrenzreaktion überwiegt.

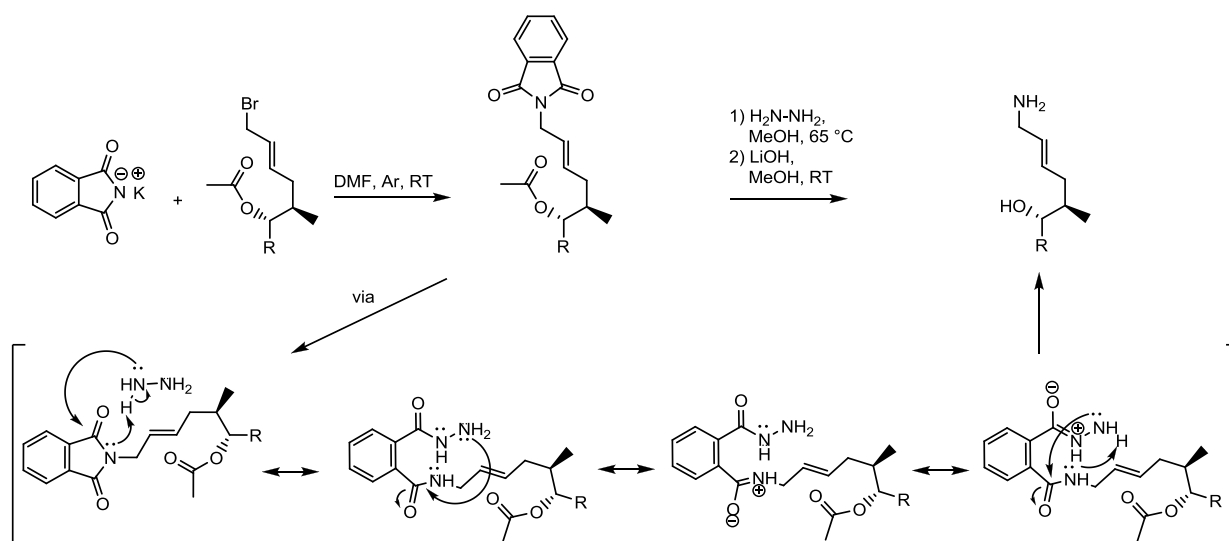


Abbildung 22: Darstellung des primären CsA-Amins **37** mittels Gabriel-Synthese (nach R. Brückner, 2004).

Die Substanzen **38** und **39** sind aus der Umsetzung des [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** mit hydrochlorid bzw. Dimethylaminhydrochlorid unter oben genannten Reaktionsbedingungen hervorgegangen. Das quaternäre Ammoniumion **40** entstand aus Derivat **39** nach Methylierung mittels Methyljodid. Als Gegenion ist das Trifluoracetation anzusehen, welches aufgrund der Verwendung von Trifluoressigsäure während der Aufarbeitung zugegen ist. Für die Darstellung der CsA-Derivate **41** und **42** wurden das primäre Amin **37** bzw. das sekundäre Amin **38** mittels Ac₂O acetyliert.

Eine weitere Möglichkeit, die Löslichkeit in Wasser bzw. Puffer unter physiologischem pH-Wert zu erhöhen, bietet die Einführung eines Zuckerrestes in das Molekül. Im Fall von Derivat **43** wurde ausgehend vom D-Glucosamin, welches als Hydrochlorid eingesetzt wurde, ein Glucose-Rest mit dem Molekül verknüpft. Dabei wurde in einer Suspension von Cäsiumhydroxidmonohydrat als Base in DMF gearbeitet.

Für Verbindung **44** wurde das [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** mit Geranylamin substituiert. Die anschließende Acetylierung des sekundären Stickstoffatoms von **44** mittels Ac₂O in Gegenwart von *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA) resultierte in Derivat **45**. Da Isoprenoide in vielen Naturstoffen vorkommen, als Hormone (Steroidhormone, Vitaminhormon Vitamin D) fungieren und Teil von Vitaminen (Vitamin A, Vitamin E) sind, ist es durchaus von Interesse zu untersuchen, wie sich der isoprenoide Teil auf die biologischen Eigenschaften des CsA auswirkt.

Biochemische Daten der CsA-Derivate 6-45

Zur biologischen Evaluierung der dargestellten Substanzen werden zuerst die IC₅₀-Werte für die Inhibition der PPIase-Aktivität von CypA und der Inhibition für die Phosphatase-Aktivität von CaN bestimmt. Die jeweiligen Derivate, die gute PPIase-Inhibitionswerte aufweisen, wurden zusätzlich an Jurkat-Zellen im Verdrängungsassay und im NFAT-Luciferase-Reporter-Gen-Assay getestet.

Die Inhibition der Isomerase-Aktivität von CypA wurde im protease-gekoppelten PPIase-Assay in Gegenwart von α-Chymotrypsin mit Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-Nitroanilid als Substrat gemessen (Fischer et al., 1984; Fischer et al., 1989; Schumann et al., 2011). Die CaN-Phosphataseaktivität wurde in Gegenwart von CypA über einen auf Malachitgrün basierenden Assay durch die Dephosphorylierung eines RII-Phosphopeptides bestimmt (Sellar et al., 2006) (**Abbildung 23**).

Die intra- oder extrazelluläre Lokalisation der Substanzen wurde über einen fluoreszenz-basierten Verdrängungsassay an Jurkat-Zellen bestimmt (Malešević et al., 2010; Prell et al., 2013) (**Abbildung 24**). Dazu wurden Jurkat-Zellen in einem Medium inkubiert, das ein Coumarin-markiertes CsA-Derivat enthält. Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie kann eine Anhäufung des fluoreszierenden CsA-Derivates nachgewiesen werden, die auch durch Messungen im Durchflusszytometer (FACS) bestätigt werden konnte. Das Ausschleusen des fluoreszierenden CsA-Derivates wird durch nicht fluoreszierendes CsA bzw. CsA-Analoga in einer konzentrationsabhängigen Weise beschleunigt (Prell et al., 2013).

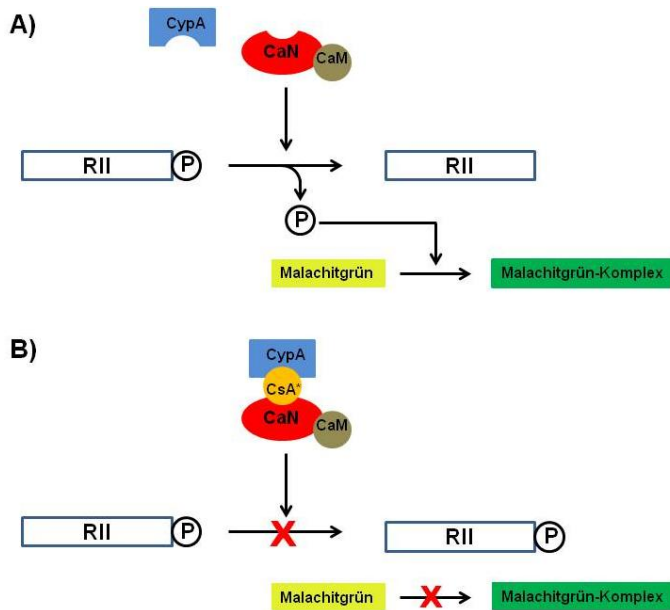


Abbildung 23: Schematische Darstellung des Assays zur Bestimmung der CaN-Phosphataseaktivität. A) Die RII-Untereinheit der bovinen Proteinkinase A wird durch CaN in Gegenwart von Calmodulin (CaM) dephosphoryliert. Durch das freigesetzte Phosphat bildet sich mit dem Malachitgrünreagenz ein grüner Komplex. B) Findet eine Inhibition der CaN-Phosphataseaktivität durch das zugegebene CsA-Derivat statt, wird kein Phosphat freigesetzt und daher kein Malachitgrün-Phosphat-Komplex gebildet.



Abbildung 24: Assay zur Bestimmung der intrazellulären Präsenz der CsA-Derivate. A) Jurkat-Zellen werden mit einem fluoreszierenden CsA-Derivat vorinkubiert und danach gewaschen. B) Die mit dem fluoreszierenden Derivat vorinkubierten Zellen werden mit dem zu untersuchenden CsA-Derivat inkubiert. Ist dieses in der Lage, die Zellmembran zu passieren, wird das fluoreszierende Derivat aus den Zellen verdrängt. Es ist eine im Vergleich zur Kontrolle schwächere Fluoreszenz messbar. C) Ist dieses nicht in der Lage, die Zellmembran zu

passieren, wird das fluoreszierende Derivat nicht aus den Zellen verdrängt. Es ist keine Änderung der Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle messbar.

Da der Assay auf dem Prinzip der Verdrängung des fluoreszierenden CsA-Derivates durch das bzgl. der intra- oder extrazellulären Lokalisation zu untersuchende CsA-Derivat beruht, liefert dieser Assay nur für gute PPIase-Inhibitoren ein zuverlässiges Ergebnis. Schlechte PPIase-Inhibitoren sind nicht in der Lage, das fluoreszierende CsA-Analog von den zellulären Cyclophilinen zu verdrängen und würden daher zu einem falsch negativen Ergebnis führen.

Der NFAT-Luciferase-Reportergen-Assay kombiniert in komplexer Form die Effekte aus CaN-Inhibition und dem Vermögen bzw. Unvermögen der Substanz zur Passage der Zellmembran. Um CaN zu inhibieren, muss das zu testende CsA-Derivat die Zellmembran passieren. Wenn CaN im NFAT-Luciferase-Reportergen-Assay nicht inhibiert wird, ist das getestete CsA-Derivat entweder nicht-immunsuppressiv oder nicht geeignet, die Zellmembran zu passieren, oder beides. Für den NFAT-Luciferase-Reportergen-Assay wurden die transfizierten Jurkat-Zellen nach Inkubation mit dem jeweiligen Inhibitor zur Luciferase-Produktion stimuliert und nach der Zellyse die Menge der entstandenen Luciferase durch Messung der Biolumineszenz bestimmt (Baumgrass et al., 2004; Erdmann et al., 2010).

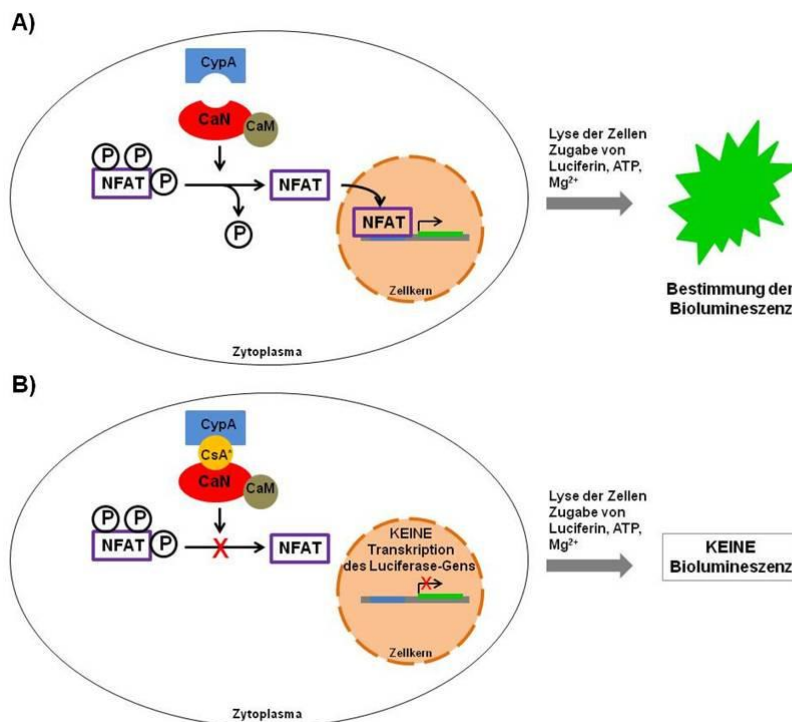


Abbildung 25: NFAT-Luciferase-Reportergen-Assay. A) CaN dephosphoryliert die zytosolische Komponente des NFAT in transfizierte Jurkat-Zellen. NFAT wird in den Zellkern verlagert und startet dort die Transkription des Luciferase-Gens. Nach der Zellyse führt die Zugabe von Luciferin zu einer Biolumineszenz. B) Durch ein intrazelluläres CaN-inhibierendes CsA-Derivat wird die Dephosphorylierung des NFAT verhindert. Es erfolgt keine Transkription des Luciferase-Gens und es ist keine Biolumineszenz vorhanden.

Die Werte für die Inhibition der PPlase-Aktivität, der CaN-Phosphatase-Aktivität in Gegenwart von CypA und die Ergebnisse des Zell-Assays zur intrazellulären Präsenz der Verbindungen **6-45** sind in **Tabelle 4** wiedergegeben.

Tabelle 4: Übersicht über die Inhibition der PPlase-Aktivität und der CaN-Aktivität sowie der intrazellulären Präsenz durch CsA und an der MeBmt¹-Seitenkette modifizierten CsA-Derivate **6-45**.

| CsA-Derivat | Rest | PPlase-Inhibition IC ₅₀ [nM] | CaN-Inhibition IC ₅₀ [nM] | intrazelluläre Präsenz |
|-------------|--|---|--------------------------------------|------------------------|
| CsA | -H | 9,1 ± 0,8 | 55,9 ± 10,1 | ja |
| 6 | -S(CH ₂) ₁₀ COOH | 7,9 ± 1,4 | ~ 600 | nein |
| 7 | -S(CH ₂) ₂ COOH | 8,0 ± 1,4 | ~ 2000 | nein |
| 8 | -SCH(COOH)CH ₂ COOH | 24,3 ± 1,5 | ~ 1500 | ja |
| 9 | -S(CH ₂) ₂ CH(NH ₂)COOH | 12,3 ± 0,5 | ~ 200 | nein |
| 10 | -S(CH ₂) ₂ SO ₃ H | 3,8 ± 0,3 | ~ 1700 | nein |
| 11 | 2-Aminobenzoesäure | 10,4 ± 0,6 | ~ 1500 | ja |
| 12 | -Gly-OH | 16,4 ± 2,0 | ~ 800 | nein |
| 13 | -NHCH ₂ PO ₃ H ₂ | 79,1 ± 8,3 | k.l. | <i>n.g.</i> |
| 14 | -NH(CH ₂) ₂ COOH | 48,0 ± 6,3 | k.l. | nein |
| 15 | -N(COCH ₃)(CH ₂) ₂ COOH | 9,8 ± 0,5 | k.l. | nein |
| 16 | -N(CH ₃)(CH ₂) ₂ COOH | 27,4 ± 4,2 | k.l. | nein |
| 17 | -S(CH ₂) ₂ CO-(D-Glu) ₆ -Gly-OH | 3,2 ± 0,3 | k.l. | nein |
| 18 | -S(CH ₂) ₂ CO-(D-Glu)-OH | 8,4 ± 1,1 | ~ 4500 | nein |
| 19 | -S(CH ₂) ₂ CO-(D-Glu) ₂ -OH | 4,4 ± 0,4 | k.l. | nein |
| 20 | -S(CH ₂) ₂ CO-(D-Glu) ₃ -OH | 3,3 ± 0,3 | k.l. | nein |
| 21 | -S(CH ₂) ₂ CO-(D-Glu) ₄ -OH | 3,9 ± 0,3 | k.l. | nein |
| 22 | -S(CH ₂) ₂ CO-(D-Glu) ₅ -OH | 2,5 ± 0,2 | k.l. | nein |
| 23 | -S(CH ₂) ₂ CO-(D-Glu) ₆ -OH | 2,3 ± 0,2 | k.l. | nein |
| 24 | -S(CH ₂) ₂ CO-Gly-OH | 5,4 ± 0,5 | ~ 710 | nein (bis 10 µM) |
| 25 | -S(CH ₂) ₂ CO-β-Ala-OH | 6,1 ± 0,5 | ~ 520 | ja (ab 1 µM) |
| 26 | -S(CH ₂) ₂ CO-NH(CH ₂) ₁₁ COOH | 14,5 ± 1,5 | <i>n.g.</i> | <i>n.g.</i> |
| 27 | -S(CH ₂) ₂ CO-Cys-OH | 18,4 ± 1,7 | > 10000 | nein |
| 28 | -S(CH ₂) ₂ CO-NH(CH ₂) ₃ SO ₃ H | 67,4 ± 4,3 | ~ 10000 | <i>n.g.</i> |
| 29 | -S(CH ₂) ₂ CONHCH ₂ PO ₃ H ₂ | 8,2 ± 0,6 | ~ 10000 | nein |
| 30 | -S(CH ₂) ₂ CO-EDO-Biotin | 8,6 ± 1,1 | ~ 1720 | <i>n.g.</i> |
| 31 | -S(CH ₂) ₂ CO-N(CH ₂ CONH ₂)(CH ₂) ₂ COOH | 4,7 ± 0,5 | ~ 460 | nein |
| 32 | -S(CH ₂) ₂ CO-NH(CH ₂) ₂ N(CH ₂ COOH) ₂ | 9,0 ± 1,2 | ~ 3500 | nein |
| 33 | -S(CH ₂) ₂ CO-NH(CH ₂) ₂ NH ₂ | 115,9 ± 35,6 | ~ 1900 | <i>n.g.</i> |
| 34 | -NH(CH ₂) ₂ CO-(D-Glu) ₂ | 78,0 ± 4,2 | <i>n.g.</i> | <i>n.g.</i> |
| 35 | -N(COCH ₃)(CH ₂) ₂ CO-(D-Glu) ₂ | 3,4 ± 0,2 | k.l. | nein |
| 36 | -N(CH ₃)(CH ₂) ₂ CO-(D-Glu) ₂ | 38,5 ± 5,2 | k.l. | --- |
| 37 | -NH ₂ | 32,1 ± 8,1 | ~ 1210 | ja |
| 38 | -NHCH ₃ | > 50 | k.l. | --- |
| 39 | -N(CH ₃) ₂ | 57,5 ± 6,9 | k.l. | ja |
| 40 | -N(CH ₃) ₃ ⁺ | 78,3 ± 4,2 | k.l. | nein |
| 41 | -NH(COCH ₃) | 66,4 ± 2,7 | > 10000 | <i>n.g.</i> |
| 42 | -N(CH ₃)(COCH ₃) | 11,0 ± 1,4 | k.l. | ja |

| | | | | |
|-----------|--------------------------------|--------------|-------------|-------------|
| 43 | -NH-D-Glucosyl | 54,5 ± 6,8 | k.I. | nein |
| 44 | -NH-Geranyl | 226,3 ± 19,6 | k.I. | <i>n.g.</i> |
| 45 | -N(COCH ₃)-Geranyl | 13,1 ± 2,3 | <i>n.g.</i> | <i>n.g.</i> |

(*n.g.* = nicht getestet; k.I. = keine Inhibition)

Von den Schwefel-verbrückten CsA-Derivaten **6-10** zeigen die beiden Verbindungen **6** und **7** eine dem CsA entsprechende Inhibition der PPlase-Aktivität im protease-gekoppelten Assay. Die Länge der Alkylkette ist dabei nicht entscheidend, vielmehr scheint eine lineare Kette für einen niedrigen IC₅₀-Wert diesbzgl. vorteilhaft zu sein, da die verzweigten Verbindungen **8** und **9**, aus der Reaktion mit Mercaptobernsteinsäure bzw. Homocystein um den Faktor von rund 3 bzw. 1,5 höhere IC₅₀-Werte aufweisen als CsA. Das Mercaptoethansulfonsäure-derivat **10** ist sogar ein doppelt so guter PPlase-Inhibitor wie CsA. Die stärkere Polarität der Sulfonsäure-Funktion in Verbindung **10** wirkt sich im Vergleich zu dem Carbonsäure-Derivat **7** vergleichbarer Kettenlänge folglich begünstigend auf die PPlase-Inhibition aus. Die Verbindung über ein protoniertes Stickstoffatom resultiert in den CsA-Analoga **11-14** in deutlich schlechteren Werten für die PPlase-Inhibition. Daraus lässt sich schließen, dass die Basizität des verbrückenden Stickstoffatoms sich nachteilig auf die Inhibition der Isomeraseaktivität von CypA auswirkt. Dies wird bestätigt durch die IC₅₀-Werte des *N*-acetylierten β -Ala-Derivates **15** und des *N*-methylierten β -Ala-Derivates **16**. In Verbindung **15** ist der Stickstoff durch die Acetyl-Gruppe nicht mehr basisch und der IC₅₀-Wert für die PPlase-Inhibition entspricht der des CsA. Für Derivat **16** ist davon auszugehen, dass die Basizität des Stickstoffes durch die Methylsubstitution reduziert ist, da bei tertiären Aminen die Hydratisierung, die einen wesentlichen Beitrag zur Stabilisierung des Ammoniumions liefert, erschwert wird (Latscha et al., 2008). Dies resultiert in einer dreifach schlechteren PPlase-Inhibition im Vergleich zum CsA.

Im CaN-Phosphatase-Assay zeigen die Verbindungen **6-12** jeweils ein herabgesetztes Inhibitionspotential für die CaN-Aktivität. Die Substanzen **13-16** weisen im Komplex mit CypA gar keine CaN-Inhibition in diesem Assay auf. Im fluoreszenz-basierten Zellpenetrationsassay wurde für die Verbindungen **8** und **11** eine Verdrängung des fluoreszierenden CsA-Derivates aus den Jurkat-Zellen und somit eine intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen. Die acht CsA-Derivate **6, 7, 9, 10, 12** und **14-16** zeigten keine Verdrängung des selbigen, woraus in Kombination mit deren PPlase-Inhibitionspotential von IC₅₀-Werten im unteren nM-Bereich auf eine extrazelluläre Lokalisation geschlossen werden kann. Im Gegensatz zu dem publizierten [D-Ser]⁸-Derivat (Malešević et al., 2010), welches eine mehrfache negative Ladung aufweist, zeigen diese Verbindungen, dass bereits eine ionische Ladung ausreicht, um die Membranpassage zu verhindern.

Ausgehend von CsA-Analog **7**, welches in der PPlase-Inhibition im protease-gekoppelten PPlase-Assay einen dem CsA vergleichbaren IC₅₀-Wert hat und in seiner Struktur eine Carbonsäurefunktion besitzt, wurde nach Synthese der entsprechenden Säureamide der Einfluss verschiedener Aminosäuren und anderer saurer Gruppen auf deren Potential untersucht, die CypA-PPlase- und die CaN-Phosphatase-Aktivität zu inhibieren und die Substanz extrazellulär zu halten. Als erstes wurde das (D-Glu)₆-Gly-OH-Peptid eingesetzt, welches sich bereits bei Malešević et al. (2010) bewährt hat. Dieses führt nach Kupplung an Derivat **7** zu einer rund dreifach besseren PPlase-Inhibition im Vergleich mit CsA und zu einem Verlust der Inhibition der CaN-Phosphatase-Aktivität im indirekten Assay, sowie einer Verhinderung der Zellmembranpassage für Verbindung **17**. Zur Optimierung der D-

Glu-Kette wurden die Derivate **18-23** mit reduzierter Anzahl an D-Glu in der Kette synthetisiert. Hier zeigt sich, dass eine Verbesserung der PPlase-Inhibition und die Hemmung der Immunsuppression bereits durch einen Rest von zwei D-Glu in der Kette erreicht wird. Verbindung **19** zeigt zwar nicht den besten IC_{50} -Wert in der PPlase-Inhibition, ist aber durch die verkürzte D-Glu-Kette einfacher und kostengünstiger herzustellen und stellt damit das Optimum aus Wirkung und Syntheseaufwand dar. Zudem ist auch dieses Derivat - wie auch die D-Glu-Derivate **18, 20-23** - extrazellulär lokalisiert.

Die Verbindungen **24** und **25**, welche die Amide der Ausgangsstruktur **7** mit H-Gly-OH bzw. H- β -Ala-OH darstellen, zeigen zwar auch eine Verbesserung im PPlase-Inhibitionsvermögen, verfügen aber nur über ein reduziertes Inhibitionspotential bzgl. der CaN-Phosphatase-Aktivität und sind ab 10 bzw. 1 μ M intrazellulär nachweisbar. Von den restlichen Amiden von **7** zeigen das Phosphonsäure-Derivat **29** und das Biotin-markierte Derivat **30** eine dem CsA vergleichbare PPlase-Inhibition und Verbindung **29** außerdem eine extrazelluläre Lokalisation. Verbindung **29** besitzt aber ein minimales immunosuppressives Potential mit einem IC_{50} -Wert von rund 10 μ M für die Inhibition der CaN-Aktivität, das des Derivates **30** ist ebenfalls stark herabgesetzt. Die Verbindungen **26-27** weisen eine herabgesetzte Inhibition der CypA-PPlase-Aktivität auf. Die CsA-Derivate **28** und **33** sind deutlich schlechtere CypA-Inhibitoren. Die Verbindungen **27, 28** und **33** führen zu einer reduzierten CaN-Aktivität. Die Peptide **31** und **32** zeigen beide bei verbesserter oder gleichgebliebener Inhibition der CypA-PPlase-Aktivität ebenfalls eine abgeschwächte Inhibition bzgl. der Phosphatase-Aktivität des CaN, wobei CsA-Analog **31** auch hier den niedrigeren IC_{50} -Wert aufweist. Beide Derivate sind im Zellpenetrationsassay nicht in den Zellen nachgewiesen worden. Verbindung **31** wurde nach Vermessung im NFAT-Luciferase-Reporterassay, in dem keine Inhibition der Luciferase-Aktivität zu beobachten war, indirekt als extrazellulär lokalisiert bestätigt.

Da wie bereits erwähnt der (D-Glu)₂-Rest das Optimum der Kettenlänge ist, wurde ebenfalls der Einfluss dieses Restes auf die β -Ala-Derivate untersucht. Für die Verbindungen **34** und **36** resultiert aus der Amidbildung eine rund 1,5-fache Verschlechterung des PPlase-Inhibitionspotentials im Vergleich zu den jeweiligen Edukten **14** und **16**. Für das *N*-acetylierte Derivat **35** hingegen verbessert die Amidbildung mit dem (D-Glu)₂-Rest den IC_{50} -Wert der PPlase-Inhibition um den Faktor 3. Zusammenfassend kann daraus geschossen werden, dass die Bildung des (D-Glu)₂-Amides von Verbindungen mit einem basischen Stickstoff in der Kette sich nachteilig auf das PPlase-Inhibitionspotential der jeweiligen Verbindung auswirkt, während sie für Substanzen mit einem neutralem Stickstoff in der Kette diesbzgl. von Vorteil ist. Im indirekten CaN-Phosphatase-Aktivitätsassay zeigten sowohl das *N*-acetylierte Derivat **35** als auch die *N*-methylierte Verbindung **36** keine Inhibition der Phosphatase-Aktivität. Für Substanz **35** wurde im fluoreszenz-basierten Verdrängungsassay keine Verdrängung des fluoreszierenden intrazellulär lokalisiertem CsA-Derivates beobachtet, woraus sich in Zusammenhang mit der sehr guten PPlase-Inhibition auf eine extrazelluläre Lokalisation von Derivat **35** schließen lässt, wie zu erwarten war.

Für die Amin-substituierten CsA-Analoga **37-45** wirkt sich die Substitution durchgehend nachteilig auf die Inhibition der PPlase-Aktivität des CypA im protease-gekoppelten Assay aus. Bei dem *N*-methylierten und *N*-acetylierten Derivat **42** und dem *N*-acetylierten Geranyl-Derivat **45** fällt der negative Effekt nur minimal aus, während bei den restlichen sieben Substanzen das Inhibitionspotential signifikant herabgesetzt ist. Eine tendenzielle Abstufung in Zusammenhang mit der

Basizität der jeweiligen Aminofunktion ist zwar auffindbar (**Tabelle 5**), eine genaue Korrelation der IC₅₀-Werte mit den pK_B-Werten der entsprechenden Amine ist aber nicht vorhanden. Es ist ersichtlich, dass für die endständigen Amine des CsA durch das Derivat **37**, für das eine höhere Basizität zu erwarten ist, eine bessere PPlase-Inhibition erreicht wird. Anzunehmen ist, dass durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Wasserstoffatom am Stickstoff von Verbindung **37** und der Carbonylgruppe des Ala¹⁰³ des CypA in diesem Fall die eher hemmenden Einflüsse basischer Substituenten am CsA auf die CypA-Inhibition zum Teil kompensiert werden.

Tabelle 5: Übersicht über die pK_B-Werte von Methyl-, Dimethyl- und Trimethylamin (Latscha et al., 2008) mit den IC₅₀-Werten der PPlase-Inhibition der vergleichbar modifizierten CsA-Derivate 37-39.

| Amin ⁴ | pK _B -Wert | vergleichbar modifiziertes CsA-Derivat | PPlase-Inhibition IC ₅₀ [nM] |
|-------------------|-----------------------|--|---|
| Methylamin | 3,36 | 37 | 32,1 ± 8,1 |
| Dimethylamin | 3,29 | 38 | > 50 |
| Trimethylamin | 4,26 | 39 | 57,5 ± 6,9 |

Bzgl. der Amins substituenten führt sowohl der kurze Alkylrest der Methylgruppe in Derivat **38** als auch der langkettige unpolare Geranylrest in Verbindung **44** und der polaren Glycosyl-Substituenten in CsA-Analogen **43** zu einer erheblichen Verschlechterung der PPlase-Inhibition. Im Einklang mit bisherigen Beobachtungen führt die Acetylierung des Stickstoffes in den Derivaten **42** und **45** zu einer wesentlichen Verbesserung der Isomeraseinhibition im Vergleich zu den entsprechenden nicht acetylierten Verbindungen **38** und **44**. Das quartäre Ammoniumion **40** weist eine rund neunmal schlechtere PPlase-Inhibition für CypA auf im Vergleich zum CsA, was auf einen negativen Effekt der positiven Ladung in Bezug auf das PPlase-Inhibitionspotential schließen lässt. Im Phosphatase-Assay zur Bestimmung der CaN-Aktivität hat das primäre Amin **37** eine im Vergleich zu CsA 20-fach herabgesetzte Inhibitionswirkung, während die sieben Substanzen **38-44** keine Inhibition der CaN-Aktivität aufweisen. Im Kompetitionsassay wurde für die Amine **37** und **39** und das Amid **42** eine Verdrängung des fluoreszierenden CsA-Derivates und damit eine intrazelluläre Lokalisation dieser Substanzen nachgewiesen. Das quartäre Ammoniumion **40** wird hingegen außerhalb der Zellen gehalten, was überraschend ist, weil ein CsA-Derivat mit einem positiv geladenen Argininrest an der Hydroxy-Gruppe der [MeBmt]¹-Seitenkette den Transport in dermale Zellen erleichtert (Rothbard et al., 2000).

CD-Spektroskopie von CsA und den CsA-Derivaten 7, 19 und 37

Bei der Modifizierung des CsA erreicht die Einführung saurer Gruppen in das Molekül bessere IC₅₀-Werte für die Inhibition der PPlase-Aktivität von CypA als die Einführung basischer Gruppen und die Amidbildung mit dem (D-Glu)₂-Rest verbessert die PPlase-Inhibition ebenfalls. Diese Unterschiede in der Inhibition der CypA-Isomerase-Aktivität könnten aus einer Änderung der Sekundärstruktur des CsA hervorgehen, die den carbonsäurehaltigen und den (D-Glu)₂-Amiden verglichen mit basischen CsA-Derivaten eine bessere Bindung an CypA ermöglicht, wie dies für an Sar³ modifizierten CsA-Derivaten nachgewiesen wurde (Zhang et al., 2004). NMR-Studien eines wasserlöslichen, an den

⁴ Da keine pK_B-Werte für die CsA-Derivate selbst vorliegen, wurden für einen tendenziellen Vergleich bzgl. der Basizität die Methyl-substituierten Amine herangezogen.

Aminosäuren 3 und 8 modifizierten CsA-Derivates haben gezeigt, dass die CsA-Struktur in wässriger Lösung der im Komplex mit CypA sehr ähnlich ist (Wenger et al., 1994). Die Sekundärstruktur des CsA beinhaltet im Wesentlichen eine β -Schleife der Aminosäuren Abu² bis Val⁵ (Kessler et al., 1985). Eine häufig verwendete spektroskopische Methode, um Hinweise auf die Sekundärstruktur von Proteinen und Peptiden zu erlangen, stellt die Messung des Circular dichroismus (CD) dar. Die CD-Spektren von CsA und den drei Derivaten **7**, **19** und **37** wurden vermessen, um einen Zusammenhang zwischen den erzielten Inhibitionswerten bei der CypA-PPIase-Aktivität und möglichen strukturellen Veränderungen im CsA-Molekül durch einen sauren Rest (für **7**), einen basischen Rest (für **37**) und dem (D-Glu)₂-Amid (in **19**) an der MeBmt¹-Seitenkette zu untersuchen. Das eine Carbonsäure enthaltende Derivat **7** zeigt eine rund viermal bessere PPIase-Inhibition als das Amin **37** und durch das (D-Glu)₂-Amid **19** wird die Inhibition der PPIase-Aktivität im Vergleich zur freien Säure **7** um Faktor zwei verbessert.

Die CD-Spektren von CsA und seinen drei Derivaten sind in **Abbildung 26** dargestellt. Über den gesamten Messbereich ist für keine der Verbindungen eine Verschiebung der Bande des CsA zu beobachten, welche der β -Schleife zwischen Abu² und Val⁵ zuzuordnen ist. Für CsA-Analoga, welche eine veränderte Sekundärstruktur aufweisen, zeigten Zhang et al. (2004) eine signifikante Abnahme dieser Bande um bis zu 50%. Keines der vermessenen CsA-Derivate **7**, **19** und **37** wird folglich wie erwartet durch die jeweilige Substitution in der grundlegenden Konformation verändert.

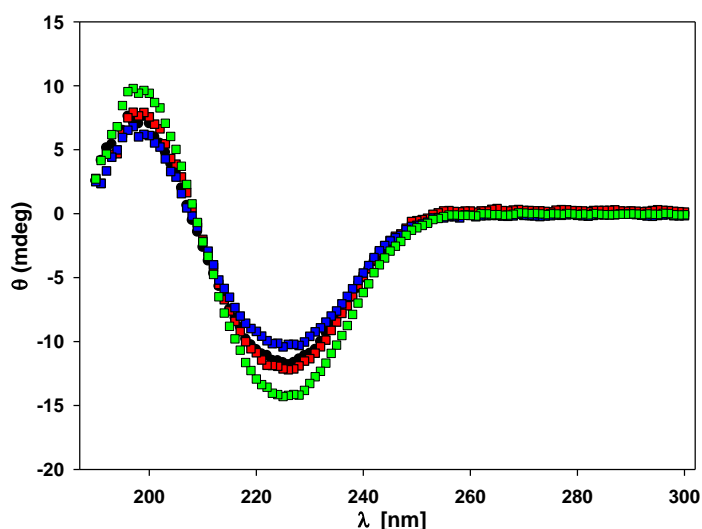


Abbildung 26: CD-Spektren von CsA (schwarz) und den CsA-Derivaten **7** (blau), **19** (grün) und **37** (rot). Die Messungen erfolgten bei 37 °C als 10 μ M-Lösungen in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) unter Zusatz von 0,1% Methanol. Die Schichtdicke betrug 5 mm.

