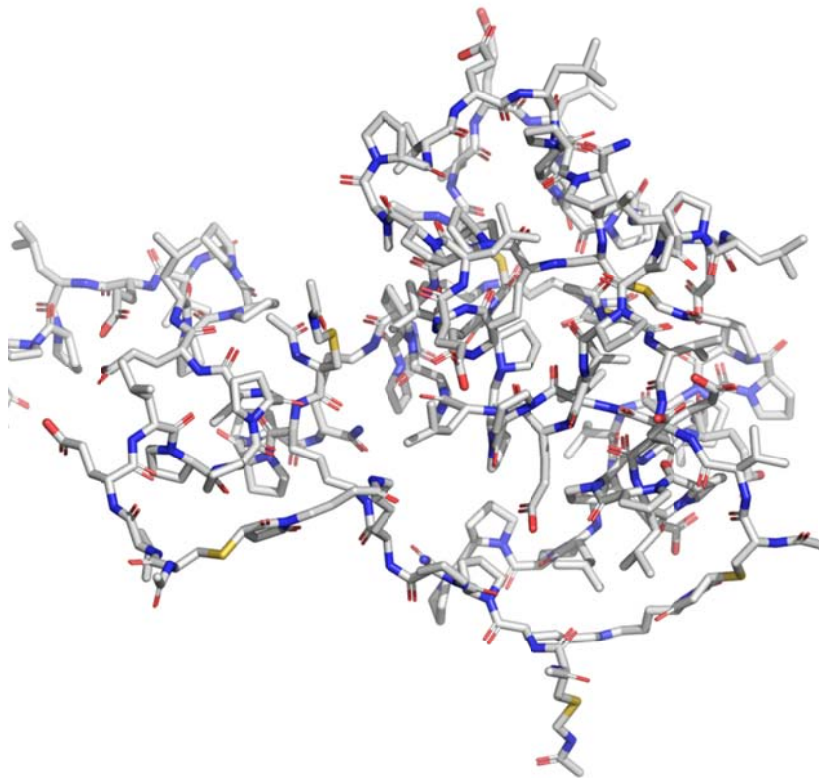


Peptid-Konjugate für den gerichteten Gentransport

Diplomarbeit



Zur Erlangung des Grades eines Diplomchemikers im Studiengang Biomedizinische Chemie
des Fachbereichs Chemie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz in Kooperation mit
dem Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz

Vorgelegt von Ruben Ragg

Mainz, Oktober 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2011 bis Oktober 2011 im Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz unter der Anleitung von Dr. Kalina Peneva und Professor Dr. Klaus Müllen angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus Müllen und Frau Dr. Kalina Peneva für die Vergabe dieses spannenden Themas und den herausragenden Arbeitsbedingungen, die mir dafür geboten wurden. Die vielen wissenschaftlichen Diskussionen waren ein besonderer Ansporn und Hilfe zugleich.

meinen Eltern Guido und Monika Ragg

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	<i>Multidrug Resistance</i> in Krebszellen.....	1
1.1.1	Die entscheidende Rolle des P-glycoprotein bei der Entstehung der MDR	3
1.1.2	siRNA als neue, auf RNA-Interferenz basierende, Therapeutika gegen MDR	4
1.1.3	Der effiziente Transport als größtes Problem bei der Anwendung von RNAi- Therapeutika	7
1.1.4	<i>Cell-penetrating peptides</i> als Transportmoleküle	7
1.1.5	Transport von siRNA durch CPPs.....	11
1.1.6	Aufnahmemechanismus CPPs	12
2	Zielsetzung und Motivation	15
3	Ergebnisse und Diskussion	18
3.1	Biokonjugat mit dendritischem Kern.....	21
3.1.1	Synthese des Dendrimer-PEG-Konjugats	22
3.1.2	Kupplung der CPPs an das Dendrimer-PEG-Konjugat	29
3.2	Biokonjugat mit Peptid-Kern	33
3.2.1	Synthesen der Peptid-CPP-Konjugate	37
3.2.2	Synthese des PEG-Peptid-Konjugats	48
3.2.3	Synthese des Farbstoff-Peptid-Konjugats	50
3.2.4	Synthese des verzweigten Peptid-Kerns	53
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	56
5	Experimenteller Teil	61
5.1	Instrumentelle Analytik	61
5.2	Allgemeine Experimentelle Bedingungen	62
5.3	Beschreibung der Synthesen	64
5.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	64
5.3.2	Biokonjugat mit dendritischem-Kern	65

5.3.3	Biokonjugat mit Peptid Kern	67
6	Literatur	83

Abkürzungen und Indizes

A	Alanin
Ac	Acetyl
Acm	Acetamidomethyl
aDNA	<i>Antisense</i> -Desoxyribonukleinsäure
Ala	Alanin
Alloc	Allyloxycarbonyl
Arg	Arginin
ATP	Adenosintri-phosphat
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
C	Cystein
CHCA	α -Cyano-4-Hydroxymizsäure
Cys	Cystein
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CPP	<i>Cell-penetrating-peptide</i>
d	Duplett
Da	Dalton
Dab-Am-4	N,N,N,N-Tetrakis(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
dsRNA	doppelsträngige Ribonucleinsäure
E	Glutaminsäure
EtAc	Ethylacetat
F	Phenylalanin
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Glu	Glutaminsäure
GMBS	N-(γ -Maleimidobutyryloxy)succinimid
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOBT	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
I	Isoleucin
ivDde	1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbutyl
K	Lysin
kDa	Kilo-Dalton