Heterozyklen durch ‚Click-Chemie‘ und direkte Kupplung

Triazole und Tetrazole können aufgrund ihrer sterischen und elektronischen Eigenschaften als Mimetika für Carbonsäuregruppen fungieren. Die Modifikation der MeBmt¹-Seitenkette mit diesen Heterozyklen bietet die Möglichkeit bei vergleichbarer Azidität unter Verzicht einer Amidbindung in der modifizierten Seitenkette eine höhere proteolytische Stabilität zu erlangen und dadurch die Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Die Kupplung mit Acetylenen ermöglicht es über ‚Click-Chemie‘ mit 1,3-Dipolen Heterozyklen zu generieren. ‚Click-Chemie‘ bezeichnet keine spezielle einzelne Reaktion, sondern vielmehr eine Chemie, die nach Vorbild der Natur die Herstellung von Substanzen auf schnelle, zuverlässige und selektive Weise aus kleineren Einheiten ermöglicht (Kolb et al., 2001).

Die C,C-Bindungsknüpfung erfolgte ausgehend vom [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** mit dem entsprechend substituierten terminalen Kupfer(I)-Acetylid, welches *in situ* aus Kupfer(I)iodid und dem substituierten Alkin erzeugt wurde. So konnten die Verbindungen **46** und **47** durch Reaktion von Propiolsäuremethylester (und anschließender Schutzgruppenabspaltung) bzw. Propargylamin erhalten werden. Für die Zyklisierung wurde als 1,3-Dipol das Azid-Ion verwendet (**Abbildung 27**). Daraus ergab sich nach Reaktion mit **46** das Triazol-Derivat **48**. Die analoge Reaktion ausgehend von Verbindung **47** brachte keinen Erfolg, da dessen donorsubstituierte Dreifachbindung nicht reaktiv genug ist.

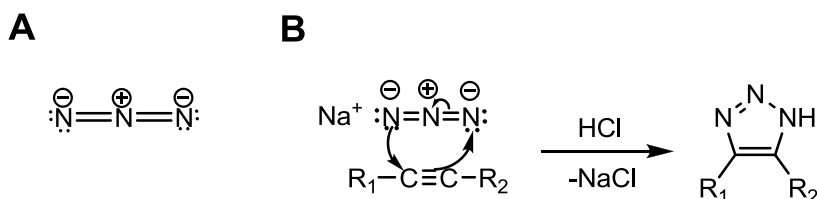
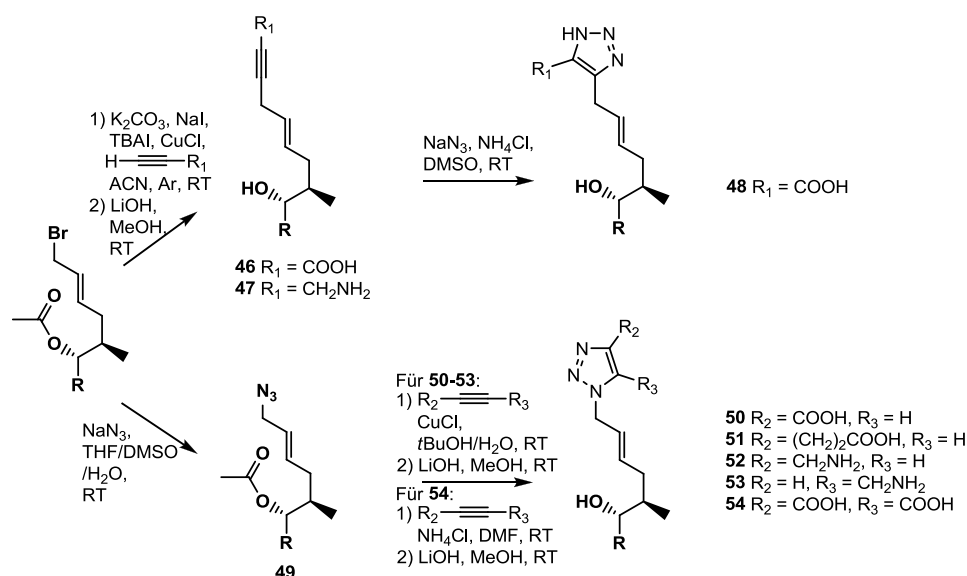


Abbildung 27: 1,3-dipolare Cycloaddition des Azid-Anions an ein Acetylen. A) Grenzstruktur des Azid-Anions, B) Darstellung eines substituierten Triazols aus NaN_3 und einem Acetylen.

Des Weiteren kann der Heterozyklus über ein Stickstoffatom mit dem CsA-Molekül verbunden sein. Dafür wurde zuerst das [O-Acetyl-MeBmt- N_3]¹-CsA **49** durch die Umsetzung des [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** mit NaN_3 erzeugt. Anschließend wurde mit Propiolsäuremethylester umgesetzt, woraus sich nach Abspaltung der Schutzgruppe Verbindung **50** ergab. Die analoge Reaktion mit 4-Pentinsäure führte zu Derivat **51**. Bei der Reaktion mit Propargylamin konnten die zwei Produkte **52** und **53** im Verhältnis von ca. 2:1 isoliert werden (**Abbildung 28**). Die Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie hat ergeben, dass es sich bei dem Hauptprodukt um Verbindung **52** handelt.

Aus der [2+3]-Cycloadditionsreaktion mit dem Dimethylester der Acetylendicarbonsäure resultiert das an beiden Kohlenstoffatomen des Triazols substituierte Derivat **54**.



⁵ Für die Darstellung der Derivate **46** und **48** wurde der Methylester der Propiolsäure verwendet, welcher zusammen mit der Acetylschutzgruppe durch LiOH abgespalten wird. Um die Übersichtlichkeit des Schemas zu wahren, wurde bei der Benennung der variablen Reste darauf verzichtet, die Methylesterschutzgruppe explizit zu erwähnen.

Bei der Cu(I)-katalysierten Cycloaddition, welche nur für terminale Alkine durchführbar ist, handelt es sich dabei formal nicht um eine 1,3-dipolare Cycloaddition. Ein möglicher Mechanismus für die Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition ist in **Abbildung 29** gegeben. Der Katalysezyklus beginnt mit der Bildung einer Cu(I)-Acetylid-Spezies über den π -Komplex **(i)**. Berechnungen zeigen, dass die Koordination des Cu den pK_a des terminalen Wasserstoffes im Alkin um bis zu 9,8 pH-Einheiten erniedrigt, sodass in wässrigen Systemen auch Deprotonierungen ohne Zugabe von Base möglich sind. Angenommen wird, dass das zweite Cu im Dimer **(ii)** die Aktivierung der Azid-Gruppe bewirkt. Außerdem ist die Bildung eines π -Komplexes des terminal gebundenen Acetylides mit dem sich in der Nähe befindlichen Cu möglich. Dies erhöht die Reaktivität des Acetylides und begünstigt durch die verringerte Elektronendichte im Alkin die Zyklisierung (Bock et al, 2006).

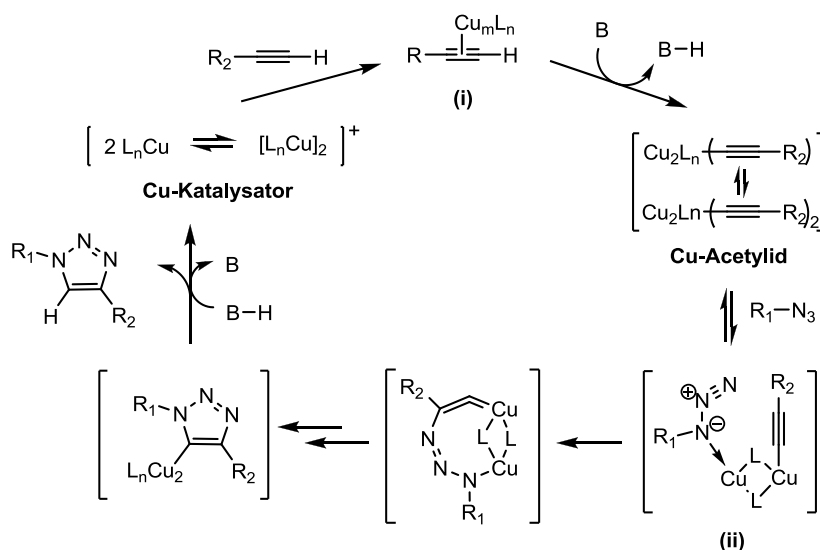


Abbildung 29: Vorgeschlagener Mechanismus für die Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition. (nach Bock et al., 2006) (L = Ligand; B = Base)

Für das unsubstituierte Triazol-Derivat wurde auf eine direkte Kupplung zwischen dem 1,2,3-Triazol bzw. dem 1,2,4-Triazol und dem [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** unter Verwendung von Kaliumcarbonat als Base zurückgegriffen, da dies weniger Reaktionsstufen als die ‚Click-Chemie‘ benötigt und bessere Ausbeuten erzielt werden. Dadurch ergaben sich bei der Reaktion mit 1,2,3-Triazol die beiden Produkte **55** und **56**, welches über das mittlere Stickstoffatom an das CsA gebunden ist, im Verhältnis 5:1. Ebenso resultierten aus der Reaktion mit 1,2,4-Triazol die beiden Produkte **57** und **58** im Verhältnis 6:1. Analoge Reaktionen wurden mit Tetrazol - hier entstanden die zwei Produkte **59** und **60** im Verhältnis 2:1 - und Pyrazol durchgeführt, woraus sich Verbindung **61** ergab (**Abbildung 30**). Die Struktur der Hauptprodukte wurde mittels NMR-Spektroskopie bestätigt.

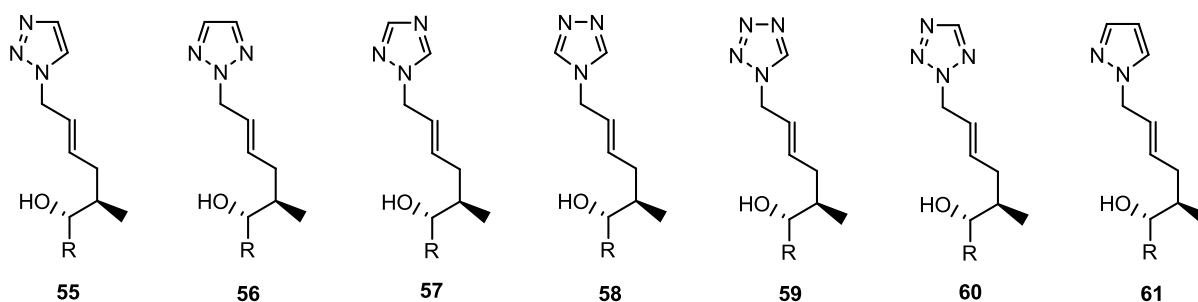


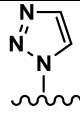
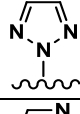
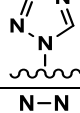
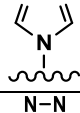
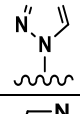
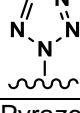
Abbildung 30: Struktur der Triazol-Derivate **55-58**, der Tetrazol-Derivate **59** und **60** und des Pyrazol-Derivates **61**. (R = Ring des CsA-Moleküls)

Biochemische Daten der heterozyklischen CsA-Derivate

Wie bereits zuvor beobachtet, wird auch nach Vermessung der CsA-Derivate **46** und **47** im PPlase-Assay eine bessere PPlase-Inhibition durch das eine Carbonsäurefunktion enthaltende Derivat **46** erreicht als durch das aminofunktionalisierte CsA-Analogon **47**. Beide sind aber verglichen mit CsA 1,5-fach bzw. 2,5-fach schlechtere PPlase-Inhibitoren (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Übersicht über die Inhibition der PPlase-Aktivität und der CaN-Aktivität sowie der intrazellulären Präsenz durch CsA und die Acetylen-substituierten CsA-Derivate **46** und **47** und die CsA-Triazol-, -Tetrazol- und -Pyrazol-Derivate **48, 50-61**.

| CsA-Derivat | Rest | PPlase-Inhibition IC ₅₀ [nM] | CaN-Inhibition IC ₅₀ [nM] | intrazelluläre Präsenz |
|-------------|---------------|--|---|---------------------------|
| CsA | --- | 9,1 ± 0,8 | 55,9 ± 10,1 | ja |
| 46 | Propiolsäure | 13,3 ± 1,8 | > 10000 | ja (ab 10 µM) |
| 47 | Propargylamin | 23,0 ± 2,3 | ~ 3880 | ja |
| 48 | | 12,0 ± 1,5 | <i>n.g.</i> | nein |
| 50 | | 32,0 ± 7,7 | k.l. | nein |
| 51 | | 10,0 ± 1,9 | <i>n.g.</i> | nein |
| 52 | | 22,4 ± 3,0 | > 10000 | nein |
| 53 | | 46,1 ± 4,6 | > 10000 | ja |
| 54 | | 19,5 ± 4,0 | k.l. | nein |

| | | | | |
|----|---|------------|---------|--------------|
| 55 |  | 16,1 ± 3,1 | ~ 800 | ja |
| 56 |  | 46,5 ± 3,5 | n.g. | n.g. |
| 57 |  | 21,8 ± 1,8 | n.g. | ja |
| 58 |  | 25,1 ± 2,6 | > 10000 | ja (ab 1 µM) |
| 59 |  | 19,3 ± 3,0 | ~ 3000 | ja |
| 60 |  | 17,0 ± 1,8 | k.l. | ja |
| 61 | Pyrazol | 36,2 ± 2,6 | n.g. | n.g. |

(n.g. = nicht getestet; k.l. = keine Inhibition)

Die Heterozyklen in der Allylposition der Derivate **48-61** beeinflussen die Inhibition der PPlase-Aktivität nicht besonders signifikant. Auch in den Substituenten an den Heterozyklen weisen saure Gruppen eine bessere PPlase-Inhibition auf als solche mit basischen Funktionen. Im Gegensatz dazu wird die CaN-Phosphatase-Aktivität durch alle Substanzen **46-61** drastisch reduziert. Dies resultiert womöglich aus der Rigidität der 5-gliedrigen Ringe, die es den Substituenten nicht ermöglicht im CypA-CsA-CaN-Komplex in die durch das Asparagin¹²² (Asn¹²²) des CaN und das MeLeu⁶ des CsA gebildete Tasche zu passen (Jin et al., 2002). Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Produkten ist bei der Zellpermeabilität zu beobachten: Verbindungen mit sauren Gruppen werden extrazellulär lokalisiert und Substanzen mit basische Aminofunktionen sind tendenziell intrazellulär lokalisiert. Charakteristisch ist auch, dass die Derivate, bei denen der Heterozyklus über einen Stickstoff an das CsA-Molekül gebunden ist, in den Zellen lokalisiert werden. Dies beruht vermutlich auf der Eliminierung der Carbonsäure-Mimetika-Eigenschaften durch den Verlust des Stickstoff-gebundenen Wasserstoffes.

Das Resultat aus allen drei Eigenschaften lässt vermuten, dass sich über heterozyklische Substituenten in der Allylposition des CsA die Zellpermeabilität nicht-immunosuppressiver Derivate steuern lässt.

Derivatisierung durch Olefin-Metathese

Eine weitere Möglichkeit zur Modifizierung der MeBmt-Seitenkette bietet die Olefin-Metathese-Reaktion der Doppelbindung mit einer anderen - bestenfalls endständigen - Doppelbindung. Diese Reaktion ermöglicht die Verlängerung der Seitenkette ohne Insertion eines Heteroatoms. Die Olefin-Metathese-Reaktionen wurden unter Verwendung des Hoveyda-Grubbs-Katalysators der zweiten Generation (HGII) (**Abbildung 31A**) mit 1,2-Dichlorbenzen (DCB) als Lösungsmittel in der Mikrowelle

durchgeführt (Marinec et al. 2009). Die Darstellung der Produkte **62-66** ist in **Abbildung 31B** wiedergegeben. So entstand aus der Umsetzung von CsA mit Acrylsäure Derivat **62** und in analoger Weise unter Verwendung von 4-Pentensäuremethylester bzw. 6-Heptensäure als Reaktand die Derivate **63** (und nach Abspaltung des Methylesters daraus **64**) und **65**. Die Reaktion in Gegenwart von 3-Butenylphosphonsäurediethylester lieferte Verbindung **66**. Hierbei konnte die Spaltung der Ethylesterschutzgruppen mit den gängigen Reaktionsbedingungen jedoch nicht realisiert werden: So führte weder die Umesterung mit Trimethylsilylchlorid oder -bromid allein, mit Trimethylsilylchlorid in Gegenwart von Natriumiodid noch die Verwendung von Ammoniumfluorid zum gewünschten Produkt, sondern – nachgewiesen durch Massenspektrometrie - entweder zum Erhalt des Eduktes oder zur Zersetzung des CsA-Moleküles unter Ringöffnung.

Dem Reaktionsmechanismus geschuldet ergibt sich für die neugebildete Doppelbindung jedoch in den meisten Fällen keine Selektivität, sondern ein Gemisch aus *trans* und *cis*-Olefin. So konnte lediglich im Fall von Substanz **62** ein Produkt mit *trans*-Konfiguration der Doppelbindung erhalten werden, welche sich aus der Kopplungskonstanten der beiden olefinischen Protonen von 15-16 Hz bestimmen lässt. Für die Verbindungen **63** und **66** wurden *trans*:*cis*-Verhältnisse der Doppelbindung von 70:30 für die Produkte mittels NMR-Spektroskopie ermittelt. Somit ergibt sich auch für CsA-Analog **64** ein *trans*:*cis*-Verhältnis von 70:30. Das Derivat **65** wurde nicht im NMR vermessen.

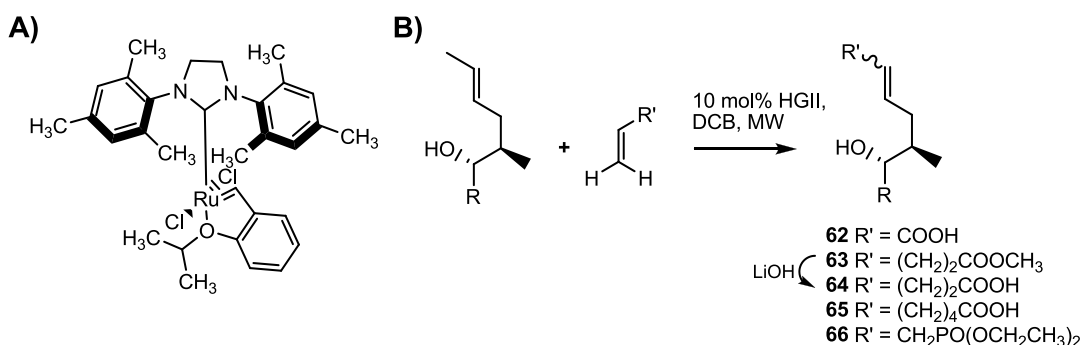


Abbildung 31: Olefin Cross Metathese-Reaktion. A) Struktur des Hoveyda-Grubbs-Katalysators der zweiten Generation, B) Reaktionsschema zur Darstellung der Verbindungen **62-66**. (R = Ring des CsA-Moleküls)

Mittels Pd (Aktivkohle)/H₂ wurden die Doppelbindungen der Produkte der Olefin-Metathese-Reaktionen zu Einfachbindungen reduziert. So entstanden die Derivate **67-70** (**Abbildung 32**).

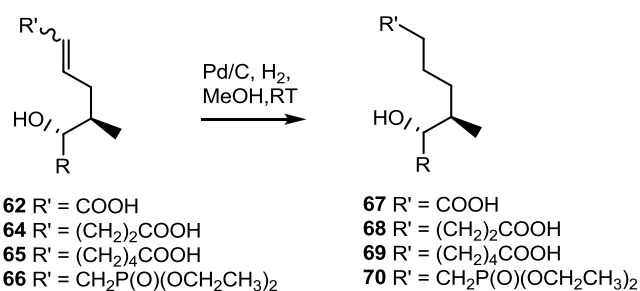


Abbildung 32: Hydrierung der olefinischen Doppelbindung.⁶

⁶ Verbindung **63** wurde nicht hydriert, da es sich dabei um die Vorstufe zu Derivat **64** handelt.

Da die (D-Glu)₂-Kette geeignet ist, Substanzen außerhalb der Zelle zu halten, wurde das (D-Glu)₂-Amid der Verbindung **64** durch Kupplung in Gegenwart von HATU mit DIPEA als Base synthetisiert, um den Einfluss dieses Restes auf ein Olefinmetathese-Produkt zu untersuchen. Das resultierende Derivat **71** ist in **Abbildung 33** dargestellt. Da das Edukt von Verbindung **71** ein Gemisch aus *trans*- und *cis*-Olefin im Verhältnis von rund 70:30 ist, liegt **71** ebenfalls als Gemisch der *trans*- und der *cis*-Form vor.

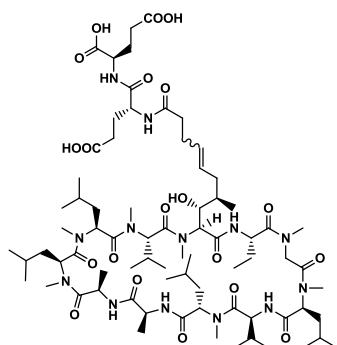


Abbildung 33: Struktur der Verbindung **71**.

Biochemische Daten der Derivate 62-71

Die Produkte der Olefin-Metathese-Reaktionen zeigen bis auf Derivat **62**, welches formal der Oxidation der allylständigen Methylgruppe der MeBmt-Seitenkette zur Carbonsäure entspricht, alle eine der des CsA vergleichbare PPlase-Inhibition für CypA (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Übersicht über die Inhibition der PPlase-Aktivität und der CaN-Aktivität sowie der intrazellulären Präsenz durch CsA und die Olefinmetatheseprodukte **62-66**, deren Dihydro-Analoga **67-70** und dem (D-Glu)₂-Amid **71**.

| CsA-Derivat | Doppelbindung | PPlase-Inhibition IC ₅₀ [nM] | CaN-Inhibition IC ₅₀ [nM] | intrazelluläre Präsenz |
|-------------|-----------------------------------|---|--------------------------------------|------------------------|
| CsA | vorhanden (<i>trans</i>) | 9,1 ± 0,8 | 55,9 ± 10,1 | ja |
| 62 | vorhanden (<i>trans</i>) | 365,7 ± 25,9 | ~ 1400 | --- |
| 63 | vorhanden (<i>trans:cis</i> 7:3) | 12,0 ± 1,6 | ~ 280 | ja |
| 64 | vorhanden (<i>trans:cis</i> 7:3) | 12,0 ± 0,7 | ~ 700 | nein |
| 65 | vorhanden | 7,6 ± 0,9 | ~ 4280 | ja |
| 66 | vorhanden (<i>trans:cis</i> 7:3) | 9,1 ± 1,4 | k.l. | ja |
| 67 | reduziert | 69,5 ± 4,0 | > 10000 | --- |
| 68 | reduziert | 17,5 ± 2,3 | k.l. | ja |
| 69 | reduziert | 5,6 ± 0,9 | > 10000 | ja |
| 70 | reduziert | 25,5 ± 1,6 | <i>n.g.</i> | <i>n.g.</i> |
| 71 | vorhanden (<i>trans:cis</i> 7:3) | 8,8 ± 1,1 | k.l. | nein |

(*n.g.* = nicht getestet; k.l. = keine Inhibition)

Verbindung **62** ist hingegen um ein 40-faches schlechter und zeigt folglich diesbzgl. kaum ein Inhibitionspotential. Dies könnte aus einer intramolekularen Michael-Addition der α,β-ungesättigten Carbonylverbindung an die Hydroxy-Gruppe resultieren, die durch den pH-Wert von 7,5 während des PPlase-Assays begünstigt wird. Das Produkt dieser Michael-Addition (**Abbildung 34**) zeigt durch die

fehlende freie Hydroxy-Funktion am C_β der MeBmt¹-Seitenkette kein PPIase-Inhibitionspotential (Wenger, 1985).

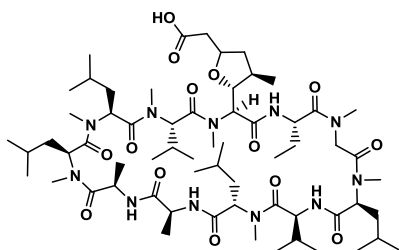


Abbildung 34: Struktur des Produktes der intramolekularen Michael-Addition von CsA-Derivat **62**.

Durch die Hydrierung der Doppelbindung kann für die Derivate **67** und **69** eine Verbesserung der PPIase-Inhibition um Faktor 5 bzw. 1,3 im Vergleich zu den entsprechenden ungesättigten Verbindungen **62** und **65** erreicht werden. Für die CsA-Analoga **68** und **70** ergab sich eine Verschlechterung des PPIase-Inhibitionspotenzials um rund 50 bzw. 150% im Vergleich zu den entsprechenden ungesättigten Verbindungen **64** und **66**.

Außer für Verbindung **62** zeigen die eingeführten Substituenten an der Doppelbindung und die Hydrierung der Doppelbindung keine wesentliche Beeinflussung der PPIase-Inhibition, aber einen großen Einfluss auf die CaN-Inhibition im Phosphatase-Assay. Durch die Substitution werden deutlich verschlechterte IC₅₀-Werte für alle Verbindungen aus den Olefin-Metathese-Reaktionen erhalten. Die Doppelbindung ist sehr wichtig für die Inhibition von CaN, da nach deren Reduktion die IC₅₀-Werte für die CaN-Inhibition für alle Derivate deutlich schlechter sind. Die Verlängerung der C-C-Bindungslänge von rund 130 pm im Alken auf rund 150 pm in der gesättigten Seitenkette und die hinzukommende freie Drehbarkeit und die Einfachbindung führen folglich zu einer verminderten Affinität des CypA-CsA-Komplexes für CaN, da die Seitenkette dadurch nicht mehr in die durch MeLeu⁶ des CsA und der Seitenkette des Asn¹²² des CaN gebildeten unpolaren Tasche passt. Dies stört womöglich die Ausbildung der Wasserstoffbrücken zwischen Val⁵ des CsA und Tryptophan³⁵² (Trp³⁵²) des CaN sowie Ala⁷ des CsA und Tyrosin³⁴¹ (Tyr³⁴¹) und somit wesentlich die Wechselwirkung zwischen CaN und dem CypA-CsA-Komplex (Jin et al., 2002; Huai et al., 2002).

Für die drei Derivate **62**, **64** und das (D-Glu)₂-Amid **71** wurde im fluoreszenz-basierten Kompetitionsassay an Jurkat-Zellen keine Verdrängung des fluoreszierenden CsA-Derivates gefunden was auf eine extrazelluläre Lokalisation schließen lässt. Verbindung **68** wurde ab einer Konzentration von 10 μM in den Zellen nachgewiesen, die Derivate **63**, **65**, **67** und **69** auch schon bei niedrigeren Konzentrationen. In vorhergehenden Derivaten haben saure Gruppen an der *trans*-ständigen Position der Doppelbindung dazu geführt, dass diese Verbindungen nicht in den Zellen lokalisiert werden. Nun werden Substanzen mit Carbonsäure-Funktionen in die Zelle verlagert, was womöglich auf den Einfluss des neuen *cis*-Isomers zurückzuführen ist, da die betreffenden Verbindungen als *trans/cis*-Gemisch vorliegen.

Derivatisierung durch oxidative Spaltung der Doppelbindung und reduktive Aminierung

Eine andere Möglichkeit die MeBmt¹-Seitenkette zu modifizieren bietet die oxidative Spaltung der C=C-Doppelbindung, welche mit einer Verkürzung der Seitenkette einhergeht. Wie bereits gezeigt

wurde, ist die Doppelbindung für die PPLase-Inhibition eher unbedeutend, besitzt aber großen Einfluss auf die CaN-Inhibition. Nach der oxidativen Spaltung der Doppelbindung kann durch die reduktive Aminierung eine weitere Funktionalisierung der Seitenkette erfolgen.

Die oxidative Spaltung ist mit Ruthenium(VIII)oxid möglich, welches *in situ* aus einer katalytischen Menge Ruthenium(III)chlorid Hydrat in Gegenwart von einer stöchiometrischen Menge Natriumperiodat als Kooxidans erzeugt wird. Formal wird die Doppelbindung zuerst zum Diol oxidiert, welches dann durch das Periodat gespalten wird (**Abbildung 35**).

Als Ausgangsmaterial diente [O-Acetyl-MeBmt]¹-CsA **3**. Durch Steuerung der Reaktionsbedingungen durch die Zutropfgeschwindigkeit und die Reaktionszeit kann das Verhältnis des Aldehyds [CH(O-Acetyl)CH(CH₃)CH₂CHO]¹-CsA **72** und der Säure **73**, welche ein unerwünschtes Nebenprodukt darstellt, zu Gunsten des Aldehyds **72** verschoben werden.

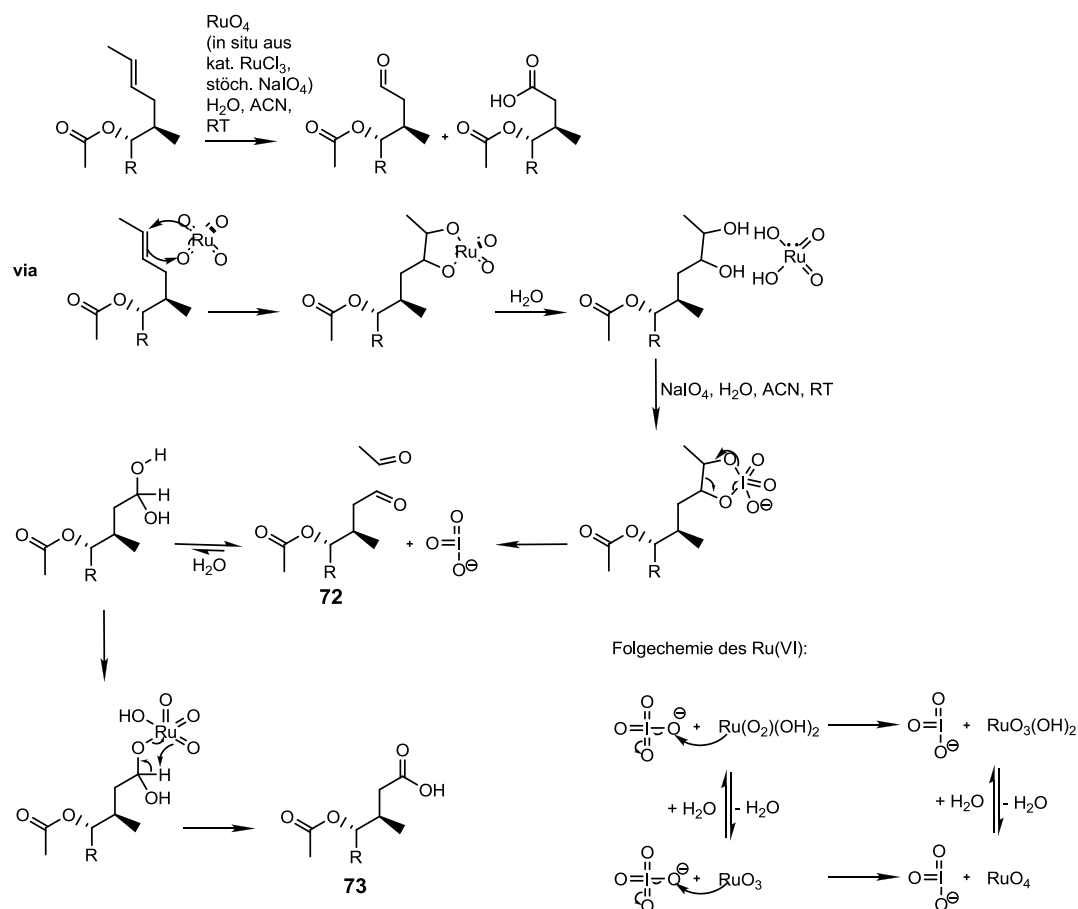


Abbildung 35: Oxidative Spaltung der Doppelbindung zu Aldehyd **72** und Säure **73**. NaIO_4 , das stöchiometrisch eingesetzt wird, spielt eine Doppelrolle und oxidiert zum einen Ru(VI) zurück zu Ru(VIII) und spaltet zum anderen das Glykol. (R = CsA-Ring) Um die Übersichtlichkeit zu wahren, sind die Oxidationszahlen in der Abbildung nicht extra angegeben. Die Oxidationszahlen sind: IO_4^- (+7); IO_3^- (+5); RuO_4 und $\text{Ru}(\text{O}_3)(\text{OH})_2$ (+8); $\text{Ru}(\text{O}_2)(\text{OH})_2$ und RuO_3 (+6). (nach R. Brückner, 2004)

Der so gewonnene Aldehyd **72** lässt sich über die reduktive Aminierung mit Aminen koppeln, wobei zuerst das primäre Amin an die Carbonylgruppe kondensiert wird und im nächsten Schritt die Reduktion der C=N-Doppelbindung des entstandenen Aldimin zum sekundären Amin erfolgt (**Abbildung 36**). Als Hydridionenüberträger wurde Natriumcyanoborhydrid verwendet. Auch bei der

reduktiven Aminierung ist vor Abspaltung der O-Acetyl-Schutzgruppe eine Acetylierung desamins zum Amid durchgeführt worden.

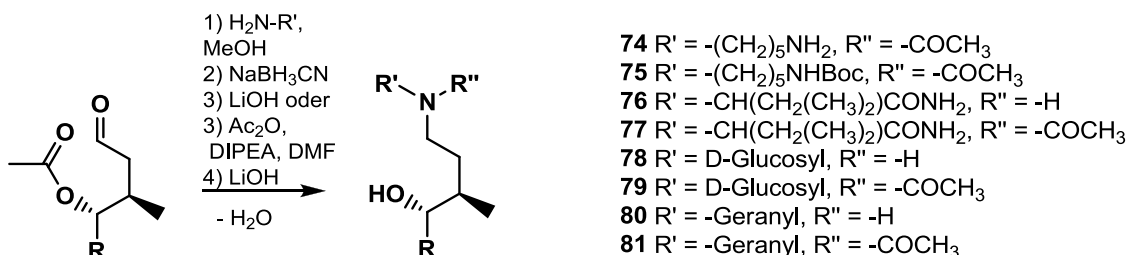


Abbildung 36: Schema der reduktiven Aminierung zur Darstellung der Verbindungen **74-81**. (R = Ring des CsA-Moleküls)

Biochemische Daten der Produkte aus der reduktiven Aminierung

Wie erwartet sind die mittels reduktiver Aminierung synthetisierten Verbindungen **74-81** nicht immunosuppressiv, zeigen aber überraschenderweise eine signifikant verschlechterte Inhibition der PPLase-Aktivität im protease-gekoppelten Assay (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Übersicht über die Inhibition der PPLase-Aktivität und der CaN-Aktivität durch die CsA-Analoga **74-81**.

| CsA-Derivat | | | PPLase-Inhibition IC_{50} [nM] | CaN-Inhibition IC_{50} [nM] |
|-------------|---|------------------|--|---|
| | R' | R'' | | |
| 74 | $-(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ | $-\text{COCH}_3$ | $165,2 \pm 10,2$ | k.l. |
| 75 | $-(\text{CH}_2)_5\text{NHBoc}$ | $-\text{COCH}_3$ | $62,4 \pm 9,6$ | > 10000 |
| 76 | $-\text{CH}(\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2)\text{CONH}_2$ | $-\text{H}$ | $39,6 \pm 3,6$ | k.l. |
| 77 | $-\text{CH}(\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2)\text{CONH}_2$ | $-\text{COCH}_3$ | $338,0 \pm 37,3$ | k.l. |
| 78 | D-Glucosyl | $-\text{H}$ | > 50 | k.l. |
| 79 | D-Glucosyl | $-\text{COCH}_3$ | > 50 | k.l. |
| 80 | -Geranyl | $-\text{H}$ | $554,8 \pm 15,8$ | k.l. |
| 81 | -Geranyl | $-\text{COCH}_3$ | $83,8 \pm 4,5$ | n.g. |

(n.g. = nicht getestet; k.l. = keine Inhibition)

Dies resultiert vermutlich aus dem negativen Einfluss der Amino-Gruppe, was in Einklang mit den voran gegangenen Ergebnissen steht. Mit Ausnahme der CsA-Analoga **76** und **77** konnten durch die Acetylierung des Stickstoffes bessere IC_{50} -Werte für die PPLase-Inhibition von CypA erreicht werden. Selbst die Boc-Gruppe an dem endständigen Amin in Verbindung **75** trägt zur Verbesserung der CypA-Inhibition bei.

Aufgrund der signifikanten Verschlechterung des PPLase-Inhibitions potentials für alle Verbindungen aus der reduktiven Aminierung wurde diese Art der chemischen Modifizierung des CsA nicht weiter untersucht.

2.2 Rückrat-NH Modifizierung der Positionen D-Ala⁸ und Val⁵ von CsA

Seit der Entdeckung von CsA wurden Versuche unternommen, nicht-immunsuppressive CsA-Derivate zu entwickeln. CsA-Derivate, welche CaN inhibieren ohne an CypA zu binden, sind hingegen bisher eher selten (Baumgrass et al., 2004). Die selektive Alkylierung an verschiedenen Stellen bereitet eine vielseitige Möglichkeit das Peptidrückrat des CsA zu modifizieren. Neben der O- und der C-Alkylierung können die vier nicht-methylierten Amidstickstoffatome des CsA ebenfalls alkyliert werden. Das Stickstoffatom des Val⁵ wurde beispielsweise durch reaktive Alkylhalide in Gegenwart der sterisch anspruchsvollen Phosphazenen-Base P₄-t-Bu selektiv alkyliert (Papageorgiou et al., 1997). Die Reaktion von CsA mit Natriumhydrid und Ethylenoxid führt zu einer Alkylierung des Stickstoffatoms des Ala⁷ (Davalian et al., 2001). Eine andere Arbeit deutet auf eine Möglichkeit zur selektiven Alkylierung des Stickstoffatoms des D-Ala⁸ hin (Bérard, 2008). Die Modifizierung des D-Ala⁸ ist von Interesse, da dieses sich in der Kristallstruktur des CypA-CsA-CaN-Komplexes weder in der CypA- noch in der CaN-Binderegion befindet (Jin et al., 2002; Huai et al., 2002).

Die Alkylierung des D-Ala⁸ erfolgte ausgehend vom [O-Triisopropylsilyl-MeBmt]¹-CsA **4** durch das zyklische Sulfat 1,3,2-Dioxathiolan-2,2-dioxid in Gegenwart von Lithiumbis(trimethylsilyl)amid als Base (Bérard, 2008). Nach Abspaltung der Sulfat- und der Triisopropylsilylether-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen wurde neben dem am D-Ala⁸ alkylierten Derivat **82** auch Verbindung **83**, mit dem entsprechenden Alkylrest am Stickstoff des Val⁵ im Verhältnis von 3:1 erhalten (**Abbildung 37**).

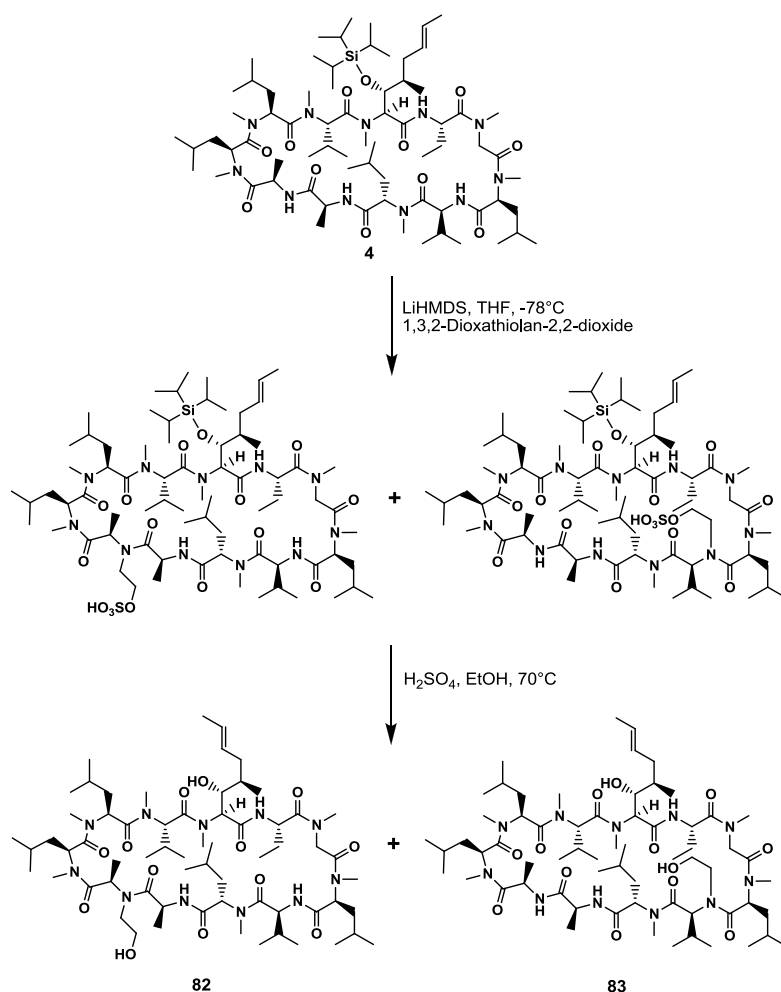


Abbildung 37: Syntheschema der CsA-Derivate **82** und **83**.

Die Alkylierung des D-Ala⁸ am Stickstoff konnte mittels NMR-Spektroskopie im ¹H/¹H-TOCSY nachgewiesen werden. Ebenso wurde für das entstandene Nebenprodukt **83** mittels NMR-Spektroskopie eine Alkylierung am Val⁵ nachgewiesen.

Biochemische Daten von Val⁵- und D-Ala⁸-modifizierten CsA-Derivaten

Die Inhibition der PPlase-Aktivität von CypA im PPlase-Assay durch CsA und die CsA-Verbindungen **82** und **83** ist in **Tabelle 9** wiedergegeben. Derivat **82** (IC₅₀ = 88,1 ± 7,3 nM) ist ein rund neunmal schlechterer Inhibitor als CsA (IC₅₀ = 9,1 ± 0,8 nM). Verbindung **83** hingegen inhibitiert CypA in dessen PPlase-Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von 42,6 ± 2,4 nM und ist damit diesbzgl. lediglich um Faktor 4 schlechter als CsA.

Tabelle 9: Übersicht über die Inhibition der PPlase-Aktivität, der CaN-Aktivität und der NFAT-Reportergen-Aktivität durch die CsA-Analoga **82** und **83**.

| CsA-Derivat | N-alkyliert an | PPlase-Inhibition IC₅₀ [nM] | CaN-Inhibition IC₅₀ [nM] | NFAT-Inhibition IC₅₀ [nM] |
|--------------------|-----------------------|---|--|---|
| CsA | - | 9,1 ± 0,8 | 55,9 ± 10,1 | 1,6 ± 0,3 |
| 82 | D-Ala ⁸ | 88,1 ± 7,3 | 55,3 ± 4,1 | 4,6 ± 0,7 |
| 83 | Val ⁵ | 42,6 ± 2,4 | 826,7 ± 231,8 | 110,3 ± 30,8 |

Im CaN-Phosphatase-Assay zeigt Derivat **82** im Komplex mit CypA einen dem CsA (IC₅₀ = 55,9 ± 10,1 nM) vergleichbaren Wert von IC₅₀ = 55,3 ± 4,1 nM, während Verbindung **83** einen IC₅₀-Wert von 826,7 ± 231,8 nM aufweist. Im analogen direkten CaN-Inhibitionsassay, d.h. in Abwesenheit von CypA, zeigen beide Derivate bei einer Konzentration von bis zu 10 µM keine inhibitorische Wirkung (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Ergebnisse liefert der Luciferase-gekoppelte NFAT-Reporterassay bzgl. der Reduktion der NFAT-gesteuerten Reporterexpression (Baumgrass et al., 2004; Erdmann et al., 2010), in dem CsA und das CsA-Analog **82** ein annähernd gleiches Inhibitionspotential für die Transkriptionsaktivität von NFAT mit IC₅₀ = 1,6 ± 0,3 nM bzw. (IC₅₀ = 4,6 ± 0,7 nM) zeigen, wohingegen Derivat **83** ein deutlich verringertes Inhibitionsvermögen mit einem IC₅₀-Wert von 110,3 ± 30,8 nM zeigt.

Während das CsA-Analog **82** folglich bei einer reduzierten Affinität für CypA bzgl. des immunsuppressiven Potentials dem CsA ähnliche Effekte aufweist, zeigt Verbindung **83** durch stark verringerte immunsuppressive Eigenschaften, welche jedoch mit einer leicht abgeschwächten PPlase-Inhibition einhergehen. Die Eigenschaften von Verbindung **83** sind nicht unerwartet, da Val⁵ sich in der Kristallstruktur des ternären CypA-CsA-CaN-Komplexes in dem Bereich des CsA-Moleküls (Aminosäuren 4-7) befindet, der an die CaN-Substraterkennungsdomäne gebunden ist und sich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff des Val⁵ mit dem Indol-NH des Trp³⁵² des CaN ausbildet (**Abbildung 38**) (Huai et al., 2002; Jin et al., 2002). Änderungen der Struktur und der Konformation an diesem Rest können folglich leicht die Affinität zwischen dem CypA-CsA-Komplex und CaN beeinflussen.

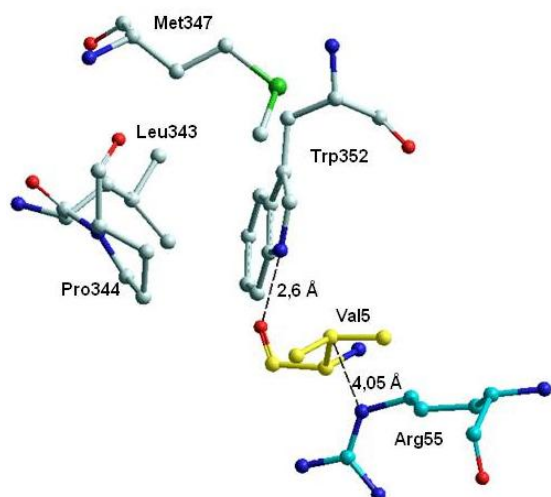


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Val⁵ des CsA (gelb) und den Seitenketten von CypA (Arg⁵⁵) (hellblau) und CaN-Untereinheit A (Leu³⁴³, Pro³⁴⁴, Met³⁴⁷, Trp³⁵²) (grau) im CypA-CsA-CaN-Komplex (hydrophobe Wechselwirkungen im Bereich von 3,2-4,1 Å).

Überraschend sind hingegen die durch CsA-Analog **82** erzielten Effekte, da dieses im Vergleich zum CsA ein 10-fach schlechterer CypA-Inhibitor ist, aber im binären Komplex mit CypA einen unerwartet guten CaN-Bindungspartner darstellt mit einem IC₅₀-Wert im Bereich von CsA. Obwohl D-Ala⁸ in der Kristallstruktur des tertiären CypA-CsA-CaN-Komplexes weder direkten Kontakt mit CypA noch mit CaN hat (Huai et al., 2002), werden die biochemischen Eigenschaften von Verbindung **82** signifikant durch die 2-Hydroxyethylgruppe beeinflusst. Möglicherweise induziert die entstandene sekundäre Amidbindung an dieser Position eine Änderung bzgl. der gesamten CsA-Konformation, die sich zwar nachteilig auf die Bindung von CsA-Derivat **83** an CypA auswirkt, aber, nachdem das Derivat an CypA gebunden ist, die Bildung des ternären Komplexes mit CaN begünstigt.

Um diese Ergebnisse näher zu untersuchen und zu charakterisieren, wurde der zeitliche Verlauf der Bindung von CsA bzw. den beiden Derivaten **82** und **83** an CypA bestimmt, wobei die intrinsische Fluoreszenz des Trp¹²¹ des CypA genutzt wurde (Zhang et al., 2004). Trp¹²¹ ist das einzige Trp im hCypA und ist an der CsA-Bindung beteiligt, wobei sich dessen Mikrokonformationen ändern, was in einer Verdopplung der Fluoreszenzintensität resultiert. Während der Bindung an CsA kommt es außerdem zu einer signifikanten Veränderung in der Position von Glu¹²⁰, dessen Einfluss bzgl. der Intensitätserhöhung für die Fluoreszenz aber eher gering ist (Gastmans et al., 1999). Im CypA-CsA-Komplex liegt der Trp¹²¹-Rest nahe am MeLeu⁹ des CsA. In seiner freien Form weist CsA zwischen MeLeu⁹ und MeLeu¹⁰ eine *cis*-Peptidbindung auf, die nach Bindung an CypA eine Konformationsänderung zur *trans*-Bindung erfährt. MeLeu⁹-*trans*-MeLeu¹⁰ ist für die effiziente Bindung an die aktive Seite des CypA wesentlich - das *cis*-Konformer wird nicht erkannt und ist somit als PPlase-Inhibitor inaktiv. Die Änderung der Konformation und somit die inhibitorische Aktivität sind außerdem vom Lösungsmittel, in dem das CsA vor Zugabe in das Assay-System gelöst wird, abhängig. So führt eine Zugabe in THF oder dem Cremophor EL nur zu einer sehr geringen Inhibition von CypA, während die Zugabe in LiCl-THF oder polaren Lösungsmitteln, wie Ethanol, Methanol oder DMSO, die Isomerisierung zur *trans*-Konformation begünstigt (Kofron et al., 1992; Janowski et al., 1997). Um den möglichen Einfluss der Alkylierung an D-Ala⁸ bzw. Val⁵ zu untersuchen, wurde die zeitliche Änderung der Fluoreszenz-Emission nach Zugabe von CsA bzw. der Derivate **82** und **83** in Ethanol gemessen (**Abbildung 39**). Für die Bindung von CsA an CypA ergeben sich drei kinetische

Phasen. Die erste sehr schnelle Phase ist wohl der Bindung eines bereits in Lösung vorliegenden CypA-aktiven Isomers zuzuordnen, wohingegen die zweite etwas langsamere Phase der *cis*-zu-*trans*-Isomerisierung von MeLeu⁹-MeLeu¹⁰ entspricht. Die dritte Phase ist äußerst langsam (Zhang et al., 2004).

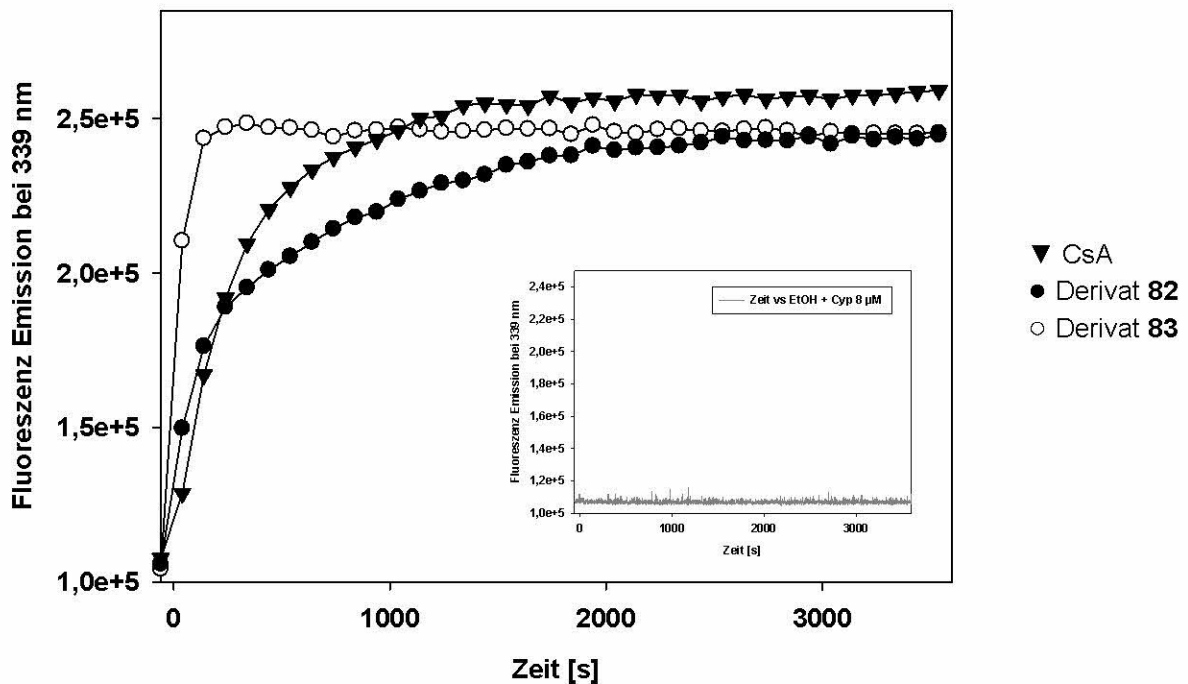


Abbildung 39: Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Zeit nach Bindung von CypA an CsA (-▼-), Verbindung **82** (-●-) und Verbindung **83** (-○-). Die intrinsische Fluoreszenz von CypA wurde bei 5 °C in 35 mM HEPES-Puffer (pH 7,8) gemessen. Die CypA-Konzentration betrug 8 µM und **1**, **82** bzw. **83** wurden zu einer finalen Konzentration von 13,2 µM zum Zeitpunkt Null zugegeben. Die Wellenlänge für die Anregung betrug 280 nm bei einer spektralen Bandbreite von 1,7 nm. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 339 nm, ebenfalls mit einer spektralen Bandbreite von 1,7 nm detektiert. Die eingefügte Abbildung zeigt die Fluoreszenz nach Zugabe von EtOH zum Zeitpunkt Null als Kontrolle.

Für Derivat **83** zeigt die Kurve einen der Kurve des CsA ähnlichen Verlauf mit drei Phasen, wobei die zweite Phase, die die *cis*-*trans*-Isomerisierung von *cis*-MeLeu⁹-MeLeu¹⁰ umfasst, etwas langsamer ist als die der CsA-Kurve. Dies ist in Übereinstimmung mit der verschlechterten PPLase-Inhibition durch das CsA-Analog **83** im Vergleich zum CsA. Bei Verbindung **83** hingegen fehlt diese zweite Phase, was darauf schließen lässt, dass im Bindungsprozess zwischen Derivat **83** und CypA keine langsame *cis*-*trans*-Isomerisierung stattfindet. Das bedeutet, dass Verbindung **83** durch die N-Alkylierung an Val⁵ entweder eine Konformation ähnlich der des aktiven CsA im CypA-CsA-Komplex annimmt oder aber durch diese Modifikation über eine sehr flexible Struktur verfügt, die sich im schnellen Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Konformationen befindet.

Die CsA-Derivate **82** und **83** sind durch ihre erheblich verschiedenen biochemischen Eigenschaften geeignet, die Rolle von CypA und CaN in verschiedenen physiologischen Prozessen zu untersuchen und können möglicherweise genutzt werden, um die Entstehung einiger der zum Teil schweren Nebenwirkungen der CsA-Therapie aufzuklären.

2.3. Testung ausgewählter CsA-Derivate in Modellsystemen für praktische Anwendungen

Testung von CsA-Derivat 19 in Modellen für chronisches und akutes Asthma

Wie durch Malešević et al. (2010) und Balsley et al. (2010) gezeigt wurde, sind allergisch hervorgerufene Entzündungsreaktionen der Lungen mit erhöhten Werten an extrazellulären Cyclophilinen verbunden, für deren gezielte Inhibition CsA-Derivate, welche außerhalb der Zelle verbleiben, einen Ansatzpunkt darstellen. Das CsA-Derivat **19** (**Abbildung 40**), welches im Vergleich zu CsA eine um rund 50% verbesserte CypA-Inhibition aufweist und nicht die Zellmembran passiert, wurde in einem Modellsystem für chronisches Asthma und in einem Modellsystem für akutes Asthma jeweils an Mäusen auf sein Potential getestet, extrazellulär sekretierte Cyclophiline zu inhibieren und durch diese hervorgerufene Entzündungsreaktionen zu minimieren.

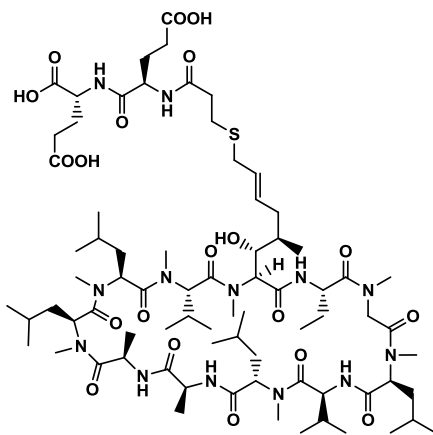
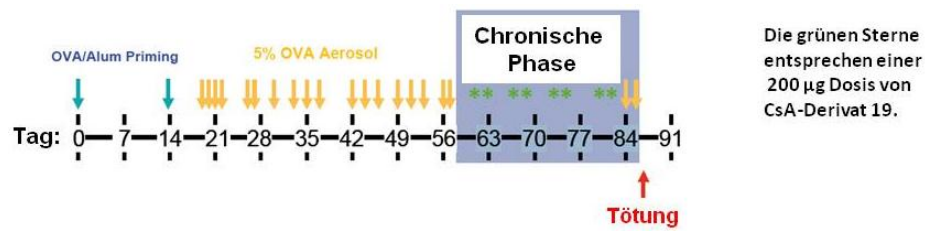


Abbildung 40: Struktur von Verbindung **19**.

Der Ablauf und die Ergebnisse für das Modell des chronischen Asthmas sind in **Abbildung 41** wiedergegeben. Die Entzündungsreaktion wird durch die Verabreichung von Ovalbumin (OVA) an Tag 0 und 14 induziert und durch die weitere Gabe von OVA als Aerosol während der dritten bis zur achten Woche aufrecht erhalten. In der chronischen Phase ab Tag 60 erfolgte die Behandlung mit dem CsA-Derivat **19**. Nach rund 12 Wochen wurden die Mäuse getötet und die Zelltypen und Anzahl in der BAL bestimmt. Die mit CsA-Analog **19** behandelten Mäuse zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine signifikante Herabsetzung in der Anzahl der entzündungsassoziierten Zellen. So konnte die Anzahl der Eosinophile um 62%, die der T-Zellen um 58% reduziert werden.



BAL Leukozyten

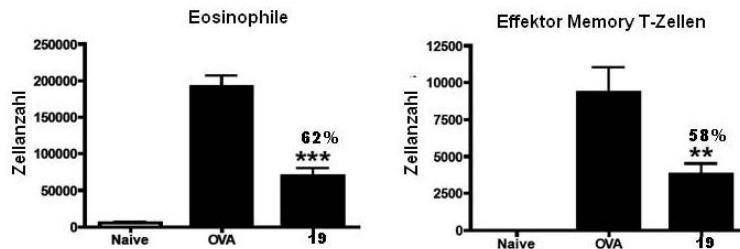


Abbildung 41: Verbindung 19 im Maus-Modell für chronisches Asthma. Nach Priming mittels Ovalbumin führt die mehrfache Gabe von Derivat 19 während der chronischen Phase zu einer deutlichen Reduktion der Eosinophile und T-Zellen in der BAL. (Durchführung und Auswertung: Dr. M.A. Balsley, Prof. Dr. S.L. Constant, Department of Microbiology, Immunology and Tropical Medicine, The George Washington University, Washington DC (USA))

Auch im Modell des akuten Asthmas zeigte Derivat 19 eine deutliche Reduktion in der Anzahl der entzündungsvermittelnden Zellen (**Abbildung 42**). Hier konnte die Zellanzahl der Eosinophilen in der BAL um 71% und im Lungengewebe um 54% herabgesetzt werden, die Anzahl der T-Zellen um 50% in der BAL bzw. 35% im Lungengewebe.

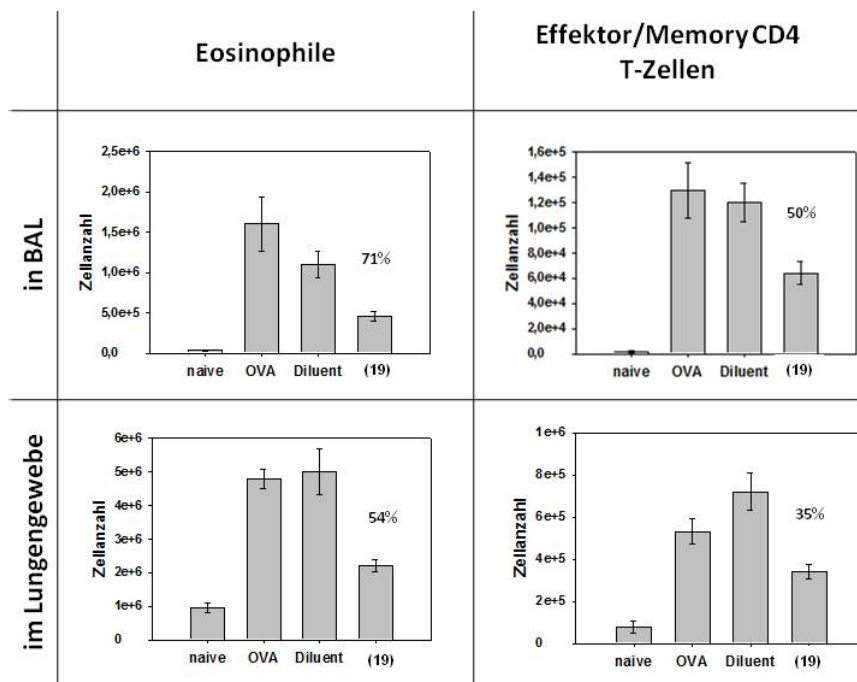


Abbildung 42: Verbindung 19 im Maus-Modell für akutes Asthma. Sowohl in der BAL als auch im Lungengewebe wird eine deutliche Herabsetzung von Eosinophilen und T-Zellen durch Gabe von Derivat 19 erreicht (200 µg Dosis; Tag 7, 9, 11). (Durchführung und Auswertung: Dr. M.A. Balsley, Prof. Dr. S.L. Constant, Department of Microbiology, Immunology and Tropical Medicine, The George Washington University, Washington DC (USA))

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich die signifikante Bedeutung, welche extrazelluläre Cyclophiline und deren Inhibition sowohl in chronischem als auch in akutem Asthma haben.

Bestimmung von extrazellulärem Cyp aus Serum mit CsA-Analog 30

Die Identifizierung von CsA-Bindungspartnern in humanem Blutserum ist wichtig, um bei der Derivatisierung von CsA selektiv wirkende Inhibitoren zu erzeugen und unerwünschte Interaktionen sowie damit verbundene Nebenwirkungen zu vermeiden.

Durch die Markierung mit dem Biotin-Rest ist Derivat **30** (**Abbildung 43A**) geeignet, um an eine Streptavidin-Agarose-Matrix gebunden zu werden. Diese Matrix wurde mit einer Lösung aus rekombinantem (rek.) CypA getestet, um ihre Funktionstüchtigkeit zu überprüfen. Nach Inkubation mit einer 0,25 µM Stammlösung von rekombinantem CypA und anschließender Elution konnte eine Akkumulation des rekombinanten CypA durch die modifizierte Matrix in der Elution gezeigt werden (**Abbildung 43B**). Ein vergleichbares Experiment wurde mit humanem Serum durchgeführt. Dabei wird die PPIase-Aktivität im Überstand nach Inkubation des Serums mit dem Matrix-gebundenem Derivat **30** im Vergleich zur unmodifizierten Kontrolle deutlich herabgesetzt (**Abbildung 44**).

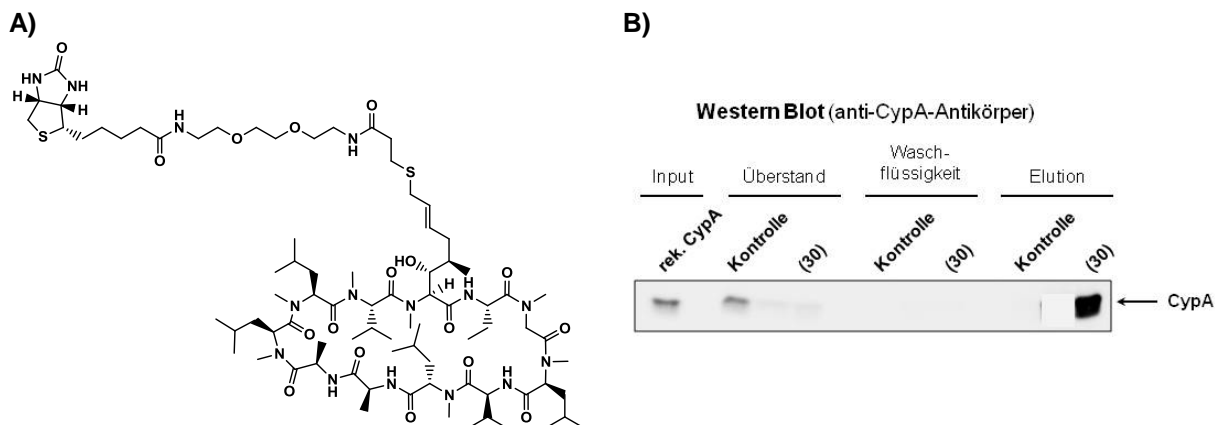


Abbildung 43: Akkumulation von CypA durch eine mit Verbindung **30** modifizierte Matrix. A) Struktur von CsA-Derivat **30**. B) Western-Blot mit anti-CypA-Antikörpern. Nach der Beladung der Streptavidin-Agarose-Matrix (Novagen) mit dem CsA-Derivat **30**, wurde die Matrix gewaschen, mit CypA inkubiert und nach erneutem Waschen mit dem Beladungspuffer (10 mM HEPES pH 7,5; 100 mM NaCl) eluiert. Die Kontrolle wurde an unbeladener Streptavidin-Agarose-Matrix durchgeführt. (Durchführung und Auswertung: M. Schumann)

Dies lässt darauf schließen, dass ein Großteil des Serum-CypA an die mit CsA-Derivat **30** modifizierte Agarose-Matrix gebunden wurde. Im Serum vorhandenes CypB konnte durch diese Matrix nicht akkumuliert werden, da dessen Konzentration im Serum zu niedrig und möglicherweise die Affinität von Verbindung **30** für CypB zu gering ist.

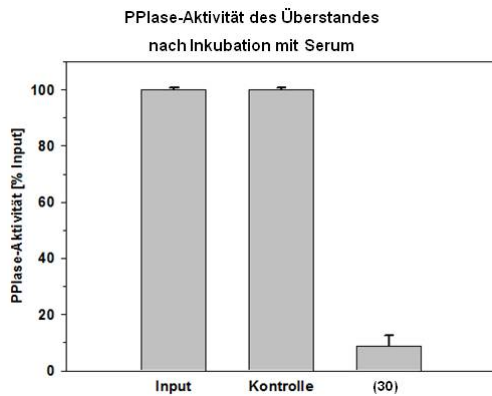


Abbildung 44: Pull-down von rekombinantem CypA aus Serum. Nach der Beladung der Streptavidin-Agarose-Matrix (Novagen) mit dem CsA-Derivat **30**, wurde die Matrix gewaschen, mit Serum inkubiert und nach erneutem Waschen mit dem Beladungspuffer (10 mM HEPES pH 7,5; 100 mM NaCl) eluiert. Die Bestimmung der PPlase-Aktivität erfolgte im protease-gekoppelten PPlase-Assay mit 10 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 6,25% (v/v) Serum, Chymotrypsin als Protease und Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA als Substrat bei 10 °C. Die Kontrolle wurde an unbeladener Streptavidin-Agarose-Matrix durchgeführt. (Durchführung und Auswertung: M. Schumann)

CsA-Derivat **30** ist daher geeignet eine Anreicherung von sowohl rekombinantem CypA als auch CypA aus Serum zu bewirken.

Testung von CsA-Derivat **39** gegen bakterielle Toxine

Cyclophiline wurden auch als Interaktionspartner für das Botulinum-Toxin und das Iota-Toxin nachgewiesen, welche zu Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes von Durchfall bis hin zur lebensbedrohlichen pseudomembranösen Colitis führen (Barth et al., 2011, Kaiser et al., 2011). Durch das Cyclophilin der Wirtszelle wird einer Komponente des bakteriellen Toxins die Verlagerung in die Zelle ermöglicht. Nicht-immunsuppressive Cyclophilin-Inhibitoren, die ebenfalls in die Zelle gelangen, könnten einen möglichen Therapieansatz für die durch diese Toxine hervorgerufenen Krankheitsbilder darstellen und dabei unerwünschte Nebenwirkungen reduzieren.

Das CsA-Analog **39** (**Abbildung 45**) ($IC_{50}(\text{CypA}) = 57 \text{ nM}$) wurde, aufgrund seiner Eigenschaft zellpermeabel und nicht-immunsuppressiv zu sein, als möglicher Inhibitor gegen das C2-Toxin von *Clostridium botulinum* (Barth et al., 2011) und das Iota-Toxin des Bakteriums *Clostridium perfringens* (Kaiser et al., 2011) getestet.