L	Leucin
Lys	Lysin
Leu	Leucin
MALDI-ToF-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry</i>
MeOH	Methanol
Methoxy-PEG-NHS-Ester	O-Methyl-O'-[(N-succinimidyl)succinyl-aminoethyl]polyethylene glycol
MDR	<i>multidrug resistance</i>
min	Minuten
mRNA	<i>messenger Ribonucleinsäure</i>
Mtt	Methyltrityl
MW	Molekulargewicht
N	Asparagin
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i>
OPSS	ortho-Pyridyl-Disulfid
PAMAM	Polyamidoamin
P	Prolin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PEG	Polyethylenglycol (Polyethylenoxid)
Pgp	P-glycoprotein

PPI	Polypropylenimin
Pro	Prolin
R	Arginin
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	Ribonucleinsäure-Interferenz-Technologie
RT	Raumtemperatur
Q	Glutamin
s	Singulett
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
t	Triplett
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
V	Valin
Val	Valin
W	Tryptophan

1. Einleitung

1.1 *Multidrug Resistance* in Krebszellen

Krebs stellt zur Zeit, mit 3,2 Millionen neuen Fällen und darunter 1,7 Millionen Toten jährlich (Europa)^[1], eine der gefährlichsten Krankheiten überhaupt dar. Seit Beginn der Chemotherapie zur Behandlung von Krebspatienten, ist die dabei auftretende Resistenz der Tumorzellen gegen die eingesetzten Wirkstoffe ein großes Problem. Tumore bestehen normalerweise aus einer gemischten Population an Krebszellen, dabei ist ein Teil sensitiv und der andere resistent gegen die verwendeten Wirkstoffe^[2]. Bei einer Behandlung durch Chemotherapie werden die sensitiven Zellen getötet, wobei die resistenten überleben und ein nun resistenter Tumor entsteht. Allgemein können Krebszellen gegen einzelne Wirkstoffe, oder solche mit einem ähnlichen Wirkungsmechanismus, zum Beispiel durch die Veränderung des zellulären Ziels, Resistenzen bilden. Zusätzlich ist aber die Bildung einer Resistenz gegen mehrere Wirkstoffe gleichzeitig möglich, man spricht von der *multidrug resistance* (MDR). Die MDR ist definiert, als eine Resistenz von Tumorzellen gegenüber strukturell und funktionell nicht verwandter Chemotherapeutika^[3].

Wie in Abbildung 1 zu erkennen ist, kann die Entstehung der MDR vielfältige Gründe haben, beispielsweise die erniedrigte Einfuhr wasserlöslicher Wirkstoffe, die über den Symport durch Transportproteine mit Nährstoffen in die Zellen gelangen. Hier sind unter anderem das Folsäure-Analogon Methotrexat, die Nucleotid-Analoga 5-Fluoruracil und 8-Azaguanin, sowie Cisplatin^[4-5] zu nennen.

Allgemein kann eine MDR auch über das Blockieren der Apoptose (kontrollierter Zelltod), durch Mutationen in Zellzyklusproteinen (Einleitung einer Apoptose an sogenannten „Check Points“ im Zellzyklus möglich) oder der Veränderung des Ceramid-Gehalts^[6], entstehen.