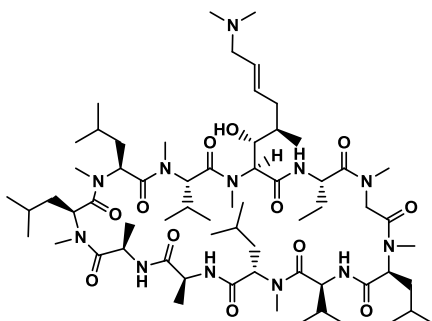


Abbildung 45: Struktur von Verbindung **39**.

Beide Toxine führen nach Vergiftung in den Zellen zu einer charakteristischen Abrundung der infizierten Zellen. **Abbildung 46** zeigt die graphische Darstellung der Anzahl der durch das C2-Toxin abgerundeten Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Behandlung mit Verbindung **39** bzw. CsA. In **Abbildung 47** sind die morphologischen Veränderungen nach Vergiftung mit C2 bzw. nach

Behandlung mit CsA und CsA-Analog **39** erkennbar. Verbindung **39** führt, wie auch CsA, zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Reduktion der Anzahl der deformierten Zellen. Das für Derivat **39** höhere Konzentration eingesetzt wurden als für CsA, ist durch dessen höheren IC_{50} -Wert bzgl. der CypA-Inhibition zu erklären. Verbindung **39** zeigt ab einer Konzentration von 50 μM eine dem CsA vergleichbare und bei 100 μM sogar eine deutlich verbesserte Herabsetzung in der Anzahl der abgerundeten Zellen. Die höchste Konzentration von 100 μM führt, wie aus **Abbildung 47** ersichtlich ist, zu keinerlei zytotoxischen Effekten. Für CsA hingegen treten ab einer Konzentration von 50 μM zytotoxische Effekte auf (Wolf et al., 1998).

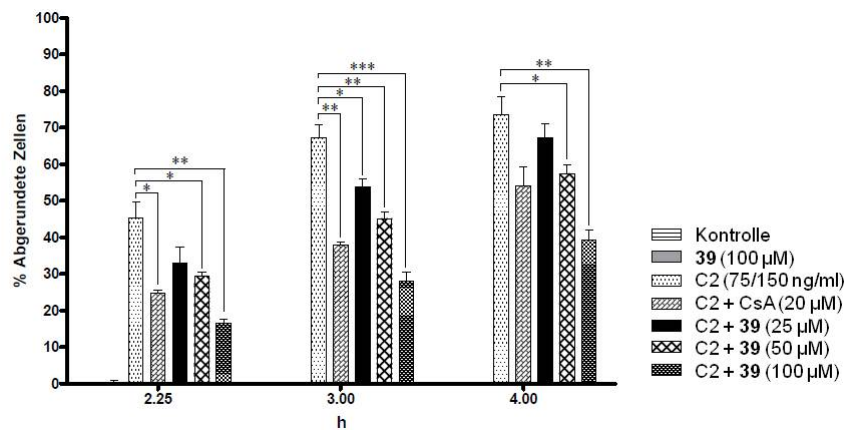


Abbildung 46: Vergiftung von Vero-Zellen mit C2-Toxin. Vero-Zellen wurden in 12-Well-Platten bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert und 30 min mit CsA bzw. Derivat **39** vorinkubiert. Nach Vergiftung mit C2-Toxin (75 ng/ml C2I + 150 ng/ml C2IIa) erfolgte die Überprüfung und Bestimmung der Anzahl der abgerundeten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten (ausgewertet wurden jeweils 3 Bildausschnitte). (Durchführung und Auswertung: AG Prof. Dr. H. Barth, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Ulm)

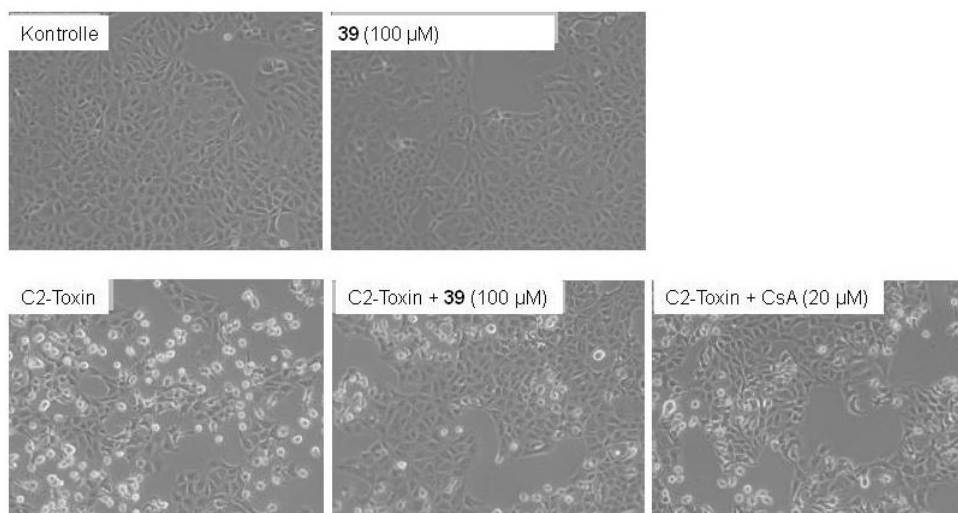


Abbildung 47: Morphologische Veränderungen nach Vergiftung von Vero-Zellen mit C2-Toxin. Vero-Zellen wurden in 12-Well-Platten bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert und 30 min mit CsA bzw. Derivat **39** vorinkubiert. Nach Vergiftung mit C2-Toxin (75 ng/ml C2I + 150 ng/ml C2IIa) erfolgte die Überprüfung der Morphologie nach 3 h. (Durchführung und Auswertung: AG Prof. Dr. H. Barth, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Ulm)

Vergleichbare Ergebnisse wurden im selben Test-System nach Vergiftung mit Iota-Toxin erzielt. **Abbildung 48** zeigt die graphische Darstellung der Anzahl durch Iota-Toxin abgerundeten Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Behandlung mit Verbindung **39** bzw. CsA.

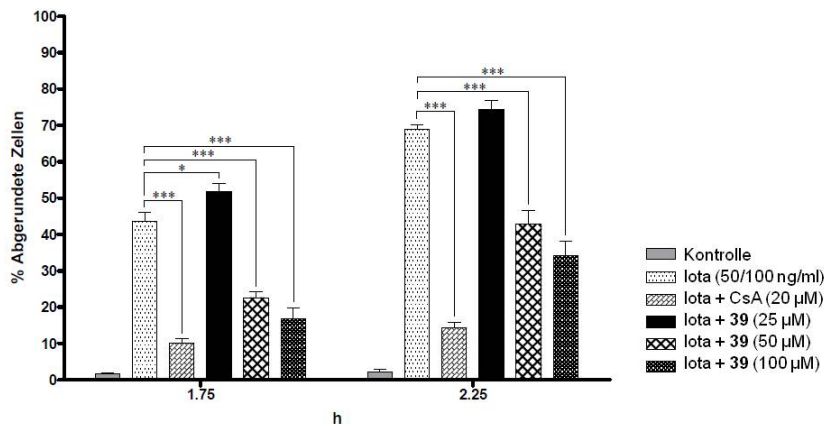


Abbildung 48: Vergiftung von Vero-Zellen mit Iota-Toxin. Vero-Zellen wurden in 12-Well-Platten bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und 30 min mit CsA bzw. Derivat **39** vorinkubiert. Nach Vergiftung mit Iota-Toxin (50 ng/ml Ia + 100 ng/ml Ib) erfolgte die Überprüfung und Bestimmung der Anzahl der abgerundeten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten (ausgewertet wurden jeweils 6 Bildausschnitte). (Durchführung und Auswertung: AG Prof. Dr. H. Barth, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Ulm)

Sowohl CsA als auch Derivat **39** zeigen eine deutliche Herabsetzung der durch das Toxin hervorgerufenen morphologischen Veränderungen. Auch hier wird von Derivat **39** eine höhere Konzentration als für CsA benötigt. Die Gabe von Derivat **39** führt ab einer Konzentration von 50 µM zum gewünschten Effekt. Das Potential von CsA und Verbindung **39** die Aufnahme des Toxins zu verhindern ist auch optisch in der Gestalt der behandelten Vero-Zellen gut zu erkennen (**Abbildung 49**).

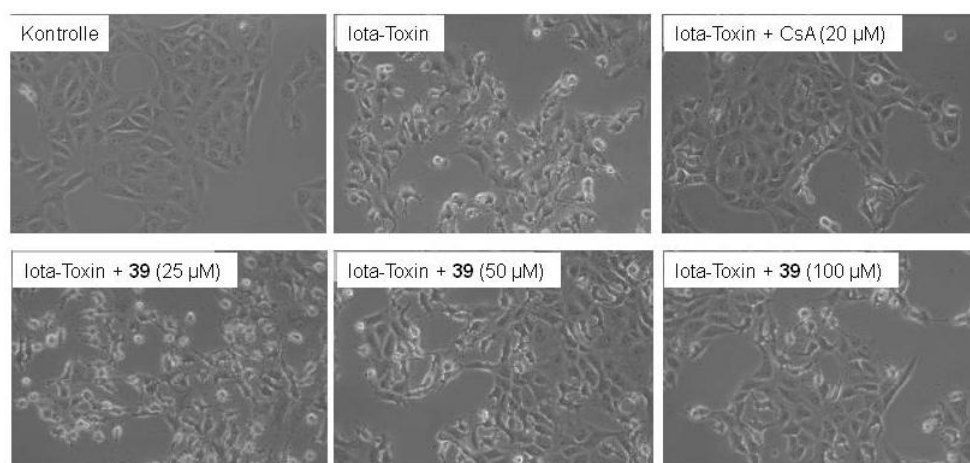


Abbildung 49: Morphologische Veränderungen nach Vergiftung von Vero-Zellen mit Iota-Toxin. Vero-Zellen wurden in 12-Well-Platten bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und 30 min mit CsA bzw. Derivat **39** vorinkubiert. Nach Vergiftung mit Iota-Toxin (50 ng/ml Ia + 100 ng/ml Ib) erfolgte die Überprüfung der Morphologie nach 2,25 h. (Durchführung und Auswertung: AG Prof. Dr. H. Barth, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Ulm)

Das CsA-Analog **39** ist somit geeignet, die zelluläre Aufnahme des C2-Toxins und des Iota-Toxins zu unterbinden und somit die betroffenen Zellen vor Gestaltsveränderungen zu bewahren.

Testung der CsA-Derivate **39** und **66** als Inhibitoren für das humane Coronavirus HCoV-229E

Coronaviren verursachen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und respiratorische Infektionen. Eine Coronavirusinfektion kann bisher nicht effektiv behandelt werden. Auf der Suche nach neuen Therapieansätzen wurden Cyclophiline als Interaktionspartner für das nicht-strukturelle Protein 1 des Coronavirus identifiziert (Pfefferle et al., 2011). Cyclophilin-Inhibitoren stellen folglich potentielle Therapiemöglichkeiten für die Bekämpfung dieser Viren dar.

Durch CsA kann die Replikation von Coronaviren, inklusive derer des humanen CoV-229E, inhibiert werden (Pfefferle et al., 2011), daher wurden das Dimethylamino-Derivat **39** und der Phosphonsäurediethylester **66** (Abbildung 50A), die in die Zellen verlagert werden, nicht immunsuppressiv sind und die Isomerase-Aktivität von CypA mit einem IC_{50} -Wert von 57 nM bzw. 9 nM inhibieren, als mögliche Inhibitoren für den humanen CoV-229E getestet. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 50B** gezeigt.

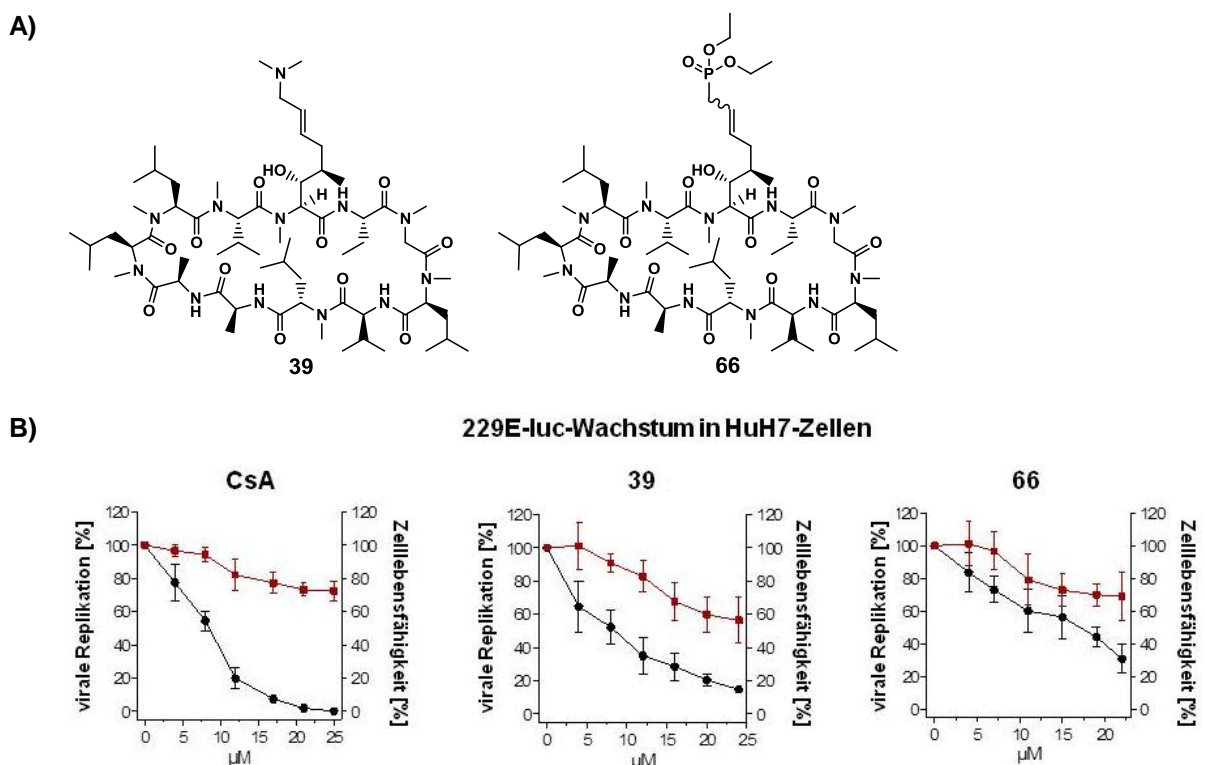


Abbildung 50: Testung der Verbindungen **39** und **66** gegen HCoV-229E. A) Strukturen der getesteten CsA-Derivate **39** und **66**. B) Effekt von CsA und den CsA-Derivaten **39** und **66** auf die hCoV-229E-luc-Replikation in HuH7-Zellen. Die linke Y-Achse (schwarze Kurve) repräsentiert die prozentuale Reduktion der Virusreplikation. Die rechte Y-Achse (rote Kurve) zeigt die prozentuale Zellviabilität (100% entspricht dabei den unbehandelten Zellen). HuH7-Zellen wurden infiziert und für zwei Tage in Anwesenheit der jeweiligen Inhibitor-Konzentrationen inkubiert. Die virale Replikation wurde durch Messung der Renilla-Luciferase-Aktivität (Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen) bestimmt. (Durchführung und Auswertung: AG Dr. A. von Brunn, Max-von-Pettenkofer Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) für die Herabsetzung der viralen Replikation beträgt sowohl für CsA als auch für Verbindung **39** $8 \mu\text{M}$. Derivat **66** besitzt diesbzgl. einen EC_{50} von $17 \mu\text{M}$. Die Zellebensfähigkeit wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen durch CsA zu 75%, durch CsA-Analog **39** zu 60% und durch Derivat **66** zu 70% reduziert (jeweils bei $24 \mu\text{M}$), was dafür spricht, dass die Virusreduktion durch die inhibitorische Wirkung bzgl. der Replikation von den CsA-Derivaten erwirkt wird und nicht durch das Absterben der Zellen. Die beiden CsA-Derivate **39** und **66** sind folglich geeignet, das Wachstum des humanen CoV-229E bei niedrigen, nicht zytotoxischen Konzentrationen in Zellkulturen zu inhibieren. Da beide Derivate nicht immunsuppressiv sind, werden unerwünschte Nebeneffekte verringert.

3 Zusammenfassung

CsA ist ein zyklisches Undecapeptid, das an CypA bindet und in der Lage ist, dessen PPlase-Aktivität zu inhibieren. Der tertiäre Komplex aus CypA-CsA-CaN führt zu einer Suppression der Immunantwort, weshalb CsA seit Jahrzehnten in der Transplantationsmedizin und zur Therapie von Autoimmunkrankheiten eingesetzt wird. Da Cyclophiline auch in einer Vielzahl anderer Erkrankungen eine Rolle spielen und bei diesen eine Immunsuppression von Nachteil ist, besteht die Notwendigkeit nach nicht-immunsuppressiven CsA-Derivaten. Einige dieser Krankheiten gehen außerdem mit erhöhten Werten an extrazellulären Cyclophilinen einher.

Ziel dieser Arbeit war daher leicht darzustellende CsA-Derivate zu synthetisieren, welche als selektive Inhibitoren fungieren können. So sollten CsA-Analoga hergestellt werden, welche nicht-immunsuppressiv wirken und außerdem die Zellmembran nicht passieren.

- Als Ausgangsposition für die Modifizierung wurde die MeBmt¹-Seitenkette gewählt. Derivatisierungen erfolgten an der allylständigen Methylgruppe durch Bromierung und anschließende Kupplung mit Thiolen oder Aminen, durch die Einführung von Heterozyklen, durch Olefin-Metathese-Reaktion an der Doppelbindung und deren Hydrierung sowie durch Verkürzung der Seitenkette über oxidative Spaltung und reduktive Aminierung.
- Die Sekundärstruktur des CsA-Moleküls wurde durch die vorgenommenen Derivatisierungen nicht verändert.
- Modifikationen mit sauren Gruppen ergaben bessere CypA-Inhibitoren als solche mit basischen Gruppen. Der Verlust der Doppelbindung durch Hydrierung beeinflusst die PPlase-Inhibition nur unwesentlich. Die Verkürzung der MeBmt¹-Seitenkette durch oxidative Spaltung und die anschließende reduktive Aminierung wirken sich hingegen nachteilig auf das PPlase-Inhibitionspotential aus.
- Alle Modifikationen führten zu einer Herabsetzung des immunsuppressiven Potentials. Der Großteil der dargestellten Verbindungen zeigt gar keine Inhibition der CaN-Phosphatase-Aktivität.
- Die Passage der Zellmembran konnte durch Derivatisierung mit geladenen Resten verhindert werden, wobei dies sowohl für Derivate mit negativ geladenen Gruppen als auch für eine Verbindung mit einer positiven Ladung zutrifft. Für die heterozyklischen Derivate wurde eine intrazelluläre Präsenz für diejenigen Verbindungen gefunden, welche über ein Stickstoffatom an das CsA-Molekül gebunden sind und dadurch nicht mehr über einen aziden Wasserstoff verfügen. Die Derivate, bei denen die Doppelbindung hydriert worden ist, sind ebenfalls intrazellulär existent. Das *cis*-Olefin führt vermutlich in den Produkten der Olefin-Metathese-Reaktion dazu, dass diese trotz Carbonsäure-Funktion in die Zellen verlagert werden.

Einige ausgewählte CsA-Derivate sollten in Kooperation an Modellsystemen für praktische Anwendungen getestet werden.

- Verbindung **19**, welche ein sehr guter nicht-immunsuppressiver PPIase-Inhibitor ist und die Zellmembran nicht passiert, wurde in Tiermodellen für chronisches und akutes Asthma getestet und zeigte eine deutliche Reduktion der für die Entzündung relevanten Zelltypen.
- Das Biotin-markierte Derivat **30** konnte erfolgreich an eine Streptavidin-Agarose-Matrix gebunden und zur Anreicherung von CypA aus Serum genutzt werden.
- Das intrazellulär präsente, nicht-immunsuppressive CsA-Derivat **39** zeigte in Zellsays Wirksamkeit gegen bakterielle Toxine.
- Die Verbindungen **39** und **66**, beide nicht-immunsuppressive Inhibitoren der CypA-PPIase-Aktivität und in der Lage die Zellmembran zu passieren, wiesen anti-virale Aktivität auf.

Neben der Synthese von an der MeBmt¹-Seitenkette modifizierten CsA-Derivaten wurde eine Alkylierung des nicht-methylierten Amidstickstoffatoms des D-Ala⁸ durchgeführt, wobei ein Nebenprodukt mit Alkylierung des Amidstickstoffes des Val⁵ erhalten wurde.

- Die am Stickstoffatom des D-Ala⁸ alkylierte CsA-Verbindung ist immunsuppressiv, aber nur ein sehr schlechter Inhibitor der PPIase-Aktivität.
- Das am Stickstoffatom des Val⁵ alkylierte Derivat weist eine starke Verringerung der Immunsuppression auf und ein leicht verschlechtertes PPIase-Inhibitionspotential.
- Die beiden Derivaten sind geeignet, die Rollen von CypA und CaN in verschiedenen physiologischen Prozessen zu untersuchen und mögliche Ursachen von Nebenwirkungen der CsA-Therapie zu erforschen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Material und Methoden

CsA (1) wurde von LC Laboratories mit einer Reinheit von > 99% erworben. Alle verwendeten Reagenzien und Chemikalien wurden aus kommerziellen Quellen im analytischen Reinheitsgrad erhalten und - sofern nicht anders vermerkt - ohne weitere Reinigung verwendet.

Software: Zur Auswertung und graphischen Darstellung der Messwerte wurden Sigmaplot 10.0 und 11.0 verwendet.

HPLC: Analyse und Reinigung der Substanzen erfolgte mit RP-HPLC (reverse phase high performance liquid chromatography) mit Säulen der Firmen Phenomex (C18 250 x 25 mm; C12 250 x 21.2 mm), Macherey-Nagel (Nucleosil C8 250 x 21 mm), dichrom (Kromasil C8 250 x 10 mm) bzw. Interchim (C18 250 x 10 mm). Für analytische Zwecke wurden Geräte der Firmen DIONEX und SYKAM verwendet, die präparativen HPLC-Läufe wurden ebenfalls an SYKAM-Geräten durchgeführt. Für die präparative HPLC wurden folgende Säulen verwendet: Merck (LiChroCART 125 x 4.0 mm), VYDAC (C18 250 x 4.6 mm) bzw. Phenomenex (Kinetex C18 50 x 4.6 mm und C8 50 x 4.6 mm).

MS: Die Bestimmung der Massen der Substanzen erfolgte mittels ESI an einem ESI-Iontrap Massenspektrometer ESQUIRE-LC von Bruker-Daltonik bzw. als MALDI an einem Ultraflex II TOF/TOF Massenspektrometer der Firma Bruker-Daltonik. Als Matrix diente dabei entweder α -Cyano-4-hydroxymethylsäure oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure.

NMR: Die NMR-Spektren wurden entweder in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ oder ACN-d_3 bei 25 °C gemessen. Die Messungen erfolgten an einem Bruker DRX 500-Spektrometer ausgestattet mit einem 5 mm Triple-Resonanz Probenkopf bei einer Protonenresonanzfrequenz von 500,13 MHz bzw. einer Frequenz von 125,76 MHz für die Messungen der ^{13}C -Spektren. Die chemischen Verschiebungen der Signale beziehen sich auf das entsprechende Lösungsmittelsignal als Referenz.

FACS: Die Flusszellanalyse erfolgte an einem Becton Dickinson FACSortTM, ausgestattet mit CellQuest Pro SoftwareTM.

4.2 Synthesevorschriften

Allgemeine Synthesevorschriften

- für die Kupplung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** mit Thiolen, Aminosäuren, Aminosulfonsäuren und Aminophosphonsäuren:

Zu einer Lösung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** (0,04 mmol; 1 Ä) und dem Thiol (0,06 mmol; 1,5 Ä) in DMF (2 ml) und ACN (3 ml) wird eine Lösung von Cs₂CO₃ (13 mg; 0,04 mmol; 1 Ä) in Wasser (2 ml) zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Methanol (3 ml) aufgenommen. Nach Zugabe von 0.2 M wässriger LiOH-Lösung (3 ml) wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN).

- für die Kupplung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** mit Aminen:

Variante 1: Zu einer Lösung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** (0,04 mmol; 1 Ä) in ACN (4,5 ml) wird das primäre Amin als Hydrochlorid (0,2 mmol; 5 Ä) und eine Lösung von Cs₂CO₃ (41 mg; 0,4 mmol; 10 Ä) in Wasser (0,6 ml) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Methanol (3 ml) gelöst. Nach Zugabe von 0.2 M wässriger LiOH-Lösung (3 ml) wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktionsmischung anschließend mit 18%iger wässriger HCl angesäuert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN).

Variante 2: CsOH·H₂O (25,5 mg; 0,125 mmol; 3 Ä) wird in trockenem DMF (1 ml) unter Ar 10 min suspendiert. Nach Zugabe des sekundären Amins als Hydrochlorid (0,08 mmol; 2 Ä) in trockenem DMF (0,5 ml) wird 30 min bei Raumtemperatur stark gerührt. Dann wird eine Lösung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** (0,04 mmol; 1 Ä) in trockenem DMF (1 ml) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in MeOH (3 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von 0.2 M wässriger LiOH-Lösung (3 ml) wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und die Lösung im Vakuum aufkonzentriert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN).

- für die Kupplung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** mit Aminen und anschließender Acetylierung:

Wie *Variante 1*, aber der Rückstand wird in DMF (10 ml) gelöst und nach der Zugabe von Ac₂O (550 µl) und DIPEA (43 µl; 0,247 mmol; 6 Ä) wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Methanol (3 ml) aufgenommen. Nach Zugabe von 0.2 M wässrige LiOH-Lösung (3 ml) wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und im Vakuum aufkonzentriert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN).

- für die Darstellung von Säureamiden mit HATU (= Amid-Variante 1):

Zu einer Lösung von der Säure (0,0115 mmol; 1 Ä) in trockenem DMF (1 ml) wird DIPEA (5,9 µl; 0,0345 mmol; 3 Ä) und HATU (4,8 mg; 0,0127 mmol; 1,1 Ä) zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird eine Lösung der Aminokomponente (0,0172 mmol; 1,5 Ä) und DIPEA (5,9 µl; 0,0345 mmol; 3 Ä) in trockenem DMF (1 ml) zugegeben und über Nacht bei

Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN).

- für die Darstellung von Säureamiden über N-Hydroxysuccinimid-Aktivester (= Amid-Variante 2):

Zu einer Lösung der Säure (0,0245 mmol; 1 Å) in Essigsäureethylester (50 ml) wird HOSu (4,2 mg; 0,0368 mmol; 1,5 Å), DIC (4,55 µl; 0,012 mmol; 1,2 Å) und DMAP (0,3 mg; 0,001 mmol; 0,1 Å) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 5%iger KHSO₄-Lösung (2 x 25 ml), gesättigter NaHCO₃-Lösung (2 x 25 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (2 x 25 ml) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden anschließend mit Essigsäureethylester (75 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet, das Trockenmittel durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zu einer Lösung des Zwischenproduktes (0,004 mmol; 1 Å) in ACN (1 ml), Wasser (0,8 ml) und gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (0,2 ml) wird die Aminokomponente (0,9 mg; 0,006 mmol; 1,5 Å) zugegeben und 3,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN).

- für die Kupplung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA 5 mit Heterozyklen:

Zu einer Lösung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA 5 (0,01 mmol; 1 Å) in THF (3,5 ml) und DMF (0,5 ml) werden K₂CO₃ (9,8 mg; 0,07 mmol; 7 Å) und das Triazol/Tetrazol/Pyrazol (0,05 mmol; 5 Å) zugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneuter Zugabe von K₂CO₃ (4,9 mg; 0,035 mmol; 3,5 Å) und 1H-1,2,3-Triazol (2,9 µl; 0,05 mmol; 5 Å) wird weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Methanol (2 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von 0,2 M wässriger LiOH-Lösung (2 ml) wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und im Vakuum aufkonzentriert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN).

- für die Olefin-Methatese-Reaktionen:

Zu einer Lösung von 1 (150 mg; 0,125 mmol; 1 Å) in DCB (7 ml) werden das Olefin (2,49 mmol; 20 Å) und HGII (7,8 mg; 0,0125 mmol; 0,1 Å) gegeben und die Reaktionsmischung wird in der Mikrowelle (200 W; in 5 min von Raumtemperatur auf 150 °C, dann 10 min bei 150 °C) erhitzt. Nach erneuter Zugabe von Katalysator (3 mg) wird wieder in der Mikrowelle (200 W; in 5 min von Raumtemperatur auf 150 °C, dann 10 min bei 150 °C) erhitzt (2 x). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN).

- für die Hydrierung der Doppelbindung:

Im Dreihalskolben mit Vakuum-, Argon- und Wasserstoffanschluss wird unter Ar-Atmosphäre Palladium auf Aktivkohle (1 mg) zu einer Lösung des Olefins (0,0038 mmol; 1 Å) in Methanol (10 ml) gegeben. Wasserstoff in die Reaktionsmischung eingeleitet und unter Wasserstoff-Atmosphäre wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wird mittels Filtration entfernt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN).

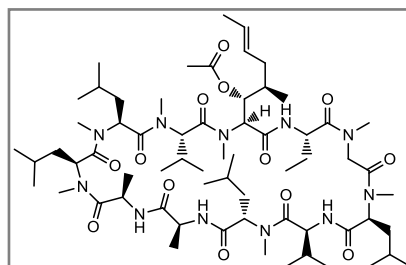
- für die reduktive Aminierung:

Zu einer Lösung von Aldehyd **75** (15 mg; 0,0122 mmol) in Methanol (5 ml) wird die Aminokomponente (0,0244 mmol) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Eine Lösung von Natriumcyanoborhydrid (1,0 mg; 0,016 mmol; 1,3 Å) in Wasser (1 ml) wird zugegeben und 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Methanol (2,5 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von 0,2 M wässriger LiOH-Lösung (2,5 ml) wird 2,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird die Reaktionsmischung mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN).

- für die reduktive Aminierung mit Acetylierung:

Zu einer Lösung von Aldehyd **75** (15 mg; 0,0122 mmol) in Methanol (5 ml) wird die Aminokomponente (0,0244 mmol) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Eine Lösung von Natriumcyanoborhydrid (1,0 mg; 0,016 mmol; 1,3 Å) in Wasser (1 ml) wird zugegeben und 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in DMF (5 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von Ac₂O (250 µl) und DIPEA (6,3 µl; 0,0365 mmol; 3 Å) wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Methanol (2,5 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von 0,2 M wässriger LiOH-Lösung (2,5 ml) wird über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Dann wird die Reaktionsmischung mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN).

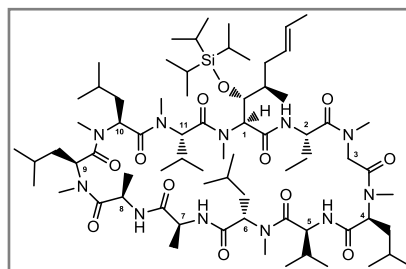
[O-Acetyl-MeBmt]¹-CsA (3): Variante 1: **1** (1 g; 0,832 mmol; 1 Å) wird zusammen mit DMAP (165,7 mg; 1,356 mmol; 1,6 Å) in Ac₂O (10 ml) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH 10/0,5) erhält man das Produkt als leicht gelblichen Feststoff (857 mg; 83%).



Variante 2: Zu einer Lösung von **1** (5 g; 4,16 mmol; 1 Å) in Ac₂O (14 ml) gibt man unter Ar-Atmosphäre DMAP (0,762 g; 6,24 mmol; 1,5 Å), wobei sofort Kristalle ausfallen, und lässt 3,5 h bei Raumtemperatur rühren. Nun kühlt man die Reaktionsmischung 2 h auf 5 °C, filtriert die Lösung und wäscht den Filterkuchen mit *n*-Hexan (auf 5 °C gekühlt). Der kristalline Filterkuchen wird in gesättigter NaHCO₃-Lösung (150 ml) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gerührt. Die ausgefallenen Kristalle werden abfiltriert und zuerst mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (auf 4 °C gekühlt) gewaschen und dann solange mit Wasser gewaschen, bis ein pH-Wert von 7 erreicht ist. Man erhält das Produkt als weißen Feststoff nach Trocknung über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei 50 °C (4,3 g; 83%).

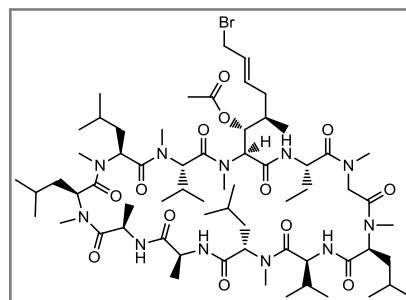
Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C8, 50 x 4,6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 7.0$ min; $M_{ber.}$ 1243,9; MALDI-TOF (m/z): 1245.0 [M+H]⁺, 1267.0 [M+Na]⁺, 1283.0 [M+K]⁺

[O-Triisopropylsilyl-MeBmt]¹-CsA (4): Zu einer Lösung von **1** (1 g; 0,83 mmol; 1 Ä) in trockenem Dichlormethan (8,3 ml) gibt man 2,6-Lutidin (0,29 ml; 2,49 mmol; 3 Ä) und Triisopropylsilyltrifluoromethansulfonat (0,45 ml; 1,664 mmol; 2 Ä) und lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester (150 ml) aufgenommen. Man extrahiert die organische Phase mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (3 x 50 ml), 10%iger wässriger Zitronensäure-Lösung (3 x 50 ml) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (3 x 50 ml). Die vereinigten wässrigen Extrakte werden mit Essigsäureethylester (100 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das Trockenmittel wird durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung weiter verwendet.



Analytische HPLC: Lösungsmittel A H₂O, Lösungsmittel B ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min+100% B in 5 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 10.2$ min; $M_{ber.} = 1358,0$; ESI (m/z): 1359.5 [M+H]⁺ und 680.2 [M+2H]²⁺

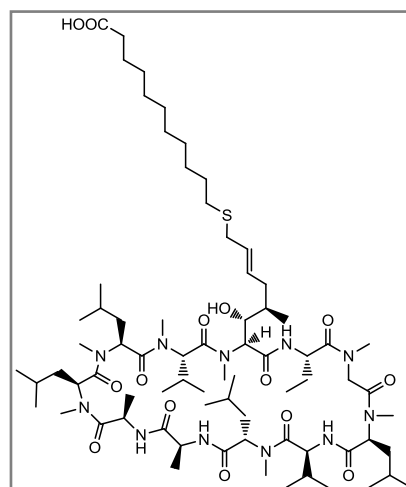
[O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA (5): [O-Acetyl-MeBmt]¹-CsA **3** (500 mg; 0,402 mmol; 1 Ä) wird mit NBS (90 mg; 0,502 mmol; 1,25 Ä) in CCl₄ (75 ml) gelöst und nach Zugabe von AIBN (10 mg) für 3 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in EtOAc (150 ml) aufgenommen und zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung (je 100 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Trockenmittel mittels Filtration entfernt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum erhält man das Rohprodukt als leicht gelblichen Feststoff. Dieses wurde ohne weitere Aufreinigung für die nachfolgenden Synthesen verwendet.



Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C8, 250 x 4.6 mm. Methode: 65 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 16.9$ min; $M_{ber.} = 1321,8$; ESI (m/z): 1323.5 [M+H]⁺

[MeBmt-S(CH₂)₁₀COOH]¹-CsA (6): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 40-90% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (18% bzgl. **3**⁷).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125 x 4.0 mm. Methode: 20 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 21.3$ min; $M_{ber.} = 1418,0$; MALDI-TOF (m/z): 1460.9 [M+H]⁺, 1482.9 [M+Na]⁺, 1498.9 [M+K]⁺

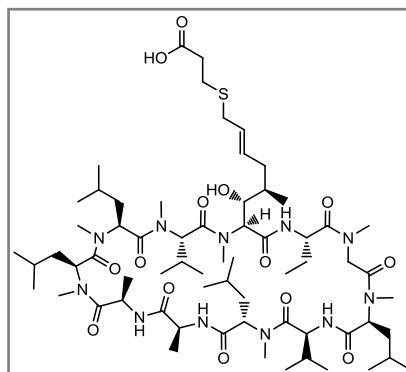


⁷ Das das [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** ohne weitere Reinigung für die Synthesen eingesetzt worden ist, sind die Ausbeute in Bezug auf das [O-Acetyl-MeBmt]¹-CsA **3**, das zu dessen Herstellung eingesetzt worden ist, angegeben.

[MeBmt-S(CH₂)₂COOH]¹-CsA (7): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 30-80% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (33% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 8.7$ min; $M_{ber.}$ 1305,8; MALDI-TOF (m/z): 1306.9 [M+H]⁺, 1328.9 [M+Na]⁺, 1344.9 [M+K]⁺

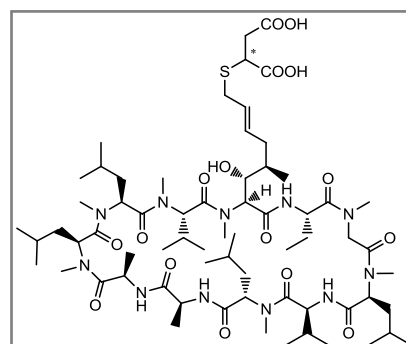
¹H-NMR, δ (MeBmt¹): 5.52, 5.51, 5.34, 3.65, 3.10, 2.71, 2.67, 2.57, 2.50, 1.62, 1.59, 0.66; ¹³C-NMR, δ (MeBmt¹): 135.5, 129.4, 77.9, 61.3, 40.2, 39.1, 37.4, 36.1, 27.3, 19.3



[MeBmt-SCH(COOH)CH₂COOH]¹-CsA (8): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 30-80% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (19% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 7.5$ min; $M_{ber.}$ 1348,8; MALDI-TOF (m/z): 1351.0 [M+H]⁺, 1373.0 [M+Na]⁺, 1389.0 [M+K]⁺

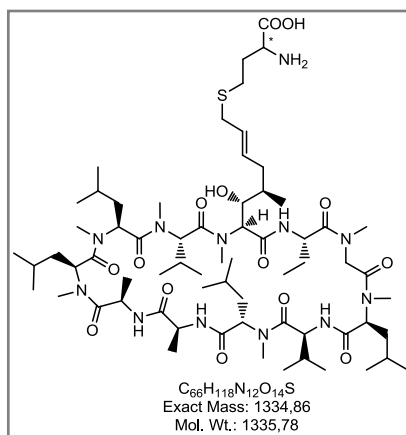
¹H-NMR, δ (MeBmt¹): 5.53, 5.39, 5.35, 3.82, 3.49, 3.16, 2.25, 2.11, 1.81, 0.82



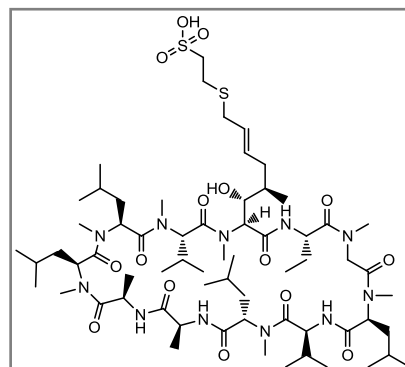
[MeBmt-S(CH₂)₂CH(NH₂)COOH]¹-CsA (9): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 30-80% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (18% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 8.2$ min; $M_{ber.}$ 1334,9; MALDI-TOF (m/z): 1336.1 [M+H]⁺, 1358.1 [M+Na]⁺, 1374.1 [M+K]⁺

¹H-NMR, δ (MeBmt¹): 5.44, 5.34, 5.34, 4.00, 3.93, 3.07, 2.60, 2.44, 2.32, 2.24, 2.04, 1.59, 0.76; ¹³C-NMR, δ (MeBmt¹): 131.7, 129.9, 75.9, 60.7, 55.4, 40.4, 37.4, 36.1, 31.0, 28.4, 18.7



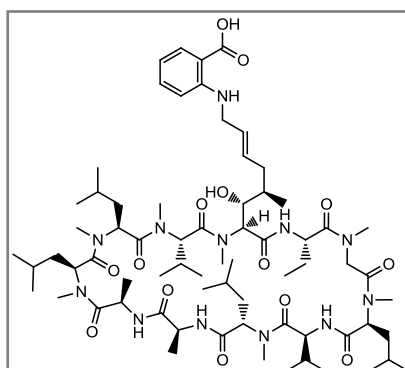
[MeBmt-S(CH₂)₂SO₃H]¹-CsA (10): Die Reinigung des Zwischenproduktes erfolgt mittels Flash-Chromatographie (Lösungsmittel A 0,1% AcOH/H₂O, Lösungsmittel B ACN, Säule RP C18, Methode: 20°C, Gradient 5 min isokratisch 0% B in 11,5 min auf 60% B dann in 2,9 min auf 100% B dann 18 min isokratisch mit 100% B). Man erhält das Zwischenprodukt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktion. Das Zwischenprodukt wird in Methanol (3 ml) aufgenommen.



Nach der Zugabe von 0,2 M wässriger LiOH-Lösung (3 ml) lässt man über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Die Lösung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und im Vakuum aufkonzentriert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 30-80% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (41% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 16.0$ min; $M_{ber.} = 1341,8$; ESI (m/z): 1342.6 [M+H]⁺

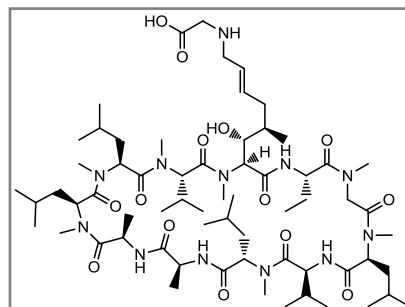
[MeBmt-2-Aminobenzoesäure]¹-CsA (11): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 30-80% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (23% bzgl. **3**).



Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 12.2$ min; $M_{ber.} = 1336,9$; MALDI-TOF (m/z): 1338.1 [M+H]⁺, 1360.1 [M+Na]⁺, 1376.1 [M+K]⁺

¹H-NMR, δ (MeBmt¹): 7.92, 7.63, 6.78, 6.65, 5.69, 5.53, 5.44, 3.77, 3.76, 2.43, 1.78, 1.63, 0.70; ¹³C-NMR, δ (MeBmt¹): 172.7, 153.1, 137.7, 135.5, 135.0, 129.9, 118.3, 115.4, 112.8, 77.1, 61.1, 48.0, 38.7, 38.1, 19.3

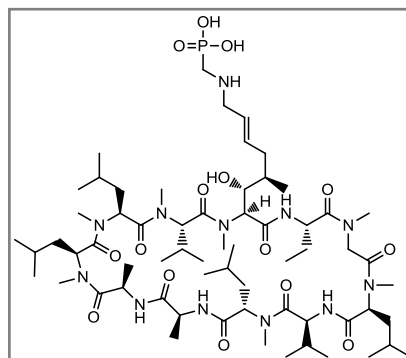
[MeBmt-Gly-OH]¹-CsA (12): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20°C, Gradient 40-90% B in 70min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (14% bzgl. **3**).



Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 250.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 5.3$ min $M_{ber.} = 1274,9$; MALDI-TOF (m/z): 1275.4 [M+H]⁺, 1297.4 [M+Na]⁺, 1313.4 [M+K]⁺

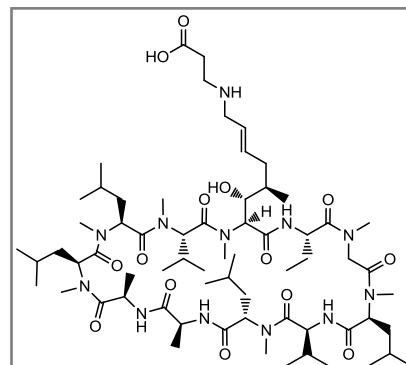
[MeBmt-NHCH₂PO₃H₂]¹-CsA (13): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 40-90% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktion (2% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 3.3$ min; $M_{ber.}$ 1310,8; MALDI-TOF (m/z): 1311.9 [M+H]⁺, 1355.9 [M+Na]⁺



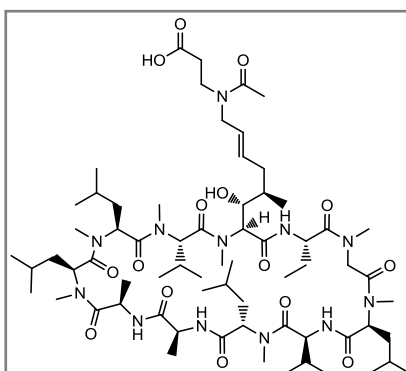
[MeBmt-β-Ala-OH]¹-CsA (14): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 50-100% B in 75 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (22% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 5.6$ min; $M_{ber.}$ 1288,9, MALDI-TOF (m/z): 1289.9 [M+H]⁺, 1311.9 [M+Na]⁺, 1327.9 [M+K]⁺

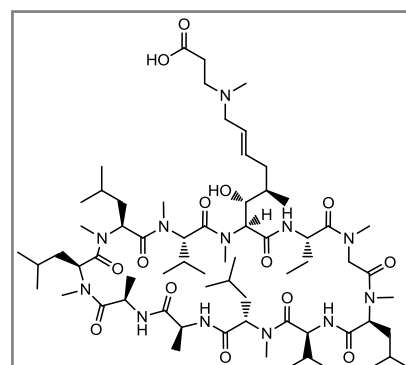


[MeBmt-β-AcAla-OH]¹-CsA (15): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 40-80% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (38% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 5.6$ min; $M_{ber.}$ 1330,9; MALDI-TOF (m/z): 1332.0 [M+H]⁺, 1354.0 [M+Na]⁺, 1370.0 [M+K]⁺



[MeBmt-β-MeAla-OH]¹-CsA (16): Zu einer Lösung von Methylamin Hydrochlorid (68 mg; 1 mmol; 1 Ä) in trockenem DMF (5 ml) gibt man Cs₂CO₃ (978 mg; 3 mmol; 3 Ä) und Benzyltriethylammoniumchlorid (683 mg; 3 mmol; 3 Ä) und lässt 30 min bei Raumtemperatur rühren. Dann tropft man 3-Bromopropionsäuremethylester (0,11 ml; 1 mmol; 1 Ä) langsam zu und lässt 5 h bei Raumtemperatur rühren. Man filtriert den festen Rückstand ab und wäscht mit Essigsäureethylester. Das Filtrat wird im Vakuum aufkonzentriert, der Rückstand in 1 N wässriger NaOH-Lösung (12 ml) aufgenommen und mit Essigsäureethylester (3 x 18 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Wasser (2 x 18 ml) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (18 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Trockenmittel wird durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Man erhält das β-MeAla-OMe als Rohprodukt als gelbes Öl (45 mg; 39%).



Zu einer Lösung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** (0,038 mmol 1 Ä) und β-MeAla-OMe (45 mg; 0,385 mmol; 10 Ä) in ACN (5 ml) und Wasser (1 ml) gibt man Cs₂CO₃ (186 mg; 0,57 mmol; 15 Ä) und lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Methanol (2 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von 0,2 M wässriger LiOH-Lösung (2 ml) lässt man 3 h bei Raumtemperatur rühren. Man säuert die Reaktionslösung mit 18%iger wässriger HCl an und konzentriert diese im Vauum auf. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 35-80% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (53% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-75% B in 5 min, Flussrate 1 ml/min. t_R = 2.6 min; M_{ber.} 1302,9; ESI (m/z): 1304.0 [M]⁺ und 652.6 [M+H]²⁺

[MeBmt-SCH₂CH₂CO-(D-Glu)₆-Gly-

OH]¹-CsA (17) (Amid-Variante 1): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 30-80% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (73%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A

0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Method: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. t_R = 16.4 min; M_{ber.} 2137,1; MALDI-TOF: 2138.2 [M+H]⁺, 2160.2 [M+Na]⁺, 2176.2 [M+K]⁺

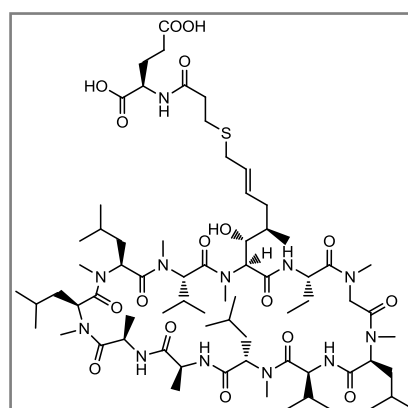
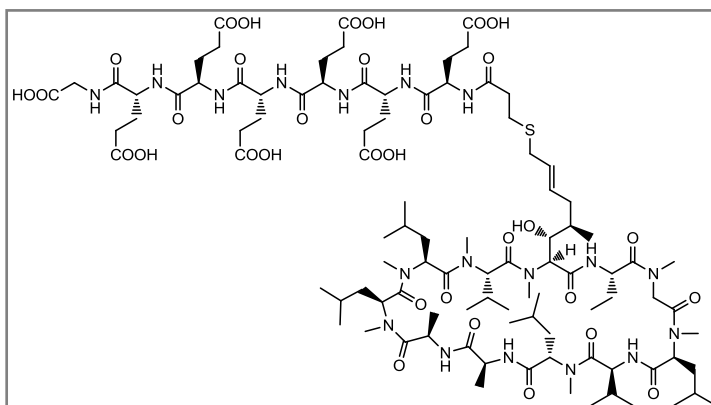
¹H-NMR, δ (MeBmt¹): 8.53, 8.42, 8.11, 5.66, 5.63, 4.96, 4.34, 4.14, 3.79, 3.23, 3.10, 2.78, 2.62, 2.40, 2.34, 2.12, 2.10, 1.97, 1.51, 0.94; ¹³C-NMR, δ (MeBmt¹): 177.5, 134.2, 130.7, 77.3, 61.8, 56.4, 46.3, 39.0, 37.8, 37.0, 36.7, 35.4, 34.1, 30.5, 28.4, 18.0

[MeBmt-SCH₂CH₂CO-D-Glu-OH]¹-CsA (18) (Amid-Variante 2):

Die Reinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 2 min isokratisch 0% B in 4 min auf 57,1% B dann 2 min isokratisch mit 57,1% B in 3 min auf 100% B dann 1 min isokratisch mit 100% B). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (5% bzgl. **6**).

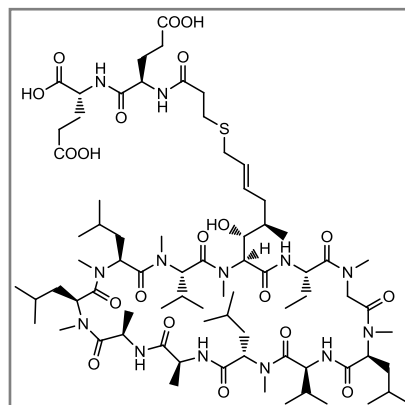
Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 250 x 4.6 mm.

Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. t_R = 6.7 min; M_{ber.} 1434,9; ESI (m/z): 1436.2 [M+H]⁺ und 718.5 [M+2H]²⁺

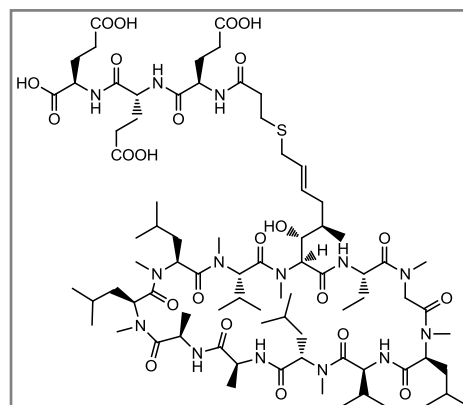


[MeBmt-SCH₂CH₂CO-(D-Glu)₂-OH]¹-CsA (19) (Amid-Variante 1; H-(D-Glu(OMe))₂-OMe als Aminokomponente): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 40-90% B in 70 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (50%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 18.2$ min; $M_{ber.} = 1563,9$; MALDI-TOF (m/z): 1565.0 [M+H]⁺, 1587.0 [M+Na]⁺, 1603.0 [M+K]⁺



[MeBmt-SCH₂CH₂CO-(D-Glu)₃-OH]¹-CsA (20): Zu einer Lösung von **7** (10 mg; 0,008 mmol; 1 Å) in DMF (2,5 ml) gibt man man DIPEA (5,23 µl; 0,0308 mmol; 4 Å) und HATU (5,8 mg; 0,0154 mmol; 2 Å) und lässt kurz bei Raumtemperatur aktivieren. Dann wird die Lösung sofort auf eine Spritze mit bereits gequollenem H-(D-Glu(OtBu))₃-Chlortrityl-Harz (160 mg trockenes Harz; 0,13 mmol) aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Harz



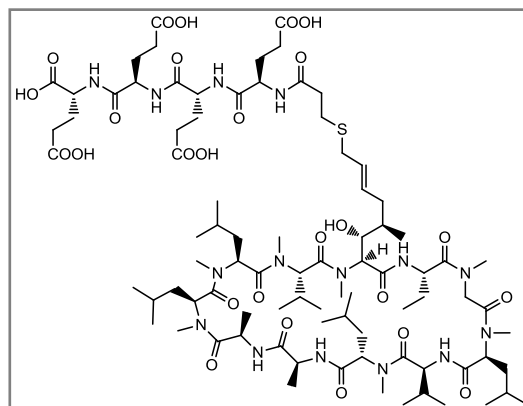
mit DMF (3 x) und entgastem Dichlormethan (3 x) gewaschen. TFA (1 ml; auf 4 °C gekühlt) wird unter Ar zum Harz gegeben und der Spritzenreaktor 1 h bei 4 °C geschüttelt. Die das Produkt enthaltende TFA-Lösung wird in ein mit Diethylether (100 ml; auf 4 °C gekühlt) befülltes Falcon filtriert. Der Falcon mit der Diethyletherlösung wird zentrifugiert (15 min bei 3200 rpm). Der Diethylether wird abdekantiert und der Rückstand in 0,2 M wässriger NaOH-Lösung (2 ml) gelöst. Die Lösung wird mit 18%iger wässriger HCl auf pH ≈ 4 angesäuert, in Methanol aufgenommen und sofort in die präparative HPLC injiziert (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 30-70% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (61%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 17.7$ min; $M_{ber.} = 1693,0$; ESI (m/z): 1694.3 [M+H]⁺ und 847.6 [M+2H]²⁺

[MeBmt-SCH₂CH₂CO-(D-Glu)₄-OH]¹-CsA (21) (Amid-Variante 1): Die Reinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie (Lösungsmittel A 0,1% AcOH/H₂O, Lösungsmittel B ACN, Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 2 min isokratisch 0% B in 6,5 min auf 100% B dann 1,5 min isokratisch mit 100% B). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (39%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O,

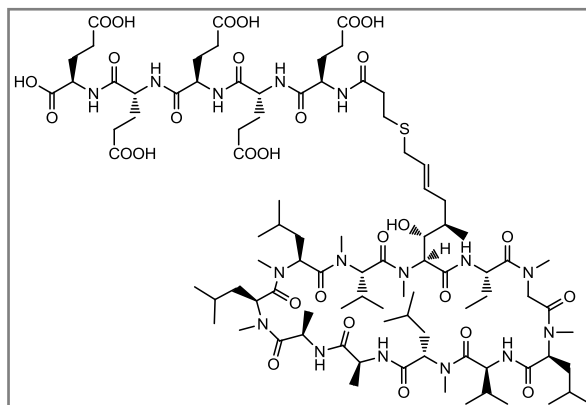
Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in



30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 17.3$ min; $M_{ber.}$ 1822,0; MALDI-TOF (m/z): 1823.1 $[M+H]^+$, 1845.1 $[M+Na]^+$, 1861.0 $[M+K]^+$

[MeBmt-SCH₂CH₂CO-(D-Glu)₅-OH]¹-CsA (22)

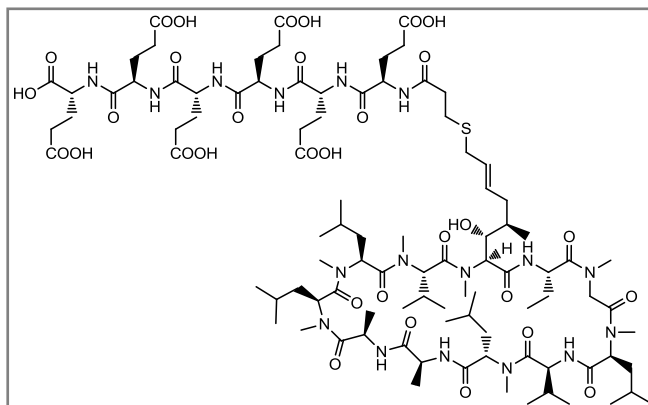
(Amid-Variante 1): Die Reinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie (Lösungsmittel A 0,1% AcOH/H₂O, Lösungsmittel B ACN, Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 2 min isokratisch 0% B in 6,5 min auf 100% B dann 1,5 min isokratisch mit 100% B. Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (46%).



Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 17.0$ min; $M_{ber.}$ 1951,1; MALDI-TOF (m/z): 1952.1 $[M+H]^+$, 1974.1 $[M+Na]^+$, 1990.0 $[M+K]^+$

[MeBmt-SCH₂CH₂CO-(D-Glu)₆-OH]¹-CsA (23)

(Amid-Variante 1): Die Reinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie (Lösungsmittel A 0,1% AcOH/H₂O, Lösungsmittel B ACN, Säule RP C18, Methode: 20°C, Gradient 2 min isokratisch 0% B in 6,5 min auf 100% B dann 1,5 min isokratisch mit 100% B). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (45%).

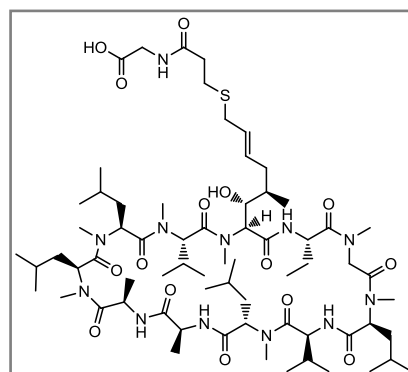


Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05%

TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Method: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 16.7$ min; $M_{ber.}$ 2080,1; MALDI-TOF (m/z): 2081.1 $[M+H]^+$, 2103.1 $[M+Na]^+$, 2119.0 $[M+K]^+$

[MeBmt-SCH₂CH₂CO-Gly-OH]¹-CsA (24)

(Amid-Variante 2): Die Reinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie (Lösungsmittel A 0,1% AcOH/H₂O, Lösungsmittel B ACN, Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 2 min isokratisch 0% B in 4,2 min auf 60,3% B dann 2,2 min isokratisch mit 60,3% B in 2,7 min auf 100% B dann 1,6 min isokratisch mit 100% B). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (21%).

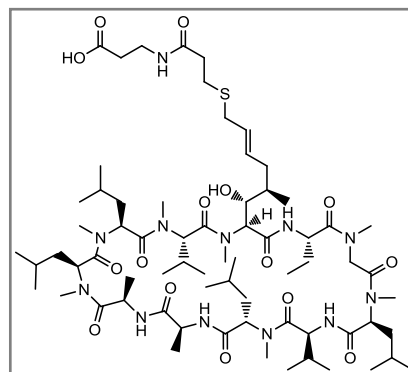


Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O,

Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 6.2$ min; $M_{ber.}$ 1362,9; ESI (m/z): 1364.0 $[M+H]^+$ und 682.4 $[M+2H]^{2+}$

[MeBmt-SCH₂CH₂CO-β-Ala-OH]¹-CsA (25) (Amid-Variante 2):

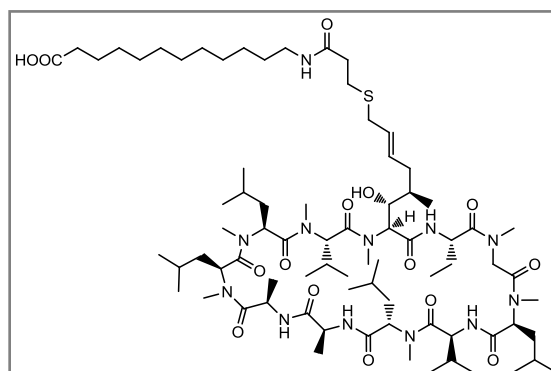
Die Reinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie (Lösungsmittel A 0,1% AcOH/H₂O, Lösungsmittel B ACN, Säule RP C18, 4,3 g. Methode: 20 °C, Flussrate 16 ml/min, Gradient 2 min isokratisch 0% B in 4,2 min auf 60,3% B dann 6,4 min isokratisch mit 60,3% B in 2,7 min auf 100% B dann 1,5 min isokratisch mit 100% B). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (24%).



Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 6.1$ min; $M_{ber.} = 1376,9$, ESI (m/z): 1377.9 [M+H]⁺ und 689.4 [M+2H]²⁺

[MeBmt-SCH₂CH₂CON-(CH₂)₁₁-COOH]¹-CsA (26)

(Amid-Variante 1): Die Reinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie (Lösungsmittel A 0,1% AcOH/H₂O, Lösungsmittel B ACN, Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 2 min isokratisch 0% B in 5,4 min auf 77,3% B dann 1,8 min isokratisch mit 77,3% B in 0,9 min auf 90,1% B dann 1,8 min isokratisch mit 99,1% B dann in 0,7 min auf 100% B dann 2,0 min isokratisch mit 100% B). Man erhält das

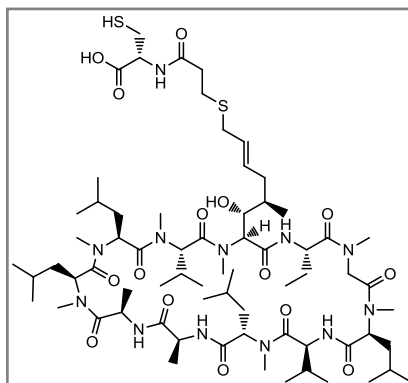


Produkt als weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (17%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 24.7$ min; $M_{ber.} = 1503,0$; MALDI-TOF (m/z): 1503.9 [M+H]⁺, 1526.0 [M+Na]⁺, 1541.9 [M+K]⁺

[MeBmt-SCH₂CH₂CO-Cys-OH]¹-CsA (27):

2-Chlorotrityl-Harz (1,3 mmol/g) (500 mg; 0,65 mmol) lässt man in einer Spritze 30 min bei Raumtemperatur quellen. Das Lösungsmittel wird durch eine Lösung von Fmoc-L-Cys(Trt)-OH (761 mg; 1,3 mmol; 2 Å) in DMF (1 ml) ersetzt. Nach Zugabe einer Lösung von DIPEA (445 µl; 2,6 mmol; 4 Å) in Dichlormethan (6 ml) lässt man über Nacht bei Raumtemperatur schütteln. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Harz mit DMF (2 x), Dichlormethan (2 x) und wieder DMF (2 x) gewaschen. Die Fmoc-Schutzgruppe wird



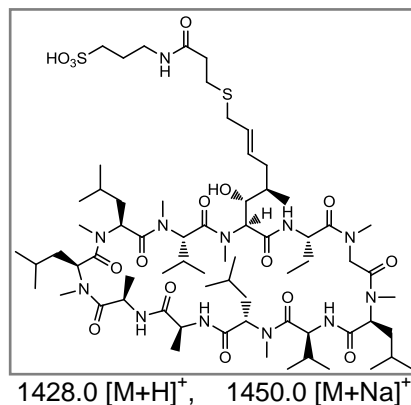
entfernt, indem das Harz mit einer Piperidin-Lösung (20%ig in DMF) bei Raumtemperatur geschüttelt wird (2 x 20 min). Das Lösungsmittel wird entfernt, das Harz mit DMF und Dichlormethan (6 x) gewaschen und 30 min im Vakuumtrockenschrank getrocknet (770 mg Harz). Das modifizierte Harz (185 mg) lässt man in einer Spritze 30 min in DMF quellen. Das Lösungsmittel wird entfernt. Eine Lösung von **6** (10 mg; 0,008 mmol; 1 Å), HATU (9,1 mg; 0,024 mmol; 3 Å) und DIPEA (4,1 µl; 0,24 mmol; 3 Å) in DMF (3 ml) lässt man 5 min bei Raumtemperatur rühren, gibt diese zum Harz und lässt 1,5 h bei Raumtemperatur schütteln. Das Lösungsmittel wird entfernt. Das Harz mit DMF (3 x)

und Dichlormethan (3 x) gewaschen und über Nacht im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Trifluoressigsäure (1 ml; gekühlt auf 4 °C) wird zum Harz gegeben und die Spritze wird 1 h bei 4 °C geschüttelt. Jeweils 0,5 ml werden in ein Zentrifugenröhrchen mit Diethylether (45 ml; gekühlt auf 4°C) filtriert. Die Röhrchen mit den Etherlösungen werden bei 4°C zentrifugiert (15 min bei 3200 U/min). Der Diethylether wird abdekantiert und mit gesättigter wässriger Na₂CO₃-Lösung neutralisiert. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase mit verdünnter HCl angesäuert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 40-90% B in 70 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (13%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 22.5$ min; $M_{ber.} = 1408,8$; MALDI-TOF (m/z): 1410.0 [M+H]⁺, 1432.0 [M+Na]⁺, 1448.0 [M+K]⁺

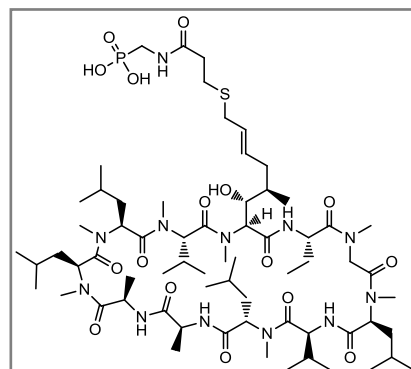
[MeBmt-SCH₂CH₂CON-(CH₂)₃-SO₃H]¹-CsA (28) (Amid-Variante 2): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 30-90% B in 70 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (6%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 16.9$ min; $M_{ber.} = 1426,9$; MALDI-TOF (m/z): 1428.0 [M+H]⁺, 1450.0 [M+Na]⁺, 1466.0 [M+K]⁺

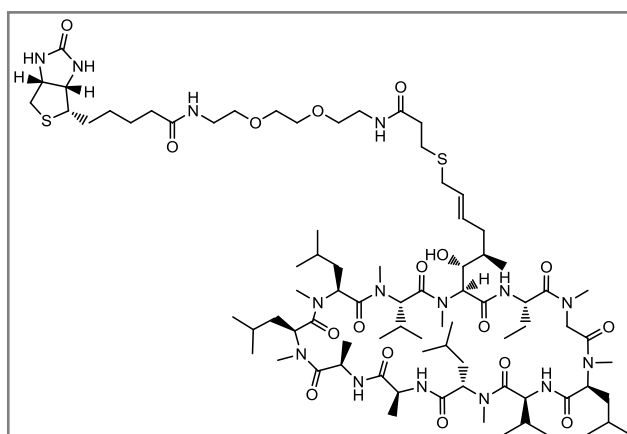


[MeBmt-SCH₂CH₂CON-CH₂-PO₃H₂]¹-CsA (29) (Amid-Variante 2): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 50-100% B in 75 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (3%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 250 x 4.6 mm. Methode: 20°C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 19.3$ min; $M_{ber.} = 1398,8$; ESI (m/z): 1400.1 [M+H]⁺ und 700.6 [M+2H]²⁺



[MeBmt-SCH₂CH₂CON-(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂NH-Biotin]¹-CsA (30): Zu einer Suspension von Biotin (69 mg; 0,2824 mmol; 1 Å) in trockenem DMF (2 ml) gibt man DIPEA (150 µl; 0,8473 mmol; 3 Å) und PyBOP (148 mg; 0,2824 mmol; 1 Å) und lässt 4 min bei Raumtemperatur rühren. Dann gibt man eine Lösung von EDO-Trt (182 mg;

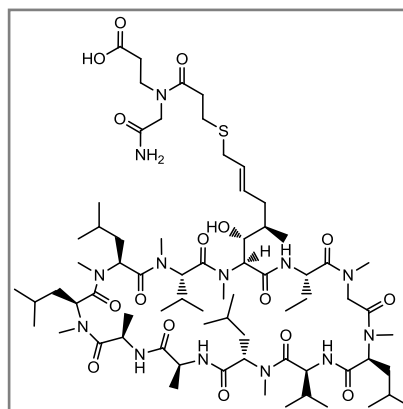


0,4661 mmol; 1,65 Å) in trockenem DMF (1 µl) zu und lässt 2 h bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Dichlormethan (2400 µl) aufgenommen. Man gibt TFA (600 µl) und Triisopropylsilan (75 µl) zu und lässt 30 min bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Wasser und DMF aufgenommen und mit Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird in die HPLC injiziert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 0-40% B in 55 min). Zu einer Lösung von **7** (10 mg; 0,008 mmol; 1 Å) in trockenem DMF (400 µl) gibt man DIPEA (4,0 µl; 0,023 mmol; 3 Å) und HATU (3,2 mg; 0,008 mmol; 1,1 Å) und lässt 5 min bei Raumtemperatur rühren. Dann gibt man eine Lösung von Biotin-EDO (4,4 mg; 0,0118 mmol; 1,65 Å) und DIPEA (4,0 µl; 0,02298 mmol; 3 Å) in trockenem DMF (400 µl) zu und lässt 3 h bei Raumtemperatur schütteln. Man fügt erneut HATU (3,2 mg; 0,0084 mmol; 1,1 Å) zu und lässt 5 min bei Raumtemperatur rühren. Anschließend gibt man noch Biotin-EDO (4,3 mg; 0,0115 mmol; 1,5 Å) und DIPEA (4,0 µl; 0,02298 mmol; 3 Å) in trockenem DMF (200 µl) zu und lässt über Nacht bei Raumtemperatur schütteln. Die Lösung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18 250 x 10 mm. Methode: 20 °C, Gradient 45-80% B in 45 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (8 mg; 63% bzgl. **6**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Method: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 2.7$ min; $M_{ber.} = 1662,0$; MALDI-TOF (m/z): 1663.3 [M+H]⁺, 1685.3 [M+Na]⁺, 1701.3 [M+K]⁺

[MeBmt-SCH₂CH₂CON-((CH₂)₂COOH)(CH₂CONH₂)]¹-CsA (31**):**

Rink amid Harz (100-200 mesh; 0,74 mmol/g, 67 mg; 0,05 mmol) lässt man im Spritzenreaktor 30 min in DMF (3 ml) bei Raumtemperatur quellen. Das Lösungsmittel wird entfernt. Die Fmoc-Schutzgruppe wird mit 20%igen Piperidin in DMF (1 x 5 min und 1 x 15 min je 4 ml) entfernt. Das Harz wird mit DMF (2 x 3 ml) gewaschen. Bromessigsäure (83 mg; 0,6 mmol; 12 Å) wird in DMF (830 µl) gelöst und aufgezogen. DIC (103 µl; 0,66 mmol; 13,2 Å) wird in DMF (107 µl) gelöst und aufgezogen.