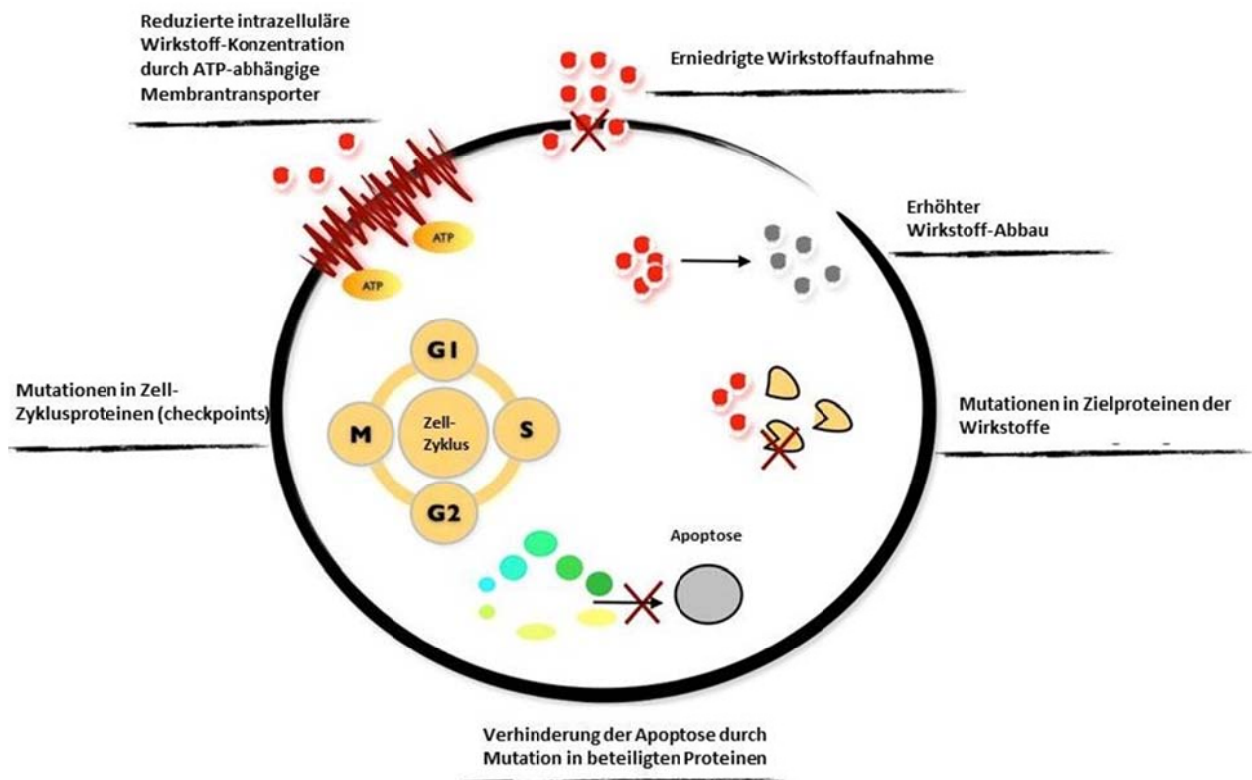


Abbildung 1: Darstellung der entscheidenden Ursachen zur Entstehung der MDR.

Die auch als klassische MDR bekannte Resistenz, entsteht durch eine Überexpression an ATP-abhängigen Membrantransportproteinen (Wirkstoff-Efflux) mit einer breiten Spezifität^[7] für verschiedene Chemotherapeutika. Dazu gehören die sogenannten Vincaalkaloide (Naturstoffe gewonnen aus Pflanzen der Gattung der Hundsgiftgewächse, die durch Depolymerisation der Mikrotubuli eine Hemmung der Mitose bewirken^[7]; darunter Vinblastin und Vincristin), die Anthracycline (Naturstoff gewonnen aus Bakterien der Gattung Streptomyces, die als Inhibitoren für die Topoisomerase 2 dienen und eine weitere Nukleinsäure Synthese verhindern^[7]; darunter Doxorubicin und Daunorubicin), sowie der RNA-Transkriptioninhibitor Actinomycin-D und der Mikrotubuli stabilisierende Wirkstoff Paclitaxel^[8]. Die beschriebenen Membranproteine gehören zu der Familie der *ATP-binding-cassette* (ABC) Transportern, welche eine sequentielle und strukturelle Homologie

aufweisen^[9]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der beschriebenen Proteine (die normalerweise der Detoxifikation dienen^[10]) dieser Familie in Tumor-Zellen zu einer Entstehung der MDR führt. Darunter das p-Glycoprotein (Pgp)^[3], sowie das *Multidrug resistance-associated proteine-1* (MRP1) und dessen Homologen MRP2-6^[11].

Einen mehr allgemeinen Schutz gegen prinzipiell alle eingesetzten Chemotherapeutika stellen die zellulären DNA-Reparatur und Detoxifikationssysteme dar. Das bedeutendste darunter ist die Cytochrom P450 Oxydase, bei welcher eine koordinierte Induktion mit Pgp festgestellt wurde^[12].

1.1.1 Die entscheidende Rolle des P-glycoprotein bei der Entstehung der MDR

Unter den oben beschriebenen Transportproteinen der ABC-Familie wird der Überexpression des P-Glycoprotein bei der Entstehung der MDR eine übergeordnete Rolle zugeschrieben, da es im Vergleich zu anderen Transportern der ABC-Familie, Resistenzen gegen das breiteste Spektrum an Chemotherapeutika auslösen kann^[13]. Bei dem Pgp handelt es sich um ein Transmembranprotein mit einer Gesamtmasse von 170 kDa, insgesamt 12 Transmembrandomänen und 2 ATP-Bindungsstellen^[14]. Man geht davon aus, dass die relativ hydrophoben Wirkstoff-Substrate direkt über die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran an Pgp binden^[8] und für den Transport die Hydrolyse zweier ATP notwendig ist^[15]. Aufgrund der hohen Pgp-Expression in normalem Gewebe der Leber, Niere, des Pankreas, sowie Endothelzellen von Gehirn und Hoden wird als physiologische Funktion des Pgp hauptsächlich die Detoxifikation von Xenobiotika und der Hormon-Transport vermutet^[16]. Weiterhin konnte bei Tumorzellen mit einer durch Pgp ausgelösten MDR die Anwesenheit von sogenannten „*double minute*“ Chromosomen festgestellt werden^[17]. Bei „*double minute*“ Chromosomen handelt es sich um extrachromosomal amplifizierte DNA-Fragmente,

die bei der Chemotherapie als Reaktion auf zellulären Stress gebildet werden und so zu einer Resistenz führen können^[18].

Als erster Schritt zur Bekämpfung der MDR wurde nach möglichen Inhibitoren des Pgp gesucht. Wegen der breiten Wirkungsspezifität des Pgp konnte bereits vor einigen Jahren eine Inhibition durch verschiedene Agentien, wie zum Beispiel dem Calcium-Kanal-Blocker Verapamil, dem Immunsuppressant Cyclosporin A, sowie diversen weiteren nachgewiesen werden^[19]. Die beschriebenen Agentien sind nicht zytotoxische Substrate des Pgp, deren Funktionsweise mit einer kompetitiven Hemmung verglichen werden können, da die Transportkapazität des Proteins bereits durch die Inhibitoren ausgelastet ist^[20-21]. Obwohl sich die Inhibitoren bei Tests *in vitro* als hocheffektiv erwiesen, konnten in klinischen Studien bis heute keine überzeugenden Ergebnisse erzielt werden. Gründe hierfür liegen in der hohen benötigten lokalen Konzentration der Inhibitoren und den damit verbundenen Nebenwirkungen, sowie an unvorhersehbaren pharmakokinetischen Interaktionen mit den Chemotherapeutika^[22-23]. Aufgrund dessen werden zurzeit weniger toxische und vor allem effektivere Methoden zu Behandlung der MDR gesucht. Darunter befindet sich auch eine neue therapeutische Strategie, basierend auf der Ribonukleinsäure (RNA)-Interferenz-Technologie (RNAi)^[24].

1.1.2 siRNA als neue, auf RNA-Interferenz basierende, Therapeutika gegen MDR

Bei der RNAi soll die Aktivität eines bestimmten Gens durch den gezielten Einsatz von RNA verringert werden und im Gegensatz zu den oben beschriebenen Inhibitoren besitzt diese Technik aufgrund ihrer Selektivität erfolgsversprechende Perspektiven für eine Anwendung zur Regulation der Expression des Pgp (und des beteiligten Gens MDR1)^[25]. In mehreren grundlegenden Studien konnte der Erfolg dieser Methode bereits bewiesen werden^[26-27].

Prinzipiell gibt es zwei Ansätze ausgehend von der RNAi, beim ersten wird sogenannte *Antisense*-Desoxyribonukleinsäure (aDNA) zur Verringerung der Expression verwendet. Abbildung 2 zeigt schematisch deren Wirkungsweise. Die aDNA ist exakt komplementär zu der *messenger*-RNA (mRNA) des stillzulegenden Gens (in diesem Fall mRNA des MDR1-Gens) und kann durch Bindung an diese, entweder einen Abbau durch die sogenannte RNaseH, oder eine sterische Blockade bewirken. Die Mehrheit der Antisense-Wirkstoffe basiert auf der Aktivierung der RNaseH^[28-29]. Bei der RNaseH handelt es sich um eine spezielle, ubiquitäre Endonuklease, welche die hydrolytische Spaltung von RNA in RNA/DNA-Duplexen bewirkt. Hauptproblem bei der Verwendung der aDNA ist die geringe Stabilität der DNA, aufgrund des intrazellulären Abbaus durch Endo- und Exonukleasen^[29].