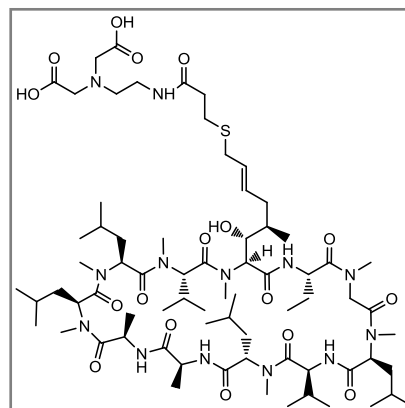
Man lässt 30 min bei Raumtemperatur schütteln. Die Lösung wird entfernt und die Kupplung wird wiederholt. Man lässt das Harz 15 min in DMSO quellen. Dann wird das Lösungsmittel entfernt und eine Lösung aus H-β-Ala-O^tBu-HCl (363,3 mg; 2,0 mmol; 40 Å) und DIPEA (10 µl; 0,058 mmol; 1,16 Å) in DMSO (1 ml) aufgezogen. Man lässt 2 h bei Raumtemperatur schütteln. Die Lösung wird entfernt und das Harz mit DMSO (2 x 3 ml) und DMF (2 x 3 ml) gewaschen. Zu einer Lösung von **6** (10 mg; 0,0077 mmol; 0,154 Å) in DMF (1 ml) werden HATU (3,2 mg; 0,0084 mmol; 0,168 Å) und DIPEA (4 µl; 0,023 mmol; 0,46 mmol) zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird die Lösung auf die Spritze gezogen und man lässt über Nacht bei Raumtemperatur schütteln. Das Harz wird mit DMF (2 x 3 ml) und Dichlormethan (2 x 3 ml) gewaschen und anschließend getrocknet. Das Harz wird nach der Zugabe von TFA (1 ml) 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wird in ein Tube gegeben und die TFA wird im Stickstoffstrom entfernt. Das Harz wird mit TFA (2 x 0,5 ml) gewaschen, wobei die Waschlösung in dasselbe Tube gegeben wird und das Lösungsmittel

ebenfalls im Stickstoffstrom entfernt wird, und mit ACN (2 x 0,5 ml) gespült. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 50-80% B in 36 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (21%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 18.8$ min; $M_{ber.}$ 1433,9; MALDI-TOF (m/z): 1434.8 [M+H]⁺, 1465.9 [M+Na]⁺, 1472.9 [M+K]⁺

[MeBmt-SCH₂CH₂CONH-(CH₂)₂-N(CH₂COOH)₂]¹-CsA (32)

(Amid-Variante 1; Aminokomponente wie folgt dargestellt): CsOH Monohydrat (212 mg; 1,264 mmol; 1 Ä) wird unter Ar 10 min bei Raumtemperatur in trockenem DMF (5,2 ml) suspendiert. Zu dieser Suspension wird *N*-Boc-Ethylendiamin (0,1 ml; 0,632 mmol; 1 Ä) gegeben und 30 min stark bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird Bromessigsäure-*tert*-Butylester (0,28 ml; 1,9 mmol; 3 Ä) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 1 N NaOH (5 ml) aufgenommen und mit Essigsäureethylester (4 x 10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 20 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Trockenmittel wird durch Filtration entfernt.



Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 30-90% B in 75 min). Das noch geschützte Zwischenprodukt wird in gekühlter TFA (2,5 ml) gelöst und 30 min im Eisbad gerührt. Die TFA wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird ohne weitere Reinigung für nachfolgende Synthesen verwendet. (*Amid-Kupplung nach Variante 1*)

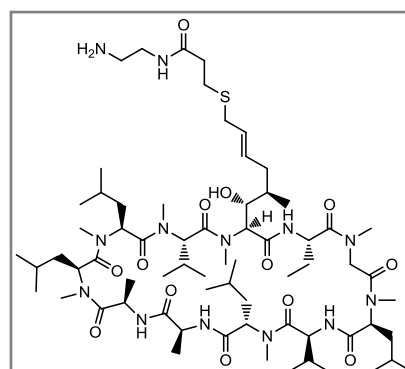
Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 40-90% B in 75 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (27%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 19.5$ min; $M_{ber.}$ 1463,9; MALDI-TOF (m/z): 1464.7 [M+H]⁺, 1486.7 [M+Na]⁺, 1502.7 [M+K]⁺

[MeBmt-SCH₂CH₂CONH-(CH₂)₂-NH₂]¹-CsA (33) (*Amid-Variante*

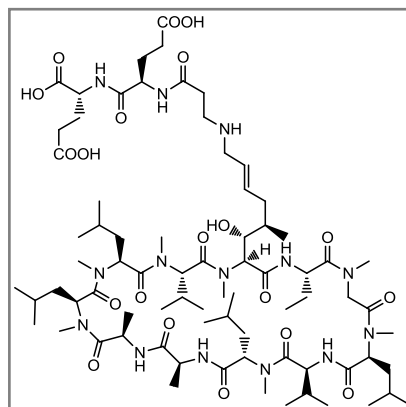
1): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 40-90% B in 70 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (28%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 20.3$ min; $M_{ber.}$ 1347,9; ESI (m/z): 1349.1 [M+H]⁺ und 675.1 [M+2H]²⁺



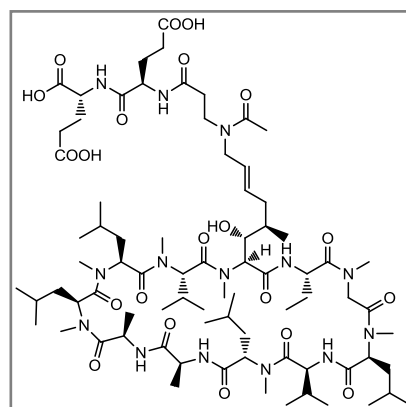
CsA-[MeBmt-NHCH₂CH₂CO-(D-Glu)₂-OH]¹ (34) (*Amid-Variante 1*, mit H-(D-Glu(OMe))₂-OMe): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 40-100% B in 90 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (1%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 5-100% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 9.4$ min; $M_{ber.} = 1547,0$; MALDI-TOF (m/z): 1548.1 [M+H]⁺, 1570.1 [M+Na]⁺, 1586.1 [M+K]⁺



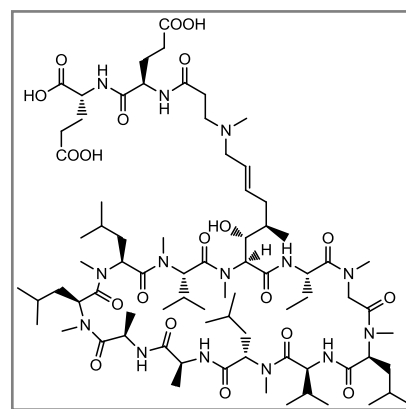
[MeBmt-N(COCH₃)CH₂CH₂CO-(D-Glu)₂-OH]¹-CsA (35): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 35-85% B in 65 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (8%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 17.5$ min; $M_{ber.} = 1589,0$; MALDI-TOF (m/z): 1590.1 [M+H]⁺, 1612.0 [M+Na]⁺, 1628.0 [M+K]⁺

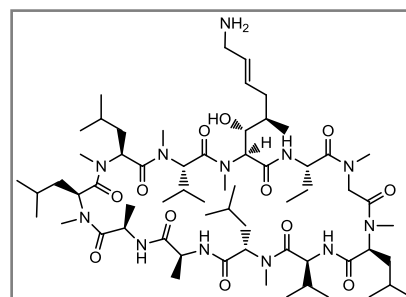


[MeBmt-N(CH₃)CH₂CH₂CO-(D-Glu)₂-OH]¹-CsA (36): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18 250 x 25 mm. Methode: 20 °C, Flussrate 17 ml/min, Gradient 35-75% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (9 mg; 15% bzgl. 3).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 5.1$ min; $M_{ber.} = 1561,0$; MALDI-TOF (m/z): 1562.2 [M+H]⁺, 1584.1 [M+Na]⁺, 1600.1 [M+K]⁺



[MeBmt-NH₂]¹-CsA (37): Zu einer Lösung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA 5 (0,036 mmol; 1 Ä) in DMF (2 ml) gibt man unter Ar-Atmosphäre Phthalimid-Kalium (7,2 mg; 0,039 mmol; 1,07 Ä) und lässt 4 h bei Raumtemperatur rühren. Man gibt erneut Phthalimid-Kalium (7,2 mg; 0,0389 mmol; 1,07 Ä) zu und lässt weitere 30 min bei Raumtemperatur rühren. Nach Zugabe von Chloroform (5 ml) wird die Reaktionsmischung in Wasser (10 ml)



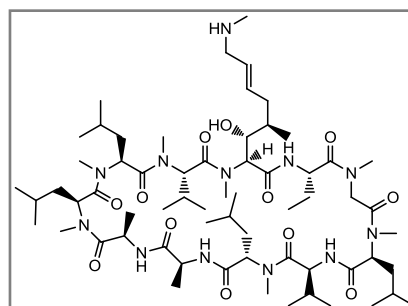
gegossen. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird mit Chloroform (2 x 5 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit 0.2 M NaOH-Lösung (10 ml) und Wasser (10 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Trockenmittel wird durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Methanol (2 ml) aufgenommen und

nach Zugabe von Hydrazin-Monohydrat (1,8 µl; 0,0364 mmol; 1 Ä) 1 h unter Rückfluss gekocht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Methanol (2 ml) aufgenommen. Nach Zugabe von 0.2 M LiOH-Lösung lässt man 3 h bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionslösung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC. (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 40-95% B in 75 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (30% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 7.4$ min; $M_{ber.}$ 1216,9; MALDI-TOF (m/z): 1217.9 [M+H]⁺, 1239.9 [M+Na]⁺, 1255.8 [M+K]⁺

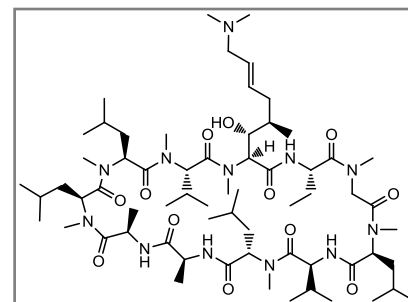
[MeBmt-NHCH₃]¹-CsA (38) (Variante 1): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 30-80% B in 70 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (5% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 9.4$ min; $M_{ber.}$ 1230,9; MALDI-TOF (m/z): 1231.8 [M+H]⁺, 1253.8 [M+Na]⁺, 1269.7 [M+K]⁺

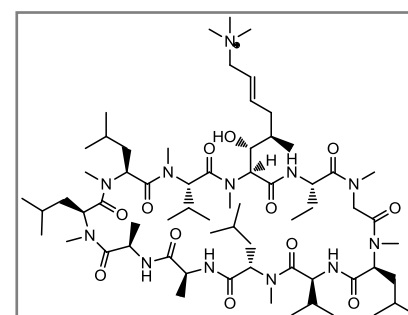


[MeBmt-N(CH₃)₂]¹-CsA (39) (Variante 1): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 30-80% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (39% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 8.3$ min; $M_{ber.}$ 1244,9; MALDI-TOF (m/z): 1245.9 [M+H]⁺, 1267.9 [M+Na]⁺, 1283.8 [M+K]⁺

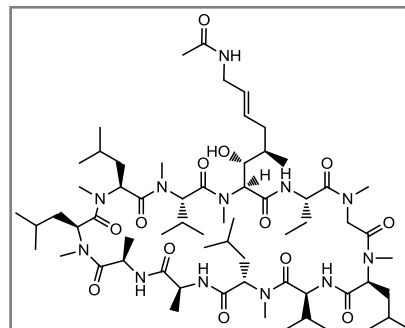


[MeBmt-N(CH₃)₃]¹-CsA (40) (Variante 2): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 40-60% B in 30 min). Man erhält das Zwischenprodukt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (38%). Zu einer Lösung des Zwischenproduktes (10 mg, 0,008 mmol; 1 Ä) in Aceton (4 ml) gibt man Benzyltriethylammoniumchlorid (0,9 mg; 0,004 mmol; 0,5 Ä), Methyljodid (1 µl; 0,016 mmol; 2 Ä) und K₂CO₃ (2,2 mg; 0,016 mmol; 2 Ä) und lässt 3 Tage bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in THF (1,5 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von 0.2 M wässriger LiOH-Lösung (1,5 ml) lässt man 2 h bei Raumtemperatur rühren. Dann wird die Reaktionsmischung mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und im Vakuum aufkonzentriert. Die Reinigung erfolgt mittels



präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 40-80% B in 50 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen als TFA-Salz (48%). Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 8.8$ min; $M_{ber.}$ 1259,9, MALDI-TOF (m/z): 1259.9 [M]⁺

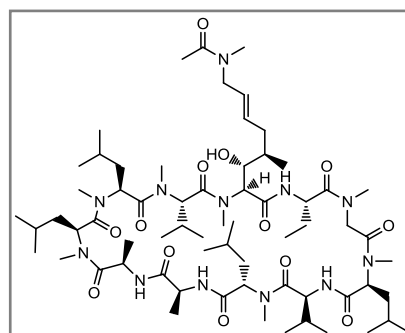
[MeBmt-NH(COCH₃)¹-CsA (41) (Variante 1): Die Reinigung des Zwischenproduktes erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 40-90% B in 60 min). Man erhält das Zwischenprodukt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (38% bzgl. **3**). Zu einer Lösung des Zwischenproduktes (5 mg; 0,0038 mmol; 1 Å) in Methanol (1 ml) gibt man 0.2 M wässrige LiOH-Lösung



(1 ml) und lässt 2 h bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionslösung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18 250 x 10 mm. Methode: 40 °C, Gradient 45-80% B in 42 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (47%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40°C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 3.8$ min; $M_{ber.}$ 1258,9; MALDI-TOF (m/z): 1260.2 [M+H]⁺, 1282.3 [M+Na]⁺, 1298.3 [M+K]⁺

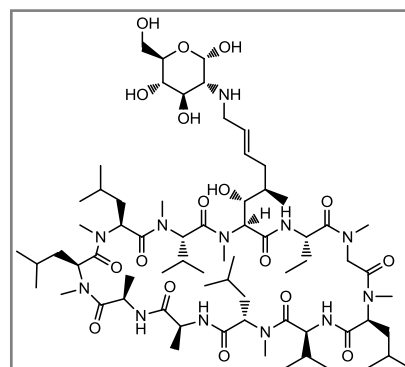
[MeBmt-N(COCH₃)CH₃¹-CsA (42) (Variante 1): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 50-70% B in 40 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (39% bzgl. **3**).



Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 17.7$ min; $M_{ber.}$ 1272,9; MALDI-TOF (m/z): 1274.0 [M+H]⁺, 1296.0 [M+Na]⁺, 1311.9 [M+K]⁺

1274.0 [M+H]⁺, 1296.0 [M+Na]⁺,

[MeBmt-NH-D-Glucosyl]¹-CsA (43) (Variante 2): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 40-80% B in 70 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (2% bzgl. **3**).

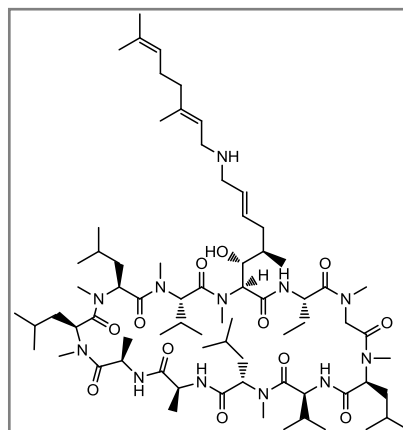


Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 5-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 18.2$ min; $M_{ber.}$ 1378,9; MALDI-TOF (m/z): 1379.9 [M+H]⁺, 1401.9 [M+Na]⁺, 1417.9 [M+K]⁺

1379.9 [M+H]⁺, 1401.9 [M+Na]⁺,

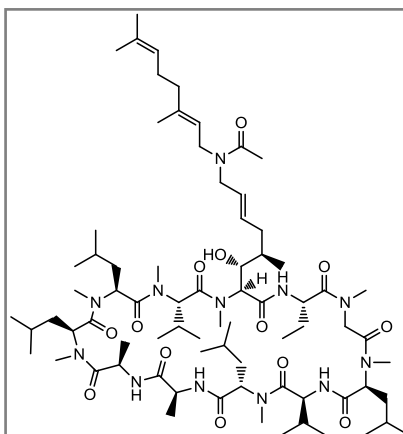
[MeBmt-NH-Geranyl]¹-CsA (44) (Variante 1): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 50-80% B in 36 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (34% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 5.3$ min; $M_{ber.} = 1353,0$; MALDI-TOF (m/z): 1354.1 [M+H]⁺, 1376.1 [M+Na]⁺, 1392.1 [M+K]⁺

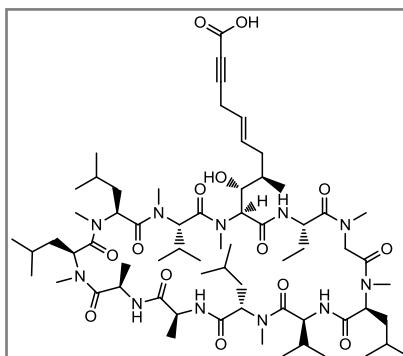


[MeBmt-N(COCH₃)-Geranyl]¹-CsA (45): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 60-90% B in 36 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (25%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 8.1$ min; $M_{ber.} = 1395,0$; MALDI-TOF (m/z): 1396.3 [M+H]⁺, 1418.3 [M+Na]⁺, 1434.3 [M+K]⁺



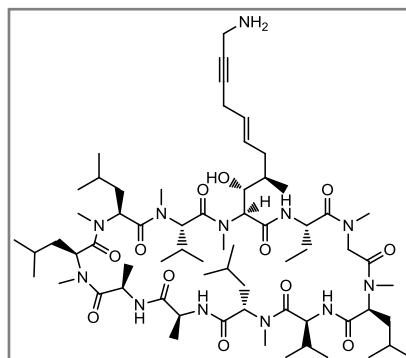
[MeBmt-C≡CCOOH]¹-CsA (46): Zu einer Lösung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** (0,005 mmol; 1 Å) ACN (4 ml) werden K₂CO₃ (1,4 mg; 0,01 mmol; 2 Å), Natriumiodid (0,8 mg; 0,005 mmol; 1 Å), TBAI (1,8 mg; 0,005 mmol; 1 Å), CuCl (0,5 mg; 0,005 mmol; 1 Å) und Propionsäuremethylester (0,9 µl; 0,01 mmol; 2 Å) gegeben und unter Ar-Atmosphäre 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Methanol (1 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe



von 0.2 M wässriger LiOH-Lösung (1 ml) wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 40-80% B in 50 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (24% bzgl. **3**).

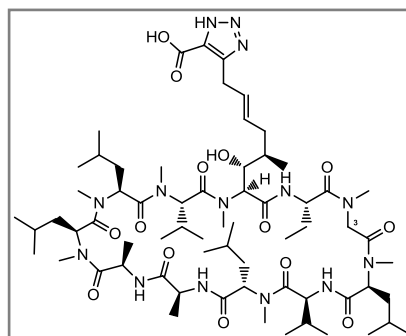
Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 4.3$ min; $M_{ber.} = 1269,8$; MALDI-TOF (m/z): 1271.1 [M+H]⁺, 1293.1.0 [M+Na]⁺, 1309.1 [M+K]⁺

[MeBmt-C≡CCH₂NH₂]¹-CsA (47): Zu einer Lösung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** (0,005 mmol; 1 Å) ACN (4 ml) werden K₂CO₃ (1,4 mg; 0,01 mmol; 2 Å), Natriumiodid (0,8 mg; 0,005 mmol; 1 Å), TBAI (1,8 mg; 0,005 mmol; 1 Å), CuCl (0,5 mg; 0,005 mmol; 1 Å) und Propargylamin (0,7 µl; 0,01 mmol; 2 Å) zugegeben und lunter Ar-Atmosphäre 26 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 40 °C, Gradient 35-70% B in 45 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (13%).



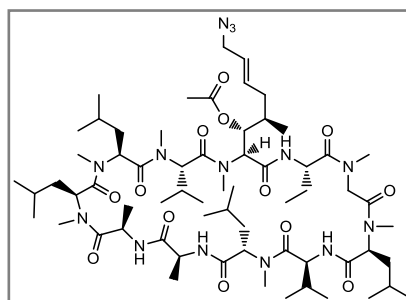
Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. t_R = 2,5 min; M_{ber.} 1254,9; MALDI-TOF (m/z): 1255.9 [M+H]⁺, 1277.9 [M+Na]⁺, 1293.9 [M+K]⁺

[MeBmt-4-(1,2,3-triazol-5-COOH)]¹-CsA (48): Zu einer Lösung von **46** (0,005 mmol; 1 Å) in DMSO (1000 µl) werden man NaN₃ (1,6 mg; 0,025 mmol; 5 Å) und NH₄Cl (0,5 mg; 0,01 mmol; 2 Å) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von Methanol (0,5 ml) und 0.2 M wässrige LiOH (1,5 ml) wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 35-75% B in 50 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (31% bzgl. **3**).



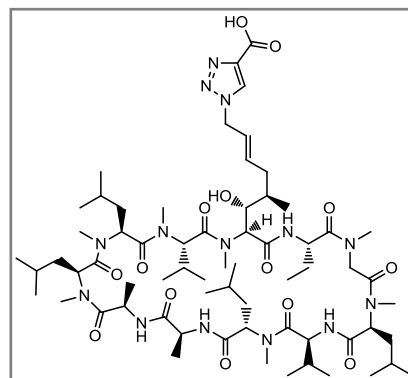
Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. t_R = 2.3 min; M_{ber.} 1312,9; ESI (m/z): 1313.5 [M+H]⁺ und 657.4 [M+2H]²⁺

[O-Acetyl-MeBmt-N₃]¹-CsA (49): Zu einer Lösung von [O-Acetyl-MeBmt-Br]¹-CsA **5** (0,1 mmol; 1 Å) in THF (16,6 ml), DMSO (1,33 ml) und Wasser (1,33 ml) wird NaN₃ (12,0 mg; 0,185 mmol; 1,85 Å) gegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Wasser (34 ml) wird zugegeben und die Lösung wird mit Essigsäureethylester (4 x 34 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (3 x 28 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Trockenmittel wird mittels Filtration entfernt und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt (Rohprodukt: 87% bzgl. **3**).



Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. t_R = 6.9 min; M_{ber.} 1284,9; ESI (m/z): 1286.4 [M+H]⁺ und 643.7 [M+2H]²⁺

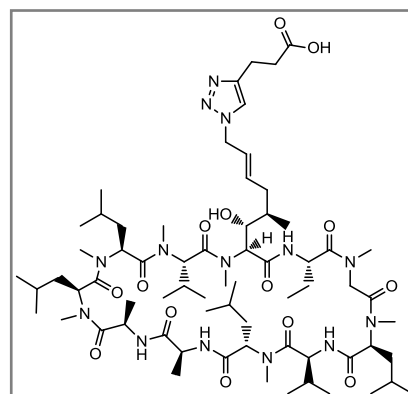
[MeBmt-1-(1,2,3-triazol-4-COOH)]¹-CsA (50): Zu einer Lösung von **30** (0,001 mmol; 1 Å) *tert*-Butanol (1 ml) und Wasser (1 ml) werden Natriumascorbat (1 µl einer 0,1 M Lösung in H₂O; 0,00001 mmol; 0,01 Å), CuSO₄·5 H₂O (1 µl einer 0,1 M Lösung in H₂O; 0,00001 mmol; 0,01 Å) und Propiolsäuremethylester (0,5 µl; 0,006 mmol; 6 Å) gegeben und 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird CuCl (1 mg) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Methanol (1 ml) aufgenommen.



Nach der Zugabe von 0,2 M wässrigen LiOH-Lösung (1 ml) wird 4,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 35-85% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (31% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 2.35$ min; $M_{ber.}$ 1312,9; ESI (m/z): 1314.5 [M+H]⁺ und 657.5 [M+2H]²⁺

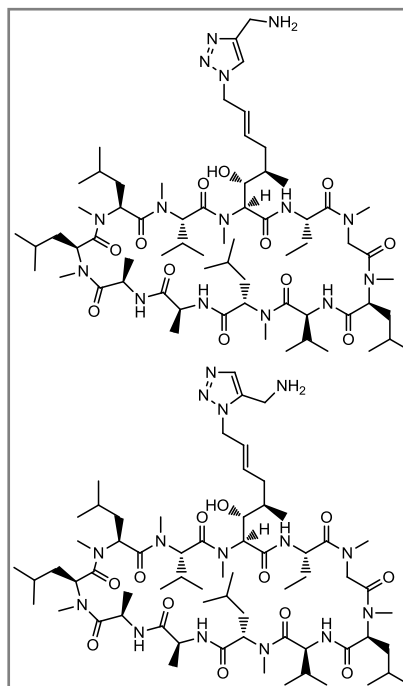
[MeBmt-1-(1,2,3-triazol-4-(CH₂)₂COOH)]¹-CsA (51): Zu einer Lösung von **50** (0,005 mmol; 1 Å) in *tert*-Butanol (1 ml) und Wasser (1 ml) werden CuCl (0,5 mg; 0,005 mmol; 1 Å) und 4-Pentinsäure (2,5 mg; 0,025 mmol; 5 Å) zugegeben und 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneuter Zugabe von CuCl (1,0 mg; 0,01 mmol; 2 Å) und 4-Pentinsäure (5 mg; 0,1 mmol; 20 Å) wird weitere 3 Tage bei Raumtempartur gerührt. Nach weiterer Zugabe von 4-Pentinsäure (5 mg; 0,1 mmol; 20 Å) und Kupfer(I)chlorid (1,0 mg; 0,01 mmol; 2 Å) wird 6 Tage bei



Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Methanol (1,5 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von 0,2 M wässrige LiOH-Lösung (1,5 ml) wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und im Vakuum aufkonzentriert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 40-75% B in 45 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (8% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 3.2$ min; $M_{ber.}$ 1340,9; ESI (m/z): 1341.7 [M+H]⁺

[MeBmt-1-(1,2,3-triazol-4-CH₂NH₂)]¹-CsA (52**) und [MeBmt-1-(1,2,3-triazol-5-CH₂NH₂)]¹-CsA (**53**):** Zu einer Lösung von **49** (0,015 mmol; 1 Å) in *tert*-Butanol (3 ml) und Wasser (3 ml) werden CuCl (3,7 mg; 0,037 mmol; 2,5 Å) und Propargylamin (9,6 µl; 0,15 mmol; 10 Å) gegeben und 26,5h bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneuter Zugabe von CuCl (3,7 mg; 0,037 mmol; 2,5 Å) und Propargylamin (9,6 µl; 0,15 mmol; 10 Å) wird 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Methanol (2 ml) aufgenommen. Nach Zugabe von 0.2 M wässrige LiOH-Lösung (2 ml) wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 40 °C, Gradient 45-80% B in 42 min). Man erhält die Produkte als weiße Feststoffe nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen, **52** (8% bzgl. **3**) und **53** (5% bzgl. **3**).

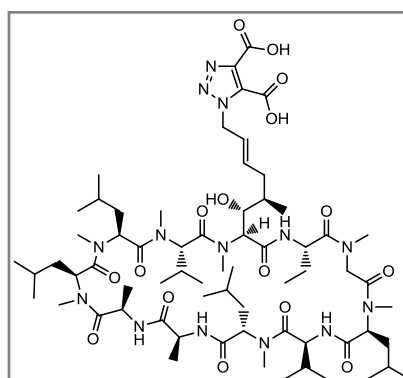


Analytische HPLC **52**: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 5-100% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 8.9$ min; $M_{ber.}$ 1297,9; MALDI-TOF: 1299.1 [M+H]⁺, 1321.1 [M+Na]⁺, 1337.0 [M+K]⁺

¹H-NMR, δ (MeBmt¹): 7.82, 5.90, 5.58, 5.23, 4.94, 4.86, 4.24, 3.87, 2.20, 1.98, 1.65, 0.77; ¹³C-NMR, δ (MeBmt¹): 137.8, 125.2, 124.4, 73.2, 58.9, 52.8, 35.8, 34.9, 34.4, 21.2

Analytische HPLC **53**: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 5-100% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 10.6$ min; $M_{ber.}$ 1297,9; MALDI-TOF (m/z): 1299.1 [M+H]⁺, 1321.1 [M+Na]⁺, 1337.0 [M+K]⁺

[MeBmt-1-(1,2,3-triazol-4,5-dicarbonsäure)]¹-CsA (54**):** Zu einer Lösung von **50** (0,005 mmol; 1 Å) in trockenem DMF (1 ml) gibt man NH₄Cl (0,5 mg; 0,01 mmol; 2 Å) und Acetylendicarbonsäuredimethylester (3,1 µl; 0,025 mmol; 5 Å) und lässt 22 h bei Raumtemperatur rühren. Man fügt erneut Acetylendicarbonsäuredimethylester (6,2 µl; 0,05 mmol; 10 Å) zu und lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Man fügt noch Acetylendicarbonsäuredimethylester (6,2 µl; 0,05 mmol; 10 Å) zu und lässt 2 Tage bei Raumtemperatur rühren. Das Lösungsmittel



wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Zwischenproduktes erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 50-90% B in 50 min). Man erhält das Zwischenprodukt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (56% bzgl. **3**). Zu einer Lösung des Zwischenproduktes (4 mg; 0,0028 mmol; 1 Å) in Methanol (1 ml) gibt man 0.2 M wässrige LiOH-Lösung (1 ml) und lässt 2 h bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionsmischung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 30-65% B in

45 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (43% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 40 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 2.0$ min; $M_{ber.}$ 1356,8; ESI (m/z): 1357.8 [M+H]⁺

[MeBmt-1-(1,2,3-triazol)]¹-CsA (55) und **[MeBmt-2-(1,2,3-triazol)]¹-CsA (56)**: Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 45-85% B in 48 min). Man erhält die beiden Produkte als weiße Feststoffe nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen, **56** (36% bzgl. **3**) und **57** (8% bzgl. **3**).

Analytische HPLC **55**: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 4.1$ min; $M_{ber.}$ 1268,9; MALDI-TOF (m/z): 1269.7 [M+H]⁺, 1291.7 [M+Na]⁺, 1307.6 [M+K]⁺

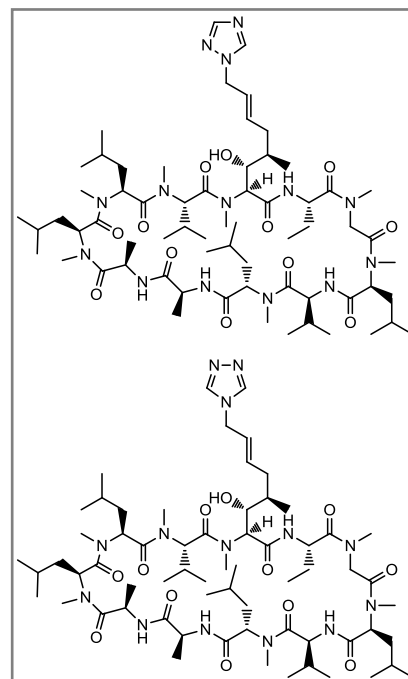
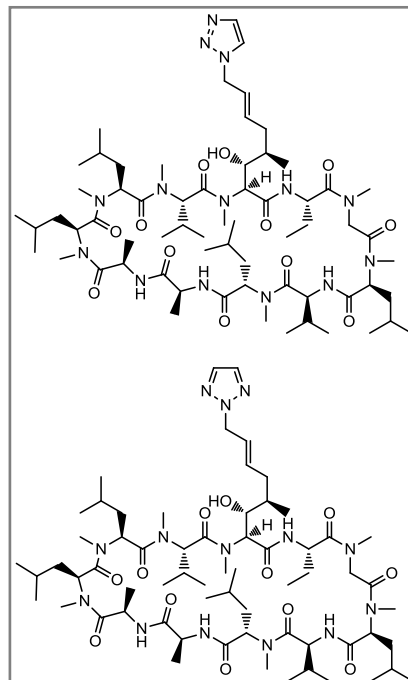
¹H-NMR, δ (MeBmt¹): 7.78, 7.63, 5.75, 5.55, 5.30, 4.92, 4.84, 3.86, 2.25, 1.84, 1.70, 0.78; ¹³C-NMR, δ (MeBmt¹): 136.8, 134.1, 125.6, 124.5, 73.8, 59.2, 52.4, 35.2, 34.9, 21.1

Analytische HPLC **56**: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 5.0$ min; $M_{ber.}$ 1268,9; MALDI-TOF (m/z): 1269.8 [M+H]⁺, 1291.8 [M+Na]⁺, 1307.8 [M+K]⁺

[MeBmt-1-(1,2,4-triazol)]¹-CsA (57) und **[MeBmt-4-(1,2,4-triazol)]¹-CsA (58)**: Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 45-85% B in 48 min). Man erhält die beiden Produkte als weiße Feststoffe nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen, **58** (38% bzgl. **3**) und **59** (6% bzgl. **3**).