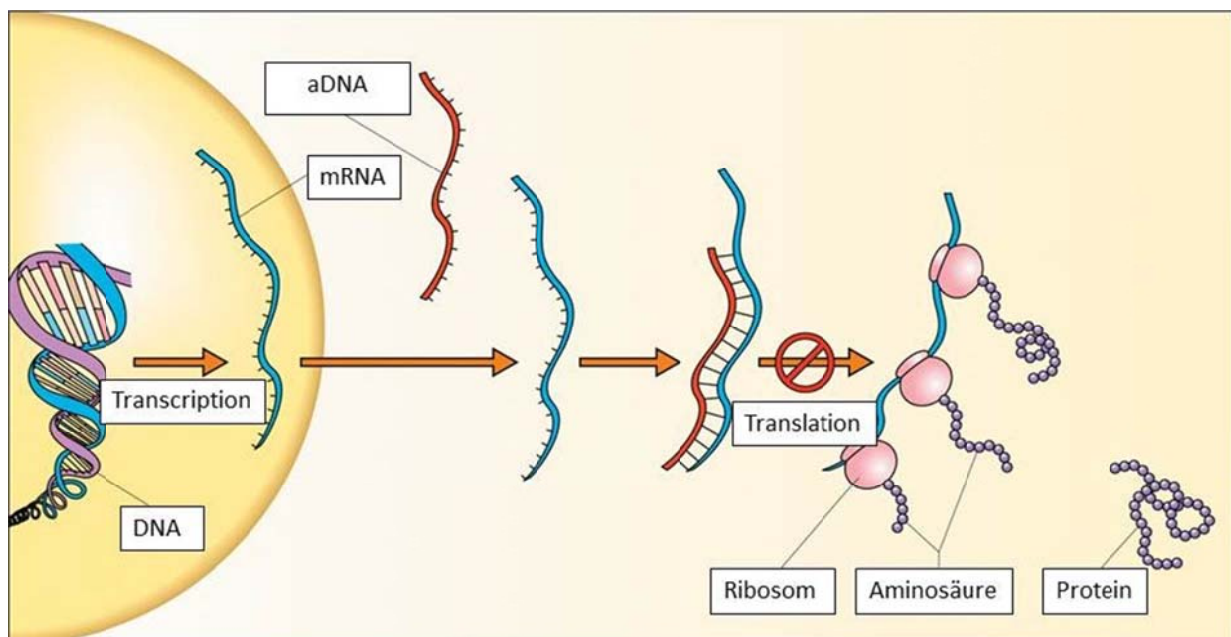


Abbildung 2: Schematische Darstellung der aDNA-Wirkungsweise^[30].

Um dieses Problem zu umgehen kann die Aktivität des MDR1-Gens, durch den Einsatz kurzer doppelsträngiger RNA-Sequenzen (dsRNA) reguliert werden. Aktuelle Studien ergeben das die Expression eines Zielgens durch Behandlung mit komplementären dsRNA unterdrückt werden kann^[31]. Abbildung 3 zeigt graphisch und in vereinfachter Form die Wirkungsweise

der dsRNA. Die dsRNA wird, nach Aufnahme in die Zelle, in kurze RNA-Stücke mit einer Größe von 21-28 Basenpaaren (siRNA, *small interfering RNA*) zerlegt und bindet zusammen mit der mRNA des zu regulierenden Gens an den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC). Die mRNA wird anschließend vom RISC in unfunktionelle Bruchstücke zerlegt^[23]. Die Verwendung von dsRNA *in vivo* löst allerdings eine starke Immunantwort aus, vergleichbar mit einer Viren-Infektion einhergehend mit einer stark gesteigerten Interferon-Produktion^[32-34]. Die direkte Verwendung von siRNA umgeht dieses Problem, da die kleinere siRNA vom Immunsystem größtenteils nicht erkannt wird^[32].

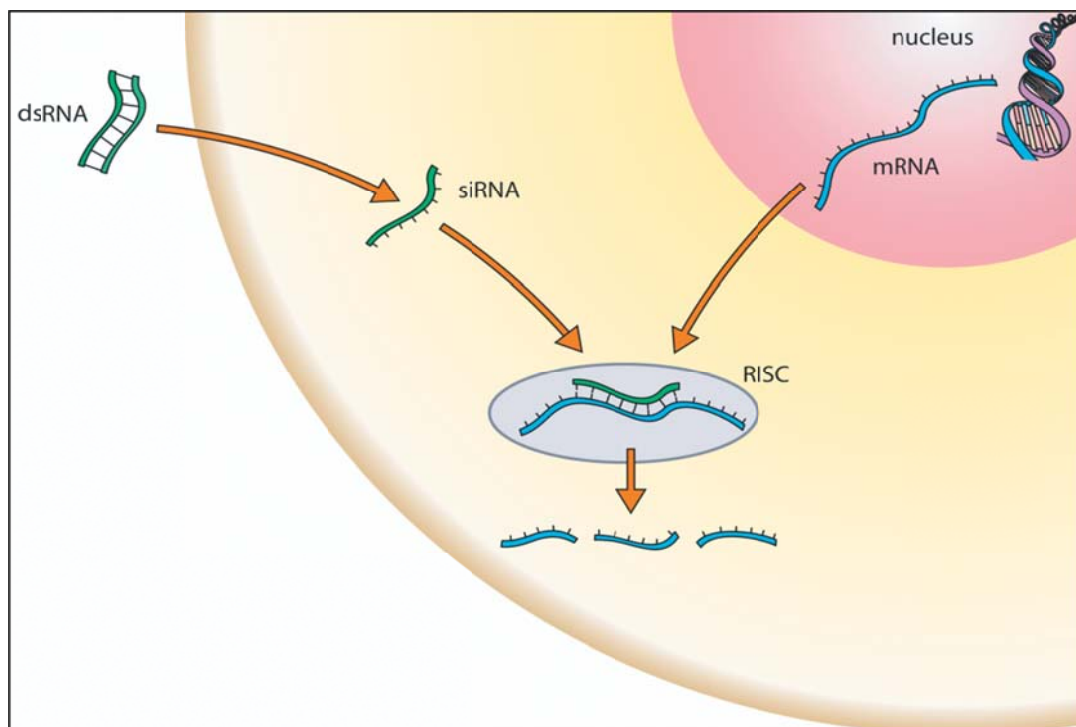


Abbildung 3: Schematische Darstellung der dsRNA-Funktionsweise^[30].