Analytische HPLC **57**: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-75% B in 5 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 3.8$ min; $M_{ber.}$ 1268,9; MALDI-TOF (m/z): 1269.9 [M+H]⁺, 1291.9 [M+Na]⁺, 1307.9 [M+K]⁺

Analytische HPLC **58**: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-75% B in 5 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 3.1$ min; $M_{ber.}$ 1268,9; MALDI-TOF (m/z): 1291.9 [M+Na]⁺, 1307.8 [M+K]⁺



[MeBmt-1-tetrazol]¹-CsA (59) und [MeBmt-2-tetrazol]¹-CsA (60): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 45-80% B in 45 min). Man erhält die beiden Produkte als weiße Feststoffe nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen, **59** (21% bzgl. **3**) und **60** (9% bzgl. **3**).

Analytische HPLC **59**: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-75% B in 5 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 3.8$ min; $M_{ber.} = 1269,9$; MALDI-TOF (m/z): 1270.9 [M+H]⁺, 1292.9 [M+Na]⁺, 1308.9 [M+K]⁺

Analytische HPLC **60**: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-75% B in 5 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 3.2$ min; $M_{ber.} = 1269,9$; MALDI-TOF (m/z): 1292.9 [M+Na]⁺, 1308.9 [M+K]⁺

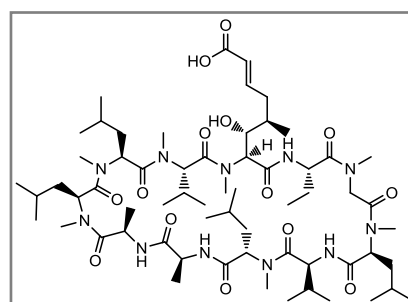
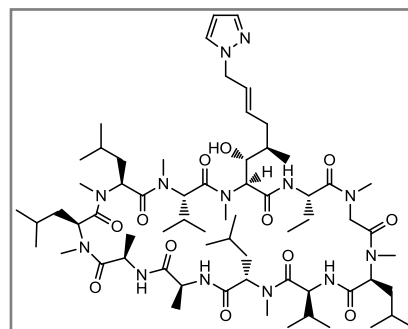
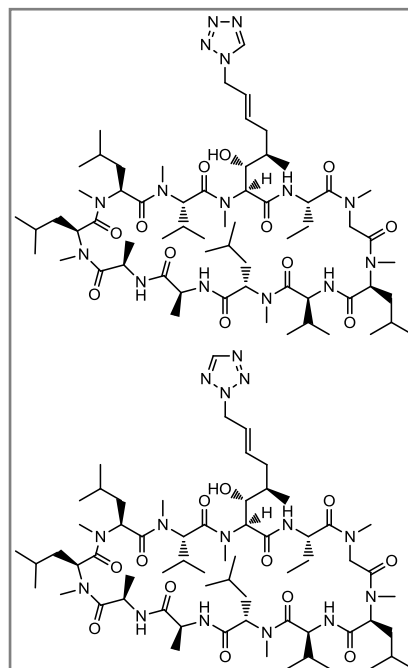
[MeBmt-pyrazol]¹-CsA (61): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 45-85% B in 48 min). Man erhält das Produkt als weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (30% bzgl. **3**).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 5.0$ min; $M_{ber.} = 1267,9$; MALDI-TOF (m/z): 1268.9 [M+H]⁺, 1290.9 [M+Na]⁺, 1306.9 [M+K]⁺

(E)-[CH(OH)CH(CH₃)CH₂(CH)₂COOH]¹-CsA (62): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 25-75% B in 75 min). Die zweite Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8 250 x 21 mm. Methode: 20 °C, Flussrate 17 ml/min, Gradient 30-60% B in 36 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der Fraktionen (18%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 8.2$ min; $M_{ber.} = 1231,8$; MALDI-TOF (m/z): 1233.0 [M+H]⁺, 1255.0 [M+Na]⁺

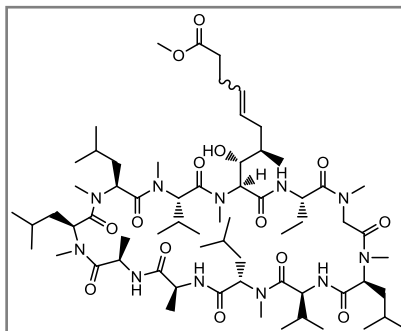
¹H-NMR, δ (MeBmt¹): 7.02, 5.78, 5.42, 3.90, 2.52/2.11, 1.87, 0.85; ¹³C-NMR, δ (MeBmt¹): 152.7, 124.5, 76.2, 61.2, 37.4, 37.4, 16.7



[MeBmt-CH₂COOCH₃]¹-CsA (63) (Reaktion mit 4-Pentensäuremethylester): Die Reinigung des Zwischenproduktes erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 30-80% B in 60 min). Man erhält das Zwischenprodukt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (33%).

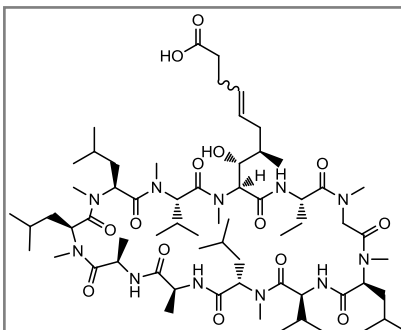
Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 11.1$ min; $M_{ber.}$ 1273,9; MALDI-TOF (m/z): 1296.6 [M+Na]⁺, 1312.6 [M+K]⁺

trans: ¹H-NMR, δ (MeBmt¹): 5.46, 5.37, 5.32, 3.75, 3.64, 2.42, 2.33/2.29, 2.27, 1.61, 0.68; ¹³C-NMR, δ (MeBmt¹): 176.2, 132.6, 132.2, 77.3, 61.3, 54.1, 38.4, 37.0, 33.7, 30.7, 19.4; *cis*, (~ 30%): ¹H-NMR, δ (MeBmt¹): 5.45, 5.44, 5.32, 3.84, 2.44, 2.39, 2.26, 1.65, 0.73



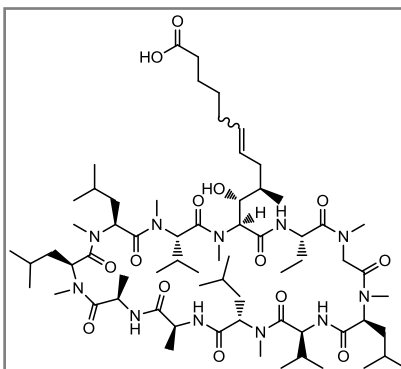
[MeBmt-CH₂COOH]¹-CsA (64): Zu einer Lösung von **63** (40 mg; 0,031 mmol) in Methanol (3 ml) gibt man 0.2 M wässrige LiOH-Lösung (3 ml) und lässt 2 h bei Raumtemperatur rühren. Man säuert mit 18%iger HCl an. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 40 °C, Gradient 40-90% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (87%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 4.4$ min; $M_{ber.}$ 1259,9; MALDI-TOF (m/z): 1261.1 [M+H]⁺, 1283.1 [M+Na]⁺, 1299.0 [M+K]⁺



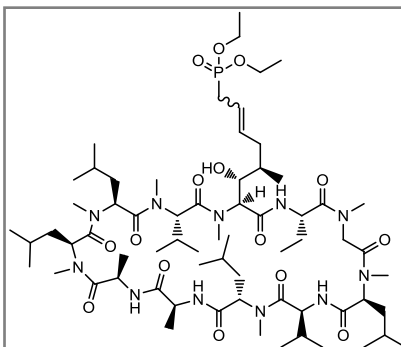
[MeBmt-(CH₂)₃COOH]¹-CsA (65): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 40 °C, Gradient 50-80% B in 36 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (51%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-75% B in 5 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 3.9$ min; $M_{ber.}$ 1287,9; MALDI-TOF (m/z): 1289.2 [M+H]⁺, 1311.2 [M+Na]⁺, 1327.1 [M+K]⁺



[MeBmt-PO(OC₂H₅)₂]¹-CsA (66) (Reaktion mit 3-Butenylphosphonsäurediethylester): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 30-80% B in 60 min). Man erhält das Produkt als weiße Feststoffe nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (37%).

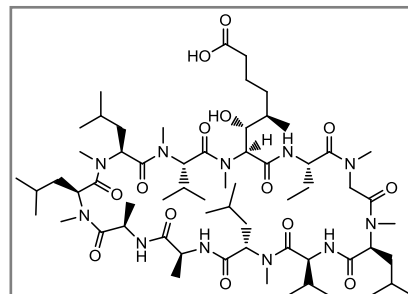
Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 5-100% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min.



$t_R = 11.8$ min; $M_{ber.} 1337,9$; ESI (m/z): $1339.3 [M+H]^+$ und $670.2 [M+2H]^{2+}$

trans: 1H -NMR, δ (MeBmt 1): 5.53, 5.49, 5.30, 4.08, 3.75, 2.59, 2.55, 2.48, 1.64, 1.30, 0.69; ^{13}C -NMR, δ (MeBmt 1): 137.7, 121.9, 77.3, 64.9, 61.4, 38.5, 38.5, 33.3, 32.2, 19.5, 18.9; *cis*, (~ 27%): 1H -NMR, δ (MeBmt 1): 5.61, 5.47, 5.39, 4.08, 3.83, 2.60, 2.56, 2.33, 1.86, 1.67, 1.30, 0.72; ^{13}C -NMR, δ (MeBmt 1): 135.8, 120.6, 76.9, 64.9, 61.4, 38.4, 32.3, 28.6, 27.5, 19.8, 18.9

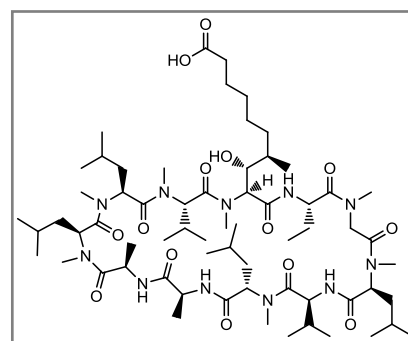
[CH(OH)CH(CH $_3$)(CH $_2$) $_3$ COOH] 1 -CsA (67): Zu einer Lösung von **1** (100 mg; 0,083 mmol; 1 \AA) in DCB (7 ml) werden Maleinsäuredimethylester (208 μ l; 1,66 mmol; 20 \AA) und HGII (5,2 mg; 0,008 mmol; 0,1 \AA) gegeben und die Reaktionsmischung wird in der Mikrowelle (200 W; in 4 min von Raumtemperatur auf 150 $^\circ\text{C}$, dann 10 min bei 150 $^\circ\text{C}$) erhitzt.



Nach erneuter Zugabe von Katalysator (3 mg) und Maleinsäuredimethylester (208 μ l; 1,66 mmol; 20 \AA) wird in der Mikrowelle (200 W; in 4 min von Raumtemperatur auf 150 $^\circ\text{C}$, dann 10 min bei 150 $^\circ\text{C}$) erhitzt (2 x). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 $^\circ\text{C}$, Gradient 50-100% B in 60 min). Das Zwischenprodukt wird als weißer Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen erhalten. (*Hydrierung gemäß der angegebenen allgemeinen Vorschrift*) Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 40 $^\circ\text{C}$, Gradient 60-90% B in 36 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (21%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H $_2$ O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 $^\circ\text{C}$, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 3.9$ min; $M_{ber.} 1233,8$; MALDI-TOF (m/z): 1234.6 $[M+H]^+$, 1256.6 $[M+Na]^+$, 1272.6 $[M+K]^+$

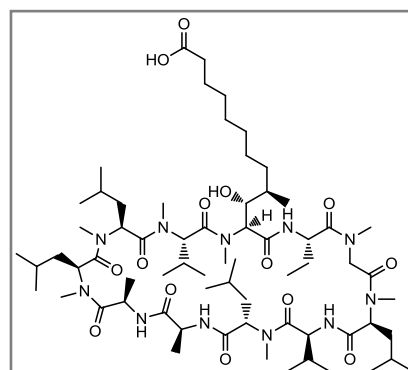
[CH(OH)CH(CH $_3$)(CH $_2$) $_5$ COOH] 1 -CsA (68): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 $^\circ\text{C}$, Gradient 60-85% B in 30 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (37%).



Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H $_2$ O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 $^\circ\text{C}$, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min.

$t_R = 4.4$ min; $M_{ber.} 1261,9$; MALDI-TOF (m/z): 1262.5 $[M+H]^+$, 1284.4 $[M+Na]^+$, 1300.4 $[M+K]^+$

[CH(OH)CH(CH $_3$)(CH $_2$) $_7$ COOH] 1 -CsA (69): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 40 $^\circ\text{C}$, Gradient 65-90% B in 30 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (1,5 mg; 31%).



Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H $_2$ O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 $^\circ\text{C}$, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min.

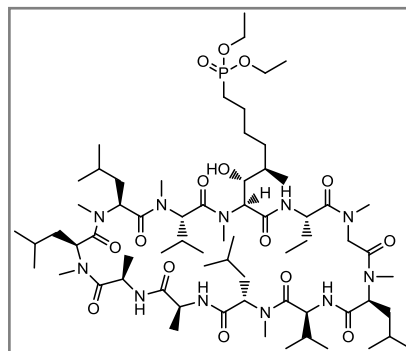
$t_R = 5.4$ min; $M_{ber.} 1289,9$; MALDI-TOF (m/z): 1290.7 $[M+H]^+$,

1312.7 [M+Na]⁺, 1328.7 [M+K]⁺

[CH(OH)CH(CH₃)(CH₂)₄PO(OCH₂CH₃)₂]¹-CsA (70): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 40 °C, Gradient 60-90% B in 36 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (89%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 5-100% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min.

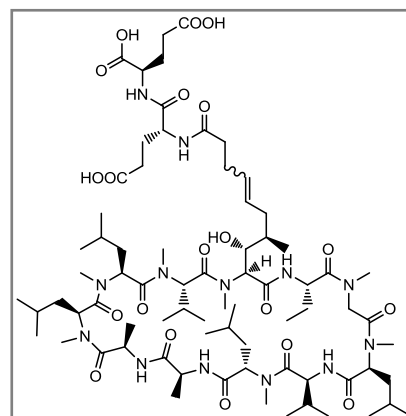
$t_R = 11.9$ min; $M_{ber.} = 1339,9$; MALDI-TOF (m/z): 1340.8 [M+H]⁺, 1362.8 [M+Na]⁺, 1378.8 [M+K]⁺



[MeBmt-CH₂CO-(D-Glu)₂-OH]¹-CsA (71): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 40 °C, Gradient 45-85% B in 48 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (27%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 5-100% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min.

$t_R = 9.9$ min; $M_{ber.} = 1517,9$; MALDI-TOF (m/z): 1519.3 [M+H]⁺, 1541.3 [M+Na]⁺, 1557.3 [M+K]⁺



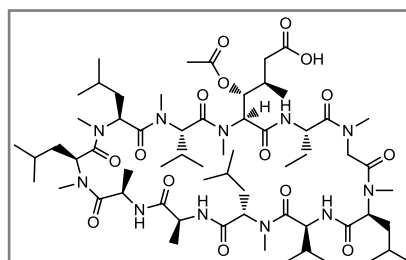
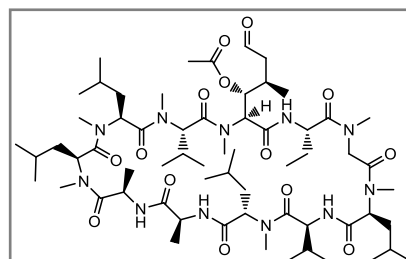
[CH(O-Acetyl)CH(CH₃)CH₂CHO]¹-CsA (72): Zu einer Lösung von **3** (500 mg; 0,402 mmol; 1 Å) in ACN (5 ml) und Wasser (714 µl) tropft man eine Lösung aus Ruthenium(III)chlorid Hydrat (4,14 mg; 0,02 mmol; 0,05 Å) und NaIO₄ (171,4 mg; 0,80 mmol; 2 Å) in Wasser (1,1 ml) mittels Spritze innerhalb 7 h zu und lässt über Nacht rühren. Nach der Zugabe von Essigsäureethylester (37 ml) extrahiert man mit gesättigter NaCl-Lösung (3 x 18 ml).

Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO₂; EtOAc/MeOH/AcOH 10:0,5:0,1) erhält man das Produkt als weißen Feststoff (275 mg; 56%). Als Nebenprodukt ist die Säure

[CH(O-Acetyl)CH(CH₃)CH₂COOH]¹-CsA **73 entstanden (Verhältnis Aldehyd:Säure laut HPLC 5:1).**

Analytische HPLC **72**: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 12.2$ min; $M_{ber.} = 1231,8$; MALDI-TOF (m/z): 1233.0 [M+H]⁺, 1254.9 [M+Na]⁺, 1270.9 [M+K]⁺

Analytische HPLC **73**: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 8.9$ min; $M_{ber.} = 1247,8$; MALDI-TOF (m/z): 1249.0 [M+H]⁺, 1271.0 [M+Na]⁺, 1287.0 [M+K]⁺

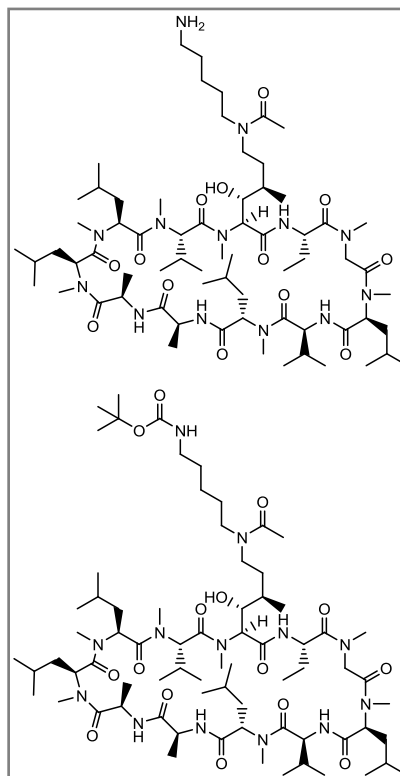


[CH(OH)CH(CH₃)CH₂CH₂N(COCH₃)(CH₂)₅NH₂]¹-CsA (74) und [CH(OH)CH(CH₃)CH₂CH₂N(COCH₃)(CH₂)₅NH-Boc]¹-CsA (75):

Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 40-90% B in 60 min). Man erhält die Produkte als weiße Feststoffe nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen, **74** (9% bzgl. **3**) und **75** (21% bzgl. **3**).

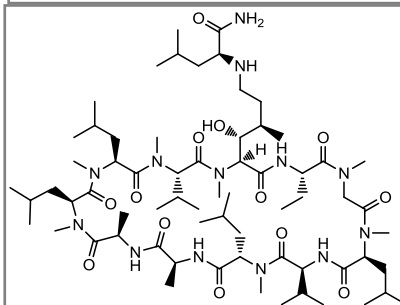
Analytische HPLC **74**: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C18, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 5.4$ min; $M_{ber.} = 1317,9$; MALDI-TOF (m/z): 1319.0 [M+H]⁺, 1340.9 [M+Na]⁺, 1356.9 [M+K]⁺

Analytische HPLC **75**: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C8, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 10.1$ min; $M_{ber.} = 1418,0$; MALDI-TOF (m/z): 1418.9 [M+H]⁺, 1440.9 [M+Na]⁺, 1456.9 [M+K]⁺



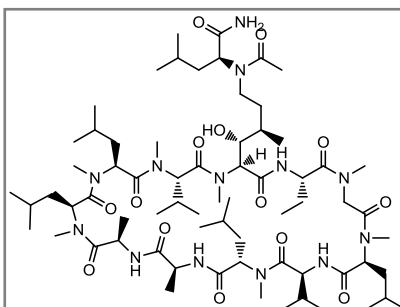
[CH(OH)CH(CH₃)CH₂CH₂-L-Leu-NH₂]¹-CsA (76): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8, Methode: 20 °C, Gradient 40-90% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (28%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C18, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-100% B in 30 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 9.7$ min; $M_{ber.} = 1303,9$; MALDI-TOF (m/z): 1304.9 [M+H]⁺, 1326.9 [M+Na]⁺, 1342.9 [M+K]⁺



[CH(OH)CH(CH₃)CH₂CH₂N(COCH₃)(CHCH₂CH(CH₃)₂)(CONH₂)]¹-CsA (77): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C8 250 x 21 mm. Methode: 20 °C, Flussrate 17 ml/min, Gradient 40-90% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (18%).

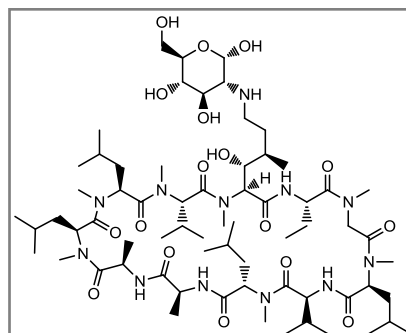
Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,05% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,05% TFA/ACN, Säule RP C18, 125.00 x 4.000 mm. Methode: 20 °C, 50-75% B in 15 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 7.3$ min; $M_{ber.} = 1345,9$; MALDI-TOF (m/z): 1368.8 [M+Na]⁺, 1384.8 [M+K]⁺



[CH(OH)CH(CH₃)CH₂CH₂NH-D-Glucosyl]¹-CsA (78): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18 250 x 10 mm. Methode: 20 °C, Flussrate 5 ml/min, Gradient 30-70% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (18%).

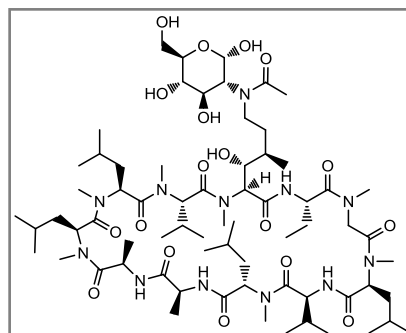
Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 5-76% B in 12 min, Flussrate 1 ml/min.

$t_R = 8.9$ min; $M_{ber.}$ 1352,9; ESI (m/z): 1353.9 [M+H]⁺ und 677.5 [M+2H]²⁺



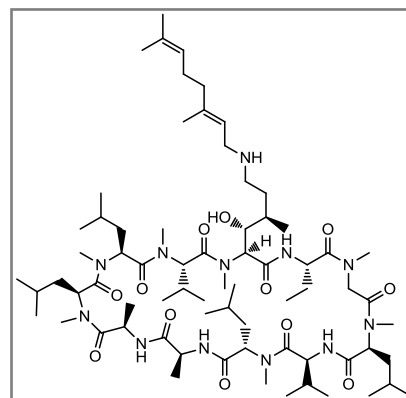
[CH(OH)CH(CH₃)CH₂CH₂N(COCH₃)-D-Glucosyl]¹-CsA (79): Zu einer Lösung von Eisessig (0,5 µl; 0,0088 mmol; 2,5 Å) in ACN (300 µl) gibt man DIPEA (4,8 µl; 0,028 mmol; 8 Å) und HATU (3,7 mg; 0,0096 mmol; 1,1 Å) und lässt 5 min bei Raumtemperatur rühren. Dann gibt man eine Lösung von **78** (4,7 mg; 0,0035 mmol; 1 Å) und DIPEA (1,8 µl; 0,0105 mmol; 3 Å) in ACN (300 µl) zu und lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionslösung wird mit 18%iger wässriger HCl angesäuert und mittels präparativer HPLC getrennt (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 30-70% B in 60 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (33%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-75% B in 5 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 2.1$ min; $M_{ber.}$ 1394,9; MALDI-TOF (m/z): 1418.0 [M+Na]⁺, 1434.0 [M+K]⁺



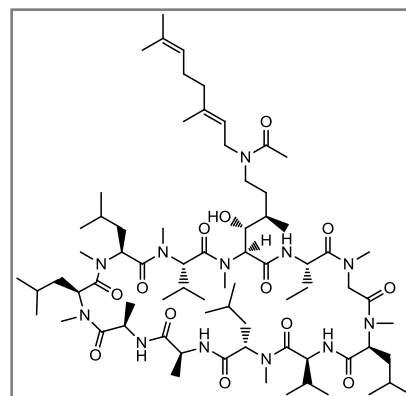
[CH(OH)CH(CH₃)CH₂CH₂NH-Geranyl]¹-CsA (80): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18 250 x 10 mm. Methode: 20 °C, Gradient 50-85% B in 42 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (47%).

Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 5.3$ min; $M_{ber.}$ 1327,0; MALDI-TOF (m/z): 1328.3 [M+H]⁺, 1350.4 [M+Na]⁺, 1466.4 [M+K]⁺



[CH(OH)CH(CH₃)CH₂CH₂N(COCH₃)-Geranyl]¹-CsA (81): Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C18, Methode: 20 °C, Gradient 60-90% B in 36 min). Man erhält das Produkt als einen weißen Feststoff nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen (30%).

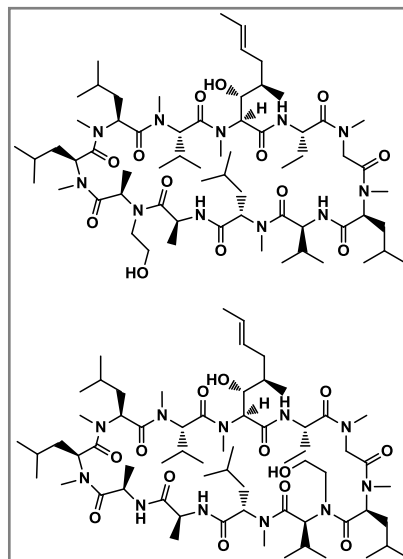
Analytische HPLC: Lösungsmittel A 0,1% TFA/H₂O, Lösungsmittel B 0,1% TFA/ACN, Säule RP C18, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1ml/min.



$t_R = 7.6$ min; $M_{\text{ber.}} 1369,0$; MALDI-TOF (m/z): 1370.3 $[M+H]^+$, 1392.3 $[M+Na]^+$, 1408.3 $[M+K]^+$

[D-Ala(N-CH₂CH₂OH)]⁸-CsA (82**) und [Val(N-CH₂CH₂OH)]⁵-CsA**

(83): Zu einer Lösung von **4** (300 mg; 0,22 mmol; 1 Å) in trockenem THF (4,4 ml) wird bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre Lithiumbis(trimethylsilyl)amid (1 M in THF) (1,5 ml; 1,5 mmol; 6,8 Å) gegeben und 30 min bei -78 °C gerührt. Nach Zugabe von 1,3,2-Dioxathiolan-2,2-dioxid (138 mg; 1,1 mmol; 5 Å) wird 30 min bei -78 °C gerührt. Dann wird die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Essigsäureethylester (15 ml) aufgenommen und mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (3 x 15 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet. Die Reaktionsmischung wird im Vakuum aufkonzentriert und mittels präparativer HPLC gereinigt (Säule RP C12, Methode: 40 °C, Gradient 70-100% B in 60 min). Die Mischung der beiden Zwischenprodukte (36 mg) wird in absolutem Ethanol (485 µl) aufgenommen. Nach Zugabe von konzentrierter H₂SO₄ (5,2 µl) wird 10 min bei 70 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird auf 0 °C gekühlt, mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung auf pH 7 gebracht und im Vakuum aufkonzentriert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC (Säule RP C12, Methode: 40 °C, Gradient 45-85% B in 48 min). Man erhält die Produkte als weiße Feststoffe nach Lyophilisation der sauberen Fraktionen, **82** (23% bzgl. **1**) und **83** (3% bzgl. **1**).



Analytische HPLC **82**: Lösungsmittel A H₂O, Lösungsmittel B ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 4.6$ min; $M_{\text{ber.}} 1245,9$; ESI (m/z): 1247.1 $[M+H]^+$ und 624.2 $[M+2H]^{2+}$

82: ¹H-NMR, δ (Abu²): 7.54, 4.98, 1.75, 1.56, 0.77/ 7.44, 4.90, 1.75, 1.57, 0.79/ 7.18, 4.90, 1.82, 1.59, 0.91; δ (Val⁵): 8.18, 4.51, 2.23, 0.96, 0.86/ 8.15, 4.59, 2.22, 0.91, 0.83/ 8.10, 4.56, 2.22, 0.91, 0.83/ 8.10, 4.56., 2.22, 0.91, 0.83/ 7.98, 4.82, 2.10, 0.84/ 7.92, 4.75, 2.14, 0.92, 0.88/ 7.84, 4.76, 2.04, 0.92, 0.85/ 7.31, 4.72, 2.10, 0.92, 0.88; δ (Ala⁷): 6.79, 4.90, 1.17/ 6.76, 4.89, 1.18/ 6.76, 4.89, 1.18/ 6.67, 4.93, 1.18/ 6.61, 4.93, 1.19; δ (D-Ala⁸): 4.92, 1.40/ 4.82, 1.43/ 4.78, 1.44; δ (-CH₂CH₂OH): 3.84, 3.73, 3.62, 3.46 (NOE zu 4.92 von D-Ala⁸)

Analytische HPLC **83**: Lösungsmittel A H₂O, Lösungsmittel B ACN, Säule RP C8, 50 x 4.6 mm. Methode: 40 °C, 50-100% B in 10 min, Flussrate 1 ml/min. $t_R = 4.8$ min; $M_{\text{ber.}} 1245,9$; ESI (m/z): 1247.1 $[M+H]^+$ und 624.2 $[M+2H]^{2+}$

83: ¹H-NMR, (Abu²): 6.78, 4.76, 1.80, 1.63, 1.03; δ (Val⁵): 5.13, 2.43, 0.85, 0.68; δ (Ala⁷): 6.55, 4.42, 1.11; δ (D-Ala⁸): 6.90, 4.74, 1.23; δ (-CH₂CH₂OH): 3.70, 3.38, 3.24, 3.01

5 Literaturverzeichnis

- Aebi, J.D., Deyo, D.T., Sun, C.Q., Guillaume, D., Dunlap, B., Rich, D.H., (1990) *J. Med. Chem.*, **33**, 999-1009.
- Allain, F., Boutillon, C., Mariller, C., Spik, G., (1995) *J. Immunol. Methods*, **178**, 113-120.
- Anderson, S.K., Gallinger, S., Roder, J., Frey, J., Young, H.A., Ortaldo, J.R., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 542-546.
- Arora, K., Gwinn, W.M., Bower, M.A., Watson, A., Okwumabua, I., MacDonald, H.R., Bukrinsky, M.I., Constant, S.L., (2005) *J. Immunol.*, **175**, 517-522.
- Bahmed, K., Henry, C., Holliday, M., Redzic, J.S., Ciobanu, M., Zhang, F., Weekes, C., Sclafani, R.A., DeGregori, J., Eisenmesser, E.Z., (2012) *Cancer Cell International*, **12**:19.
- Balsley, M.A., Malešević, M., Stemmy, E.J., Gigley, J., Jurjus, R.A., Herzog, D., Bukrinsky, M.I., Fischer, G., Constant, S.L., (2010) *J. Immunol.*, **185**, 7663-7670.
- Barth, H., Aktories, K., (2011) *European Journal of Cell Biology*, **90**, 944-950.
- Bauer, K., Kretzschmar, A.K., Cvijic, H., Blumert, C., Löffler, D., Brocke-Heidrich, K., Schiene-Fischer, C., Fischer, G., Sinz, A., Clevenger, C.V., Horn, F., (2009) *Oncogene*, **28**, 2784-2795.
- Baumgrass, R., Zhang, Y., Erdmann, F., Thiel, A., Weiwad, M., Radbruch, A., Fischer, G., (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 2470-2479.
- Béhé, M., Kluge, G., Becker, W., Gotthardt, M., Behr, T.M., (2005) *J. Nucl. Med.*, **46**, 1012-1015.
- Bell, R.D., Winkler, E.A., Singh, I., Sagare, A.P., Deane, R., Wu, Z., Holtzman, D.M., Betsholtz, C., Armulik, A., Sallstrom, J., Berk, B.C., Zlokovic, B.V., (2012) *Nature*, **485**, 512-516.
- Belshaw, P.J., Schoepfer, J.G., Liu, K.-Q., Morrison, K.L., Schreiber, S.L., (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 2129-2132.
- Bérard, J., (2008) *Thèse N° 3993*.
- Bienkowska-Haba, M., Patel, H.D., Sapp, M., (2009) *PLoS Pathog.*, **5**, e1000524.
- Billich, A., Winkler, G., Aschauer, H., Rot, A., Peichl, P., (1997) *J. Exp. Med.*, **185**, 975-980.
- Billich, A., Vypel, H., Grassberger, M., Schmook, F.P., Steck, A., Stuetz, A., (2005) *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 3157-3167.
- Block, L.H., Sutter, P.M., Mihatsch, M.J., (1983) *Klin. Wochenschr.*, **61**, 1053-1062.
- Bock, V.D., Hiemstra, H., van Maarseveen, J.H., (2006) *Eur. J. Org. Chem.*, **1**, 51-68.
- Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U., Stähelin, H., (1976) *Agents and Actions*, **6**, 468-475.
- Borel, J.F., Feurer, C., Magnée, C., Stähelin, H., (1977) *Immunol.*, **32**, 1017-1025.
- Bosco, D.A., Eisenmesser, E.Z., Pochapsky, S., Sundquist, W.I., Kern, D., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5247-5252.
- Bose, S., Mathur, M., Bates, P., Joshi, N., Banerjee, A.K., (2003) *Journal of General Virology*, **84**, 1687-1699.

- Brooks, C.A., Cramer, S.M., Rosano, T.G., (1993) *Clin. Chem.*, **39**, 457-466.
- Brückner, R., (2004) *Reaktionsmechanismen*, 3.Auflage, aktualisiert und bearbeitet, Spektrum Akademischer Verlag, München, 287, 667f., 741ff..
- Búa, J., Ruiz, A.M., Potenza, M., Fichera, L.E., (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 4633-4637.
- Bukrinsky, M.I., (2002) *Trends Immunol.*, **23**, 323-325.
- Calne, R.Y., Rolles, K., Thiru, S., McMaster, P., Craddock, G.N., Aziz, S., White, D.J.G., Evans, D.B., Dunn, D.C., Henderson, R.G., Lewis, P., (1979) *Lancet*, **314**, 1033-1036.
- Calne, R.Y., White, D.J.G., Evans, D.B., Thiru, S., Henderson, R.G., Hamilton, D.V., Rolles, K., McMaster, P., Duffy, T.J., MacDougall, B.R.D., Williams, R., (1981) *Br. Med. J.*, **282**, 934-936.
- Carmiliet, P., De Strooper, B., (2012) *Nature*, **485**, 451-452.
- Carry, J.-C., Evers, M., Barrière, J.-C., Bashiardes, G., Bensoussan, C., Gueguen, J.-C., Dereu, N., Filoche, B., Sablé, S., Vuilhorgne, M., Mignani, S., (2004) *Synlett*, **2**, 316-320.
- Chang, G., Li, C., Lu, W., Ding, J., (2010) *Macromol. Biosci.*, **10**, 1248-1256.
- Chatterji, U., Bobardt, M., Selvarajah, S., Yang, F., Tang, H., Sakamoto, N., Vuagniaux, G., Parkinson, T., Gally, P., (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 16998-17005.
- Chevalier, F., Depagne, J., Hem, S., Chevillard, S., Bensimon, J., Bertrand, P., Lebeau, J., (2012) *Proteomics*, **12**, 1756-1766.
- Ciesek, S., Steinmann, E., Wedemeyer, H., Manns, M.P., Neyts, J., Tautz, N., Madan, V., Bartenschlager, R., von Hahn, T., Pietschmann, T., (2009) *Hepatology*, **50**, 1638-45.
- Coelmont, L., Kaptein, S., Paeshuysse, J., Vliegen, I., Dumont, J.-M., Vuagniaux, G., Neyts, J., (2009) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 967-976.
- Colucci, W.J., Tung, R.D., Petri, J.A., Rich, D.H., (1990) *J. Org. Chem.*, **55**, 2895-2903.
- Connern, C.P., Halestrap, A.P., (1992) *Biochem. J.*, **284**, 381-385.
- Crabtree, G.R., (1999) *Cell*, **96**, 611-614.
- Damsker, J.M., Okwumabua, I., Pushkarsky, T., Arora, K., Bukrinsky, M.I., Constant, S.L., (2008) *Immunology*, **126**, 55-62.
- Davalian, D., Beresini, M.H., Alexander, S., Hu, M.W.-L., Ullman, E.F., (2001) Paten No. US 6190873.
- Davis, T.L., Walker, J.R., Ouyang, H., MacKenzie, F., Butler-Cole, C., Newman, E.M., Eisenmesser, E.Z., Dhe-paganon, S., (2008) *FEBS*, **275**, 2283-2295.
- Dougados, M., Awada, H., Amor, B., (1988), *Ann. Rheum. Dis.*, **47**, 127-133.
- Dummer, J.S., Hardy, A., Poorsattar, A., Ho, M., (1983) *Transplantation*, **36**, 259-267.
- Eberle, M.K., Nuninger, F., (1992) *J. Org. Chem.*, **57**, 2689-2691.
- Eberle, M.K., Nuninger, F., (1993) *J. Org. Chem.*, **58**, 673-677.
- Eberle, M.K., Jutzi-Eme, A.-M., Nuninger, F., (1994) *J. Org. Chem.*, **59**, 7249-7258.
- Eberle, M.K., Nuninger, F., (1994) *Tetrahedron Lett.*, **35**, 6477-6480.

- Eberle, M.K., Nuninger, F., Weber, H.-P., (1995) *J. Org. Chem.*, **60**, 2610-2612.
- Eberle, M.K., Nuninger, F., (1995) *J. Org. Chem.*, **60**, 4868-4872.
- Eberle, M.K., Keese, R., (2010) *Helv. Chim. Acta*, **93**, 1583-1601.
- Erdmann, F., Weiwad, M., Kilka, S., Karanik, M., Pätzelt, M., Baumgrass, R., Liebscher, J., Fischer, G., (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 1888-1898.
- Evers, M., Barrière, J.-C., Bashiardes, G., Bousseau, A., Carry, J.-C., Dereu, N., Filoche, B., Henin, Y., Sablé, S., Vuilhorgne, M., Mignani, S., (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 4415-4419.
- Fagioli, S., Bruni, F., Bravi, M., Candusso, M., Gaffuri, G., Colledan, M., Torre, G., (2007) *Digestive and Liver Disease*, **39**, S379-S385.
- Fanghänel, J., Fischer, G., (2003) *Biophysical Chemistry*, **100**, 351-366.
- Fanghänel, J., Fischer, G., (2004) *Frontiers in Bioscience*, **9**, 3453-3478.
- Fearon, P., Lonsdale-Eccles, A.A., Ross, O.K., Todd, C., Sinha, A., Allain, F., Reynolds, N.J., (2011) *J. Invest. Dermatol.*, **131**, 1085-1094.
- Fischer, G., Bang, H., Mech, C., (1984) *Biomed. Biochim. Acta*, **43**, 1101-1111.
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., Schmid, F.X., (1989) *Nature*, **337**, 476-478.
- Fischer, G., Aumüller, T., (2003) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **148**, 105-150.
- Fischer, G., Gallay, P., Hopkins, S., (2010) *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **11**, 911-918.
- Forte, M., Gold, B.G., Marracci, G., Chaudhary, P., Basso, E., Johnson, D., Yu, X., Fowlkes, J., Rahder, M., Stem, K., Bernardi, P., Bourdette, D., (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7558-7563.
- Franke, E.K., Yuan, H.E.H., Luban, J., (1994) *Nature*, **372**, 359-362.
- Fricke, G., Drewe, J., Huwyler, J., Gutmann, H., Beglinger, C., (1996) *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 1841-1847.
- Gaali, S., Kozany, C., Hoogeland, B., Klein, M., Hausch, F., (2010) *ACS Med. Chem. Lett.*, **1**, 536-539.
- Galan, B.R., Kalbarczyk, K.P., Szczepankiewicz, S., Keister, J.B., Diver, S.T., (2007) *Org. Lett.*, **9**, 1203-1206.
- Galat, A., (1993) *Eur. J. Biochem.*, **216**, 689-707.
- Gamble, T.R., Vajdos, F.F., Yoo, S., Worthylake, D.K., Houseweart, M., Sundquist, W.I., Hill, C.P., (1996) *Cell*, **87**, 1285-1294.
- Gastmans, M., Volckaert, G., Engelborghs, Y., (1999) *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **35**, 464-474.
- Gold, M.H., Picascia, D.D., Roenigk, H.H., (1989) *Int. J. Dermatol.*, **28**, 481.
- Gomez, F.J., Pilcher-Roberts, R., Alborzi, A., Newman, S.L., (2008) *J. Immunol.*, **181**, 7106-7114.
- Griffiths, C.E.M., Powles, A.V., Leonard, J.N., Fry, L., Baker, B.S., Valdimarsson, H., (1986) *Br. Med. J.*, **293**, 731-732.
- Grote, J., Fishpaugh, J., Rege, S., (2005) *Organic Process Research and Development*, **9**, 822-824.

- Guichou, J.-F., Patiny, L., Mutter, M., (2002) *Tetrahedron Lett.*, **43**, 4389-4390.
- Gwinn, W.M., Damsker, J.M., Falahati, R., Okwumabua, I., Kelly-Welch, A., Keegan, A.D., Vanpouille, C., Lee, J.J., Dent, L.A., Leitenberg, D., Bukrinsky, M.I., Constant, S.L., (2006) *J. Immunol.*, **177**, 4870-4879.
- Hamel, A.R., Hubler, F., Carrupt, A., Wenger, R.M., Mutter, M., (2004) *J. Pept. Res.*, **63**, 147-154.
- Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J., Speicher, D.W., (1984) *Science*, **226**; 544-547.
- Hanouille, X., Badillo, A., Wieruszkeski, J.-M., Verdegem, D., Landrieu, I., Bartenschlager, R., Penin, F., Lippens, G., (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 13589-13601.
- Harding, M.W., Handschumacher, R.E., Speicher, D.W., (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 8547-8555.
- He, Q.-L., Jiang, H., Zhang, F., Chen, H.-B., Tang, G.-L., (2008) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 3995-3998.
- Hopkins, S., Scorneaux, B., Huang, Z., Murray, M.G., Wring, S., Smitley, C., Harris, R., Erdmann, F., Fischer, G., Ribeill, Y., (2010) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**, 660-672.
- Hu, M.-K., Badger, A., Rich, D.H., (1995) *J. Med. Chem.*, **38**, 4164-4170.
- Huai, Q., Kim, H.-Y., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragon, A., Liu, J.O., Ke, H., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12037-12042.
- Huang, T.-J., Newton, R., Haddad, E.-B., Chung, K.F., (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **104**, 644-652.
- Huang, T.-J., Eynott, P., Salmon, M., Nicklin, P.L., Chung, K.F., (2002) *Eur. J. Pharmacol.*, **437**, 187-194.
- Hubler, F., Rückle, T., Patiny, L., Muamba, T., Guichou, J.-F., Mutter, M., Wenger, R., (2000) *Tetrahedron Lett.*, **41**, 7193-7196.
- Huo, D.-H., Yi, L.-N., Yang, J., (2008) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **372**, 14-18.
- Ivery, M.T.G., (2000) *Med. Res. Rev.*, **20**, 452-484.
- Ishii, N., Watashi, K., Hishiki, T., Goto, K., Inoue, D., Hijikata, M., Wakita, T., Kato, N., Shimotohno, K., (2006) *J. Virol.*, **80**, 4510-4520.
- Jakubke, H.-D., (1996) *Peptide: Chemie und Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 143, 153, 155ff.
- Janowski, B., Fischer, G., (1997) *Bioorg. Med. Chem.*, **5**, 179-186.
- Jin, Z.-G., Melaragno, M.G., Liao, D.-F., Yan, C., Haendeler, J., Suh, Y.-A., Lambeth, J.D., Berk, B.C., (2000) *Circ. Res.*, **87**, 789-796.
- Jin, L., Harrison, S.C., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13522-13526.
- Kaiser, E., Kroll, C., Ernst, K., Schwan, C., Popoff, M., Fischer, G., Buchner, J., Aktories, K., Barth, H., (2011) *Infect. Immun.*, **79**, 3913-3921.
- Kataoka, M., Shimizu, Y., Kunikiyo, K., Asahara, Y., Yamashita, K., Ninomiya, M., Morisaki, I., Ohsaki, Y., Kido, J.-I., Nagata, T., (2000) *J. Cell. Physiol.*, **182**, 351-358.

- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Lopez, M.Z., Lohmann, V., Luban, J., Bartenschlager, R., (2009) *PLoS Pathog*, **5**, e1000546.
- Ke, H., Mayrose, D., Belshaw, P.J., Alberg, D.G., Schreiber, S.L., Chang, Z.Y., Etkorn, F.A., Ho, S., Walsh, C.T., (1994) *Structure*, **2**, 33-44.
- Kessler, H., Loosli, H.-R., Oschkinat, H., (1985) *Helv. Chim. Acta*, **68**, 661-681.
- Kieffer, L.J., Thalhammer, T., Handschuhmacher, R.E., (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 5503-5507.
- Kirsh, O., Seeler, J.-S., Pichler, A., Gast, A., Müller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., Dejean, A., (2002) *EMBO J.*, **21**, 2682-2691.
- Klebe, G., (2009) *Wirkstoffdesign*, 2.Auflage, aktualisiert und bearbeitet, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 116f..
- Kobel, H., Traber, R., (1982) *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 237-240.
- Kofron, J.L., Kuzmič, P., Gemmecker, G., Fesik, S.W., Rich, D.H., (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 2670-2675.
- Kockx, M., Jessup, W., Kritharides, L., (2010) *Pharmacology and Therapeutics*, **128**, 106-118.
- Kolb, H.C., Finn, M.G., Sharpless, K.B., (2001) *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **40**, 2004-2021.
- Krönke, M., Leonard, W.J., Depper, J.M., Arya, S.K., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., Waldmann, T.A., Greene, W.C., (1984) *Proc. Natl., Acad. Sci.*, **81**, 5214-5218.
- Krusemark, C.J., Belshaw, P.J., (2007) *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 2201-2204.
- Kuhnt, M., Bitsch, F., France, J., Hofmann, H., Sanglier, J.-J., Traber, R., (1996) *J. Antibiotics*, **49**, 781-787.
- Kumagai, A.K., Eisenberg, J.B., Pardridge, W.M., (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 15214-15219.
- Lamos, S.M., Krusemark, C.J., McGee, C.J., Scalf, M., Smith, L.M., Belshaw, P.J., (2006) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 4329-4333.
- Lamoureux, F., Gastinel, L.N., Mestre, E., Marquet, P., Essig, M., (2012) *Journal of Proteomics*, **75**, 3674-3687.
- Lang, K., Schmid, F.X., Fischer, G., (1987) *Nature*, **329**, 268-270.
- Latscha, H.P., Kazmaier, U., Klein, H.A., (2008) *Organische Chemie: Chemie-Basiswissen II*, 6.Auflage, vollständig überarbeitet, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 180f..
- Lazarova, T., Chen, J.S., Hamann, B., Kang, J.M., Homuth-Trombino, D., Han, F., Hoffmann, E., McClure, C., Eckstein, J., Or, Y.S., (2003) *J. Med. Chem.*, **46**, 674-676.
- Leon, C., Jia, J., Qiu, G., Hill, J.S., Wasan, K.M., (2008) *J. Pharmaceut. Sci.*, **97**, 2350-2361.
- Levitsky, K., Ciolli, C.J., Belshaw, P.J., (2003) *Org. Lett.*, **5**, 693-696.
- Levitsky, K., Boersma, M.D., Ciolli, C.J., Belshaw, P.J., (2005) *ChemBioChem*, **6**, 890-899.
- Lin, C.L., Leu, S., Lu, M.C., Ouyang, P., (2004) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **321**, 638-647.
- Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S.L., (1991) *Cell*, **66**, 807-815.

- Liu, X., Sun, L., Yu, M., Wang, Z., Xu, C., Xue, Q., Zhang, K., Ye, X., Kitamura, Y., Liu, W., (2009) *Cell. Microbiol.*, **11**, 730-741.
- Liu, Y., Jiang, J., Richardson, P.L., Reddy, R.D., Johnson, D.D., Kati, W.M., (2006) *Anal. Biochem.*, **356**, 100-107.
- Liu, W.T., Marat, K., Ren, Y., Eng, R.T., Wong, P.Y., (1998) *Clin. Biochem.*, **31**, 173-180.
- Löffler, G., P.E. Petrides, P.C. Heinrich, (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*, 8., völlig neu bearbeitete Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 176ff.
- Loosli, H.-R., Kessler, H., Oschkinat, H., Weber, H.-P., Petcher, T.J., Widmer, A., (1985) *Helv. Chim. Acta*, **68**, 682-704.
- Luban, J., (1996) *Cell*, **87**, 1157-1159.
- Maeng, J.-H., Yang, Z., Manning, D.D., Masih, L., Cao, Y., Pattamana, K.G., Bois, F., Molino, B.F., (2012) *Synthesis*, **44**, 63-68.
- Magni, F., Fermo, I., Arcelloni, C., Arnoldi, L., Del Puppo, M., Paroni, R., (1997) *J. Peptide Res.*, **49**, 191-194.
- Malešević, M., Kühling, J., Erdmann, F., Balsley, M.A., Bukrinsky, M.I., Constant, S.L., Fischer, G., (2010) *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **49**, 213-215.
- Malouitre, S., Dube, H., Selwood, D., Crompton, M., (2010) *Biochem. J.*, **425**, 137-148.
- Marinec, P.S., Evans, C.G., Gibbons, G.S., Tarnowski, M.A., Overbeek, D.L., Gestwicki, J.E., (2009) *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 5763-5768.
- Marks, A.R., (1996) *Physiol. Rev.*, **76**, 631-649.
- Mascarell, L., Truffa-Bachi, P., (2003) *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **3**, 205-214.
- Meza-Zepeda, L.A., Forus, A., Lygren, B., Dahlberg, A.B., Godager, L.H., South, A.P., Marenholz, I., Lioumi, M., Flørenes, V.A., Mælandsmo, G.M., Serra, M., Mischke, D., Nizetic, D., Ragoussis, J., Tarkkanen, M., Nesland, J.M., Knuutila, S., Myklebost, O., (2002) *Oncogene*, **21**, 2261-2269.
- Mi, H., Kops, O., Zimmermann, E., Jaschke, A., Tropschug, M., (1996) *FEBS Lett.*, **398**, 201-205.
- Mihatsch, M.J., Bach, J.F., Coovadia, H.M., Førre, Ø., Moutsopoulos, H.M., Drosos, A.A., Siamopoulos, K.C., Noël, L.H., Ramsaroop, R., Hällgren, R., Svenson, K., Bohman, S.O., (1988) *Klin. Wochenschr.*, **66**, 43-47.
- Nardo, G., Pozzi, S., Pignataro, M., Lauranzano, E., Spano, G., Garbelli, S., Mantovani, S., Marinou, K., Papetti, L., Monteforte, M., Torri, V., Paris, L., Bazzoni, G., Lunetta, C., Corbo, M., Mora, G., Bendotti, C., Bonetto, V., (2011) *PLoS ONE*, **6**, e25545.
- Nickell, S.P., Scheibel, L.W., Cole, G.A., (1982) *Infection Immunity*, **37**, 1093-1100.
- Niżankowska, E., Soja, J., Pinis, G., Bochenel, G., Śladek, K., Domagała, B., Pajak, A., Szczeklik, A., (1995) *Eur. Respir. J.*, **8**, 1091-1099.
- Nussenblatt, R.B., Palestine, A.G., Rook, A.H., Scher, I., Wacker, W.B., Gery, I., (1983) *Lancet*, **322**, 235-238.
- Oliyai, R., Stella, V.J., (1992) *Pharm. Res.*, **9**, 617-622.
- Ohta, K., Agematu, H., Yamada, T., Kaneko, K., Tsuchida, T., (2005) *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 390-395.

- O'Leary, T.J., Ross, P.D., Lieber, M.R., Levin, I.W., (1986) *Biophys. J.*, **49**, 795-801.
- Paeshuyse, J., Kaul, A., De Clercq, E., Rosenwirth, B., Dumont, J.-M., Scalfaro, P., Bartenschlager, R., Neyts, J., (2006) *Hepatology*, **43**, 761-770.
- Papageorgiou, C., Florineth, A., French, R., Haltiner, R., Borer, X., (1993) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **3**, 2559-2564.
- Papageorgiou, C., Sanglier, J.-J., Traber, R., (1996) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 23-26.
- Paprica, P.A., Margaritis, A., Petersen, N.O., (1992) *Bioconjugate Chem.*, **3**, 32-36.
- Park, S.B., Meier, G.P., (1989) *Tetrahedron Lett.*, **30**, 4215-4218.
- Patchett, A.A., Taub, D., Hensens, O.D., Goegelman, R.T., Yang, L., Dumont, F., Peterson, L., Sigal, N.H., (1992) *J. Antibiotics*, **45**, 94-102.
- Peng, H., Vijayakumar, S., Schiene-Fischer, C., Li, H., Purkerson, J.M., Malešević, M., Liebscher, J., Al-Awqati, Q., Schwartz, G.J., (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 6465-6475.
- Petcher, T.J., Weber, H.-P., Rügger, A., (1976) *Helv. Chim. Acta*, **59**, 1480-1488.
- Pfefferle, S., Schopf, J., Kogl, M., Friedel, C.C., Müller, M.A., Carbajo-Lozoya, J., Stellberger, T., von Dall'Armi, E., Herzog, P., Kallies, S., Niemeyer, D., Ditt, V., Kuri, T., Züst, R., Pumpor, K., Hilgenfeld, R., Schwarz, F., Zimmer, R., Steffen, I., Weber, F., Thiel, V., Herrler, G., Thiel, H.-J., Schwegmann-Weßels, C., Pöhlmann, S., Haas, J., Drosten, C., von Brunn, A., (2011) *PLoS Pathog.*, **7**, e1002331.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A., Melchior, F., (2002) *Cell*, **108**, 109-120.
- Plattner, H., Hentschel, J., (2011) *Zellbiologie*, 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 99-107.
- Potter, B., Palmer, R.A., Withnall, R., Jenkins, T.C., Chowdhry, B.Z., (2003) *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 1466-1474.
- Powles, R.L., Clink, H.M., Spence, D., Morgenstern, G., Watson, J.G., Selby, P.J., Woods, M., Barrett, A., Jameson, B., Sloane, J., Lawler, S.D., Kay, H.E.M., Lawson, D., McElwain, T.J., Alexander, P., (1980) *Lancet*, **315**, 327-329.
- Prell, E., Kahlert, V., Rücknagel, K.P., Malešević, M., Fischer, G., (2013) *ChemBioChem*, **14**, 63-65.
- Price, E.R., Zydowsky, L.D., Jin, M.J., Baker, C.H., McKeon, F.D., Walsh, C.T., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1903-1907.
- Ptak., R.G., Gallay, P.A., Jochmans, D., Halestrap, A.P., Ruegg, U.T., Pallansch, L.A., Bobardt, M.D., de Béthune, M.-P., Neyts, J., De Clercq, E., Dumont, J.-M., Scalfaro, P., Besseghir, K., Wenger, R.M., Rosenwirth, B., (2008) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 1302-1317.
- Pushkarsky, T., Zybarth, G., Dubrovsky, L., Yurchenko, V., Tang, H., Guo, H., Toole, B., Sherry, B., Bukrinsky, M., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6360-6365.
- Pushkarsky, T., Yurchenko, V., Vanpouille, C., Brichacek, B., Vaisman, I., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Sherry, B., Bukrinsky, M.I., (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 27866-27871.
- Reichel, C., von Falkenhausen, M., Brockmeier, D., Dengler, H.J., (1994) *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **46**, 417-419.

- Rosenwirth, B., Billich, A., Datema, R., Donatsch, P., Hammerschmid, F., Harrison, R., Hiestand, P., Jaksche, H., Mayer, P., Peichl, P., Quesniaux, V., Schatz, F., Schuurman, H.-J., Traber, R., Wenger, R., Wolff, B., Zenke, G., Zurini, M., (1994) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 1763-1772.
- Rothbard, J.B., Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., McGrane, P.L., Wender, P.A., Khavari, P.A., (2000) *Nat. Med.*, **6**, 1253-1258.
- Rüegger, A., Kuhn, M., Lichti, H., Loosli, H.-R., Huguenin, R., Quiquerez, C., von Wartburg, A., (1976) *Helv. Chim. Acta*, **59**, 1075-1092.
- Ryffel, B., Woerly, G., Greiner, B., Haendler, B., Mihatsch, M.J., Foxwell, B.M.J., (1991) *Immunology*, **72**, 399-404.
- Sakata, A., Tamai, I., Kawazu, K., Deguchi, Y., Ohnishi, T., Saheki, A., Tsuji, A., (1994) *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1989-1992.
- Santos, A.N., Körber, S., Küllertz, G., Fischer, G., Fischer, B., (2000) *Biology of Reproduction*, **62**, 1-7.
- Satoh, K., Matoba, T., Suzuki, J., O'Dell, M.R., Nigro, P., Cui, Z., Mohan, A., Pan, S., Li, L., Jin, Z.-G., Yan, C., Abe, J.-I., Berk, B.C., (2008) *Circulation*, **117**, 3088-3098.
- Satoh, K., Nigro, P., Berk, B.C., (2010) *Antioxid. Redox Signal.*, **12**, 675-682.
- Satoh, K., Shimokawa, H., Berk, B.C., (2010) *Circ. J.*, **74**, 2249-2256.
- Satoh, K., Fukumoto, Y., Sugimura, K., Miura, Y., Aoki, T., Nochioka, K., Tatebe, S., Miyamichi-Yamamoto, S., Shimizu, T., Osaki, S., Takagi, Y., Tsuburaya, R., Ito, Y., Matsumoto, Y., Nakayama, M., Takeda, M., Takahashi, J., Ito, K., Yasuda, S., Shimokawa, H., (2012) *Circ. J.*, doi: 10.1253/circj.CJ-12-0805.
- Scherer, G., Kramer, M.L., Schutkowski, M., Reimer, U., Fischer, G., (1998) *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 5568-5574.
- Schlegel, J., Redzic, J.S., Porter, C.C., Yurchenko, V., Bukrinsky, M., Labeikovskiy, W., Armstrong, G.S., Zhang, F., Isern, N.G., DeGregori, J., Hodges, R., Eisenmesser, E.Z., (2009) *J. Mol. Biol.*, **391**, 518-535.
- Schmidt, R., Bültmann, A., Fischel, S., Gillitzer, A., Cullen, P., Walch, A., Jost, P., Ungerer, M., Tolley, N.D., Lindemann, S., Gawaz, M., Schömig, A., May, A.E., (2008) *Circ. Res.*, **102**, 302-309.
- Schneider, H., Charara, N., Schmitz, R., Wehrli, S., Mikol, V., Zurini, M.G., Quesniaux, V.F., Movva, N.R., (1994) *Biochemistry*, **33**, 8218-8224.
- Schreiber, S.L., (1991) *Science*, **251**, 283-287.
- Schumann, M., Jahreis, G., Kahlert, V., Lücke, C., Fischer, G., (2011) *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 5556-5561.
- Scribner, A., Houck, D., Huang, Z., Mosier, S., Peel, M., Scorneaux, B., (2010) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 6542-6546.
- Seebach, D., Ko, S.Y., Kessler, H., Köck, M., Reggelin, M., Schmieder, P., Walkinshaw, M.D., Bölsterli, J.J., Bevec, D., (1991) *Helv. Chim. Acta*, **74**, 1953-1990.
- Seebach, D., Beck, A.K., Bossler, H.G., Gerber, C., Ko, S.Y., Murtiashaw, C.W., Naef, R., Shoda, S., Thaler, A., Krieger, M., Wenger, R., (1993) *Helv. Chim. Acta*, **76**, 1564-1590.

- Seizer, P., Geisler, T., Bigalke, B., Schneider, M., Klingel, K., Kandolf, R., Stellos, K., Schreieck, J., Gawaz, M., May, A.E., (2011) *Int. J. Cardiol.*, doi:10.1016/j.ijcard.2011.06.049
- Seizer, P., Klingel, K., Sauter, M., Westermann, D., Ochmann, C., Schönberger, T., Schleicher, R., Stellos, K., Schmidt, E.-M., Borst, O., Bigalke, B., Kandolf, R., Lenger, H., Gawaz, M., May, A.E., (2012) *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **53**, 6-14.
- Sellar, K.J., van Rossum, H.H., Romijn, F.P.H.T.M., Smit, N.P.M., de Fijter, J.W., van Pelt, J., (2006) *Anal. Biochem.*, **358**, 104-110.
- Shen, W.-C., Ryser, H.J.-P., (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 1872-1876.
- Sheng, J., Oyler, G., Zhou, B., Janda, K., Shoemaker, C.B., (2009) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **382**, 236-240.
- Sherry, B., Yarlett, N., Strupp, A., Cerami, A., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3511-3515.
- Sherry, B., Zybarth, G., Alfano, M., Dubrovsky, L., Mitchell, R., Rich, D., Ulrich, P., Bucala, R., Cerami, A., Bukrinsky, M., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1758-63.
- Shevchenko, V.P., Nagaev, I.Y., Myasoedov, N.F., Andres, H., Moenius, T., Susan, A., (2004) *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **47**, 407-414.
- Shibata, N., Shimakawa, H., Minouchi, T., Yamaji, A., (1993) *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 702-707.
- Sieber, P., (1987) *Tetrahedron Lett.*, **28**, 6147-6150.
- Smulik, J.A., Diver, S.T., (2002) *Org. Lett.*, **4**, 2051-2054.
- Stillier, C.R., Dupré, J., Gent, M., Jenner, M.R., Keown, P.A., Laupacis, A., Martell, R., Rodger, N.W., v. Graffenried, B., Wolfe, B.M.J., (1984) *Science*, **223**, 1362-1367.
- Tegeder, I., Schumacher, A., John, S., Geiger, H., Geisslinger, H., Bang, H., Brune, K., (1997) *J. Clin. Immunol.*, **17**, 380-386.
- Teigelkamp, S., Achsel, T., Mundt, C., Göthel, S.-F., Cronshagen, U., Lane, W.S., Marahiel, M., Lührmann, R., (1998) *RNA*, **4**; 127-141.
- Tien, C.-L., Lin, C.-H., Lin, T.-H., Wen, F.-C., Su, C.-W., Fan, S.-S., Hsieh, M., (2012) *Eur. J. Obstet. Gynecol.*, **164**, 55-59.
- Traber, R., Kuhn, M., Rüeegger, A., Lichtih, H., Loosli, H.-R., von Wartburg, A., (1977) *Helv. Chim. Acta*, **60**, 1247-1255.
- Traber, R., Kuhn, M., Loosli, H.-R., Pache, W., von Wartburg, A., (1977) *Helv. Chim. Acta*, **60**, 1568-1578.
- Traber, R., Loosli, H.-R., Hofmann, H., Kuhn, M., von Wartburg, A., (1982) *Helv. Chim. Acta*, **65**, 1655-1677.
- Traber, R., Kobel, H., Loosli, H.-R., Senn, H., Rosenwirth, B., Lawen, A., (1994) *Antivir. Chem. Chemother.*, **5**, 331-339.
- Twentyman, P.R., (1988) *Br. J. Cancer*, **57**, 254-258.
- Underwood, S.L., McMillan, S., Reeves, R., Hunt, J., Brealey, C.J., Webber, S., Foster, M., Sargent, C.A., (2001) *Eur. J. Pharmacol.*, **420**, 165-173.
- Vickers, A.E.M., Bigg, W.A., Dannecker, R., Fischer, V., (1995) *Life Sci.*, **57**, 215-224.

- von Ruecker, A.A., Rao, G., Bidlingmaier, F., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **151**, 997-1003.
- Waldmeier, P.C., Zimmermann, K., Qian, T., Tintelnot-Blomley, M., Lemasters, J.J., (2003) *Curr. Med. Chem.*, **10**, 1485-1506.
- Wang, P., Heitman, J., (2005) *Genome Biology*, **6**, 226.
- Wang, Z., Liu, X., Zhao, Z., Xu, C., Zhang, K., Chen, C., Sun, L., Gao, G.F., Ye, X., Liu, W., (2011) *PLoS ONE*, **6**, e22625.
- Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y., Shimotohno, K., (2005) *Molecular Cell*, **19**, 111-122.
- Wei, L., Steiner, J.P., Hamilton, G.S., Wu, Y.-Q., (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 4549-4551.
- Wei, Y., Heng, G., Ben, H., (2010) *Atherosclerosis*, **213**, 415-421.
- Weinblatt, M.E., Coblyn, J.S., Fraser, P.A., Anderson, R.J., Spragg, J., Trentham, D.E., Austen, K.F., (1987) *Arthritis Rheum.*, **30**, 11-17.
- Wenger, R.M., (1984), *Helv. Chim. Acta*, **67**, 502-524.
- Wenger, R.M., (1985) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**, 77-85.
- Wenger, R.M., France, J., Bovermann, G., Walliser, L., Widmer, A., Widmer, H., (1994) *FEBS Lett.*, **340**, 255-259.
- Wolf, A., Schramm, U., Fahr, A., Aicher, L., Cordier, A., trommer, W.E., Fricker, G., (1998) *J. Pharm., Exp. Ther.*, **284**, 817-825.
- Xu, Q., Leiva, M.C., Fischkoff, S.A., Handschuhmacher, R.E., Lyttle, C.R., (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 11968-11971.
- Xu, C., Zhang, J., Huang, X., Sun, J., Xu, Y., Tang, Y., Wu, J., Shi, Y., Huang, Q., Zhang, Q., (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 15900-15908.
- Yang, F., Robotham, J.M., Nelson, H.B., Irsigler, A., Kenworthy, R., Tang, H., (2008) *J. Virol.*, **82**, 5269-5278.
- Yurchenko, V., O'Connor, M., Dai, W.W., Guo, H., Toole, B., Sherry, B., Bukrinsky, M., (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 786-788.
- Yurchenko, V., Zybarth, G., O'Connor, M., Dai, W.W., Franchin, G., Hao, T., Guo, H., Hung, H.-C., Toole, B., Gallay, P., Sherry, B., Bukrinsky, M., (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 22959-22965.
- Yurchenko, V., Constant, S., Bukrinsky, M., (2005) *Immunology*, **117**, 301-309.
- Yurchenko, V., Constant, S., Eisenmesser, E., Bukrinsky, M., (2010) *Clinical and Experimental Immunology*, **160**, 305-317.
- Zander, K., Sherman, M.P., Tessmer, U., Bruns, K., Wray, V., Prechtel, A.T., Schubert, E., Henklein, P., Luban, J., Neidleman, J., Greene, W.C., Schubert, U., (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 43202-43213.
- Zhang, Y., Baumgrass, R., Schutkowski, M., Fischer, G., (2004) *ChemBioChem*, **5**, 1006-1009.
- Zhang, Y., Erdmann, F., Fischer, G., (2009) *Nature Chem. Biol.*, **5**, 724-726.
- Zhou, Z., Ying, K., Dai, J., Tang, R., Wang, W., Huang, Y., Zhao, W., Xie, Y., Mao, Y., (2001) *Cytogenet. Cell Genet.*, **92**, 231-236.

Zhou, M., Sivaramakrishnan, A., Ponnampereuma, K., Low, W.-K., Li, C., Liu, J.O., Bergbreiter, D.E., Romo, D., (2006) *Org. Lett.*, **8**, 5247-5250.

Zhou, D., Mei, Q., Li, J., He, H., (2012) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **424**, 647-650.

Ziegler, K., Polzin, G., Frimmer, M., (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **938**, 44-50.

Zuckermann, R.N., Kerr, J.M., Kent, S.B.H., Moos, W.H., (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10646-10647.

Publikationen

A. Rentzsch, V. Kahlert, G. Jahreis, B. Schlott, M. Schutkowski, M. Malešević, G. Fischer, Identification of prolyl oligopeptidase as a cyclosporine-sensitive protease by screening of mouse liver extracts, *Biol. Chem., angenommen* (2013), doi: 10.1515/hsz-2013-0125.

E. Prell, V. Kahlert, K.P. Rücknagel, M. Malešević, G. Fischer, Fine tuning the inhibition profile of cyclosporine A by derivatization of the MeBmt residue, *ChemBioChem*, 14 (2013) 63-65.

M. Schumann, G. Jahreis, V. Kahlert, C. Lücke, G. Fischer, Oligopeptide cyclophilin inhibitors: A reassessment, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 5556-5561.

V. Kahlert, E. Prell, P. Rücknagel, M. Malešević, G. Fischer, Novel Cyclosporin derivatives for selective targeting of cyclophilins, Vortrag auf der Eurasia12 Conference on Chemical Sciences (2012, Korfu).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kahlert
Vorname: Viktoria
Geburtsdatum: 28.06.1984
Geburtsort: Halle (Saale)
Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang

September 1991 - August 1995 Karl-Friedrich-Friesen-Grundschule, Halle (Saale)
September 1995 - Juni 2004 Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Halle (Saale)

Studium

Oktober 2005 - Mai 2009 Chemie-Studium an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
Abschluss: Diplom

Weiterer Werdegang

Juni 2009 - Dezember 2012 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle (Saale)
seit Juni 2009 Promotion am Institut für Biochemie und Biotechnologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule eingereicht.

Halle (Saale), den 20.06.2013

Viktoria Kahlert