Um eine ausreichende Effektivität der eingesetzten siRNA zu gewährleisten, muss diese in das Cytoplasma der zu behandelnden Zellen transportiert werden (*gene delivery*). Im folgenden Kapitel werden die unterschiedlichen Transportsysteme und ihr Einfluss auf den effizienten Transport der siRNA diskutiert.

1.1.3 Der effiziente Transport als größtes Problem bei der Anwendung von RNAi-Therapeutika

Die Plasmamembran eukaryotischer Zellen ist für polare und wasserlösliche Substanzen, dies gilt auch für die durch das Phosphat-Rückgrat negativ geladene siRNA, nur schwer zu überwinden (mit Ausnahme von Ionen durch Transportkanäle). Deshalb wurde lange Zeit nach Substanzen gesucht die es ermöglichen Pharmazeutika über diese Barriere in Zellen zu transportieren. Dabei rückten vor allem Lipoplexe (Liposome kationischer Lipide), Nanopartikel, kationische Dendrimere und kationische Polymere (Polyethylenimin) als mögliche Transportsysteme in den Fokus. In allen Fällen findet, begründet durch Größe, Molekulargewicht und Ladung der Konjugate, eine Aufnahme über Endozytose statt^[35-36]. Zudem besitzen die beschriebenen Systeme eine relativ hohe Toxizität und eignen sich somit nur bedingt für einen Einsatz *in vivo*^[37]. Unabhängig vom gewählten Transportsystem und dem damit verbundenen endozytotischen Aufnahmemechanismus muss die siRNA das entstandene Endosom wieder verlassen können um im Cytosol der Zellen wirksam zu werden. Dies stellt zur Zeit eine der größten Herausforderungen an *gene delivery*-Systeme dar^[35].

Ein eleganter Weg diese Komplikationen zu vermeiden, ist der Einsatz von Peptiden, für welche eine direkte Aufnahme in Zellen postuliert wird^[38]. Außerdem sind Peptide im Gegensatz zu den oben beschriebenen Transportsystemen nicht toxisch und können siRNA durch die Verwendung von positiv geladenen Aminosäuren über elektrostatische Wechselwirkungen direkt binden.

1.1.4 *Cell-penetrating peptides* als Transportmoleküle

Ein großer Durchbruch war die Entdeckung kurzer Peptidsequenzen für den gerichteten Transport von Oligonukleotiden, die effektiv Zellmembranen durchqueren können^[39-40],

darunter auch das aus dem HIV-1-Virus stammende *transactivator of transcription* (Tat) Peptid. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur das komplette, sondern auch ein kurzes Bruchstück des Peptids in Zellen eindringen kann^[41]. Ausgehend von diesen Entdeckungen wurden diverse Peptidsequenzen einer neuen Subgruppe, den *cell-penetrating peptides* (CPPs) zugeordnet.

Einige CPPs wie Tat oder Penetratin (Tabelle 1) stammen aus natürlich vorkommenden Peptiden, wobei ein Großteil künstlich *designed* ist um die Eigenschaften natürlicher Systeme zu übernehmen, bzw. weiter zu verbessern. Allgemein können CPPs als kurze Peptide, bestehend aus ungefähr 10-30 Aminosäuren, beschrieben werden. Gemeinsamkeit der CPPs sind eine positive Gesamtladung bei physiologischem pH-Wert (7,4), sowie ein amphipathische Struktur^[38]. Ausnahmen hierzu bilden neue synthetische CPPs, wie zum Beispiel das aus dem *sweet arrow peptide* (SAP) basierenden CPP SAP (E), dass durch Austausch von Arginin gegen Glutaminsäure über eine negative Gesamtladung verfügt (siehe Abbildung 4).

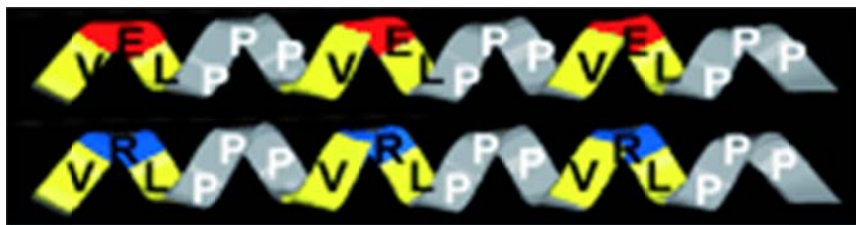


Abbildung 4: Schematische Darstellung von SAP(E) (oben) und SAP (unten), Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode.

Die beschriebene Amphiphilie wird durch das Auftreten amphipathischer α -Helices, welchen eine Rolle im Aufnahmemechanismus der CPPs zugesprochen wird^[42], verursacht. Die Aminosäuresequenz einer amphipathischen Helix wechselt nach 3-4 Aminosäuren zwischen hydrophilen und hydrophoben Resten, da eine Helix-Windung statistisch gesehen aus 3,6 Aminosäuren besteht. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass ein effektiver

zellulärer Transport diverser Peptide, Proteine bis zu 120 kDa, Oligonukleotide (aDNA, siRNA), Plasmide, Liposomen, Polymere und sogar Nanopartikel möglich ist^{[41],[43]}. Einige Beispiele hierzu sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Beispiele für *cell-penetrating-peptides*.

Name	Klasse	Ref.
Sequenz	Ursprung	
Model amphipathic peptide (MAP) KLALKLALKALKAALKLA	Künstliche Peptidsequenz Nachahmung der amphipathischen α -Helix	[43]
Penetratin RQIKIWFQNRRMKWKK	Ausschnitt eines natürlichen Peptids <i>Antennapedia</i> Transkriptionsfaktor aus <i>Drosophila melanogaster</i>	[44]
Polyarginine RRRRRRRR (R8)	Künstliche Peptidsequenz Angelehnt an Tat und Kationische Polymere	[45]
SAP(E) VELPPPVELPPPVELPPP	Künstliche Peptidsequenz Nachahmung Prolin-reicher CPPs, Austausch Arg mit Glu aus SAP (Abbildung 4)	[46]
Tat RKKRRQRRR	Ausschnitt eines natürlichen Peptids Aus HIV-1 Aminosäuren 49-57	[47]

Besonders interessant ist die Anwendung der Polyarginine, da diese eine höhere Zellaufnahmefähigkeit, als das ebenfalls Arginin-beinhaltende Tat besitzen (Vergleich mit Nonarginin)^[48]. Ein Polyarginin-Hexamer besitzt im Gegensatz dazu eine ähnliche Internalisierungsrate wie das ebenfalls sechs Arginine beinhaltende Tat^[49]. Über ihre positiven Ladungen können polykationische CPPs an negativ geladene Proteoglycane an der Außenseite von Plasmamembranen binden und so den Internalisierungsprozess einleiten^[50-51]. Deshalb kann man vereinfacht sagen, dass je höher der Arginin Gehalt in einer CPP-Sequenz ist, desto stärker ist die beschriebene Wechselwirkung und somit auch die zelluläre

Aufnahme^[46]. Ein großes Problem stellt allerdings die Ladungskompensation, der für die Internalisation wichtiger, positiver Ladungen durch negativ geladene siRNAs (Komplexe über elektrostatische Wechselwirkungen) an CPPs dar. Dieses Problem kann durch die Verwendung von negativen oder neutralen CPPs umgangen werden.

Tabelle 1 zeigt CPPs die trotz des Fehlens einer positiven Ladung zu einer effektiven Zellaufnahme führen. Dies trifft auch für das *model amphiphatic peptide* (MAP) zu^[52], das keines natürlichen Ursprungs entstammt, sondern ausschließlich eine amphipathische rechtsgängige α -Helix (siehe Text oben) nachahmen soll, da diese als Hauptgrund für die Internalisierung des Peptids ausgemacht wurde^[42]. Neben MAP gibt es auch einige Prolinreiche CPPs, die ebenfalls eine amphipathische Helix aufweisen. Prolin hat unter den 20 Aminosäuren außergewöhnliche Eigenschaften, es verleiht dem Peptid durch den Pyrolidin-Ring eine hohe Rigidität und kann durch sein tertiäres Amin nur als Wasserstoffbrücken-Akzeptor fungieren. Diese Eigenschaften führen zu einer definierten Sekundärstruktur (sogenannte *polyproline II*, *PPII*) in wässrigen Lösungen^[53]. Es handelt sich hierbei um eine linksgängige Helix mit 3 Aminosäuren pro Windung, im Gegensatz zu 3,6 in der amphipathischen rechtsgängigen α -Helix (siehe Abbildung 5). Die PPII ist im Vergleich mit der rechtsgängigen α -Helix, aufgrund fehlender Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren (Prolin kann nicht als H-Akzeptor fungieren) weniger kompakt^[54] und kann so geladene Seitengruppen in aufeinanderfolgenden Windungen besser stabilisieren^[55].

Ausgehend von dem natürlichen, kationischen CPP *sweet-arrow-peptide* (SAP, Abbildung 4, Sequenz (VRLPPP)₃), aus der N-Terminalen Domäne des γ -Zeins (gehört zu Prolaminen, Speicherproteine in Getreidesamen mit einem hohen Prolingehalt) konnte durch Austausch des Arginins gegen Glutaminsäure ein anionisches CPP, das SAP(E) (Sequenz (VELPPP)₃), kreiert werden. SAP ist ein amphipathisches Peptid, bestehend aus 50% Prolin, das in wässrigen Lösungen die oben beschriebene PPII Struktur aufweist^[53]. SAP(E) ist somit ein amphipathisches, negativ geladenes CPP, bei dem ein elektrostatischer Kontakt mit der Glykokalix von Zellen, zur Internalisation nicht notwendig ist^[46]. Es konnte gezeigt werden, dass amphipathische CPPs für den Transport von siRNA geeignet sind^[56].

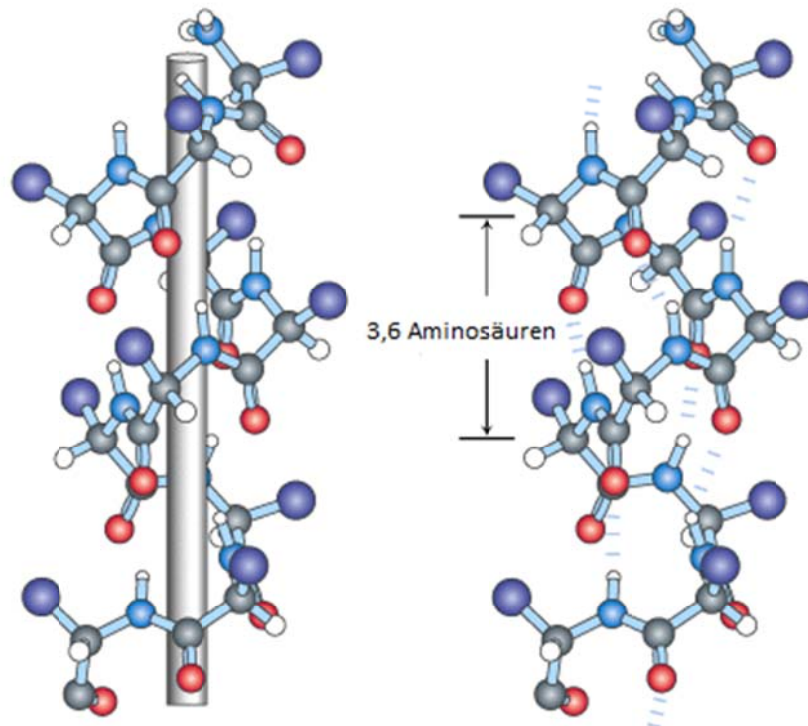


Abbildung 5: Schematische Darstellung der α -Helix mit den beteiligten Wasserstoffbrücken^[57].

1.1.5 Transport von siRNA durch CPPs

CPPs eignen sich besonders zum zellulären Transport von Oligonukleotiden, da so der endosomale Aufnahmeweg umgangen werden kann^[38]. Der Transport von Oligonukleotiden mit ungeladenem Rückgrat (zum Beispiel *peptide nucleic acids*, Nucleobasen an Peptidrückgrat gebunden^[58]) wurde auf diese Weise bereits erfolgreich durchgeführt^[59-62]. Dabei konnte der Verknüpfung von Oligonukleotid und CPP mittels reduzierbaren Bindungen (Freisetzung in reduzierendem Milieu des Cytosols) keine signifikante Erhöhung der Effektivität zugeordnet werden^[63].

Unabhängig vom Transportsystem kann siRNA entweder kovalent, oder über elektrostatische Wechselwirkungen an den Transporter gebunden werden. Hierbei ist eine nicht-kovalente Bindung zu bevorzugen, da die Aktivität der siRNA durch kovalente Verknüpfung an Trägermoleküle maßgeblich beeinflusst wird^[64]. Durch die Verwendung eines solchen nicht-kovalent gebundenen CPP-siRNA Komplexes konnte ein gesteigerter zellulärer Transport festgestellt werden^[63]. Allgemein kann die Effektivität des Transport durch die Verwendung von multivalenten CPPs weiter gesteigert werden (bivalente Wechselwirkungen um den Faktor 1000, tri- und pentavalente bis zu 10^8)^[65]. Der vermutlich größte Vorteil dieser Strategie ist der Schutz der siRNA vor Degradation durch Nukleasen, da CPP und siRNA einen stabilen Komplex bilden, die biologische Aktivität aber trotzdem nicht verloren geht^[66].

1.1.6 Aufnahmemechanismus CPPs

Da das zelluläre Ziel der siRNA im Cytoplasma der Zellen ist, spielt der beteiligte Internalisationsmechanismus der CPP-siRNA-Komplexe eine entscheidende Rolle. Der genaue Aufnahmemechanismus der CPPs in Zellen wird kontrovers diskutiert und wird von der Struktur der einzelnen CPPs stark beeinflusst^[38]. Wie in Abbildung 6 gezeigt, kann die Zellaufnahme dabei prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen: Endozytose, oder direkte Membranpermeation der CPPs durch die Lipid-Doppelschicht der Zellen.

Die Endozytose, unterteilt in Phago- und Pinozytose, ist ein Energie-abhängiger Prozess der Zellen zur Internalisierung von Flüssigkeiten und Feststoffen aus der extrazellulären Matrix dient. Die Phagozytose ist ein komplexer Prozess um große Partikel aufzunehmen, der allerdings auf spezialisierte Zellen wie Makrophagen beschränkt ist^[66-67]. Die Pinozytose hingegen ist in allen Zellen möglich und kann mechanistisch in mehrere Kategorien unterteilt werden: Makropinozytose, Clathrin-unterstützte, *lipid-raft*-unterstützte und Clathrin/*lipid-raft*-unabhängige Endozytose^[69].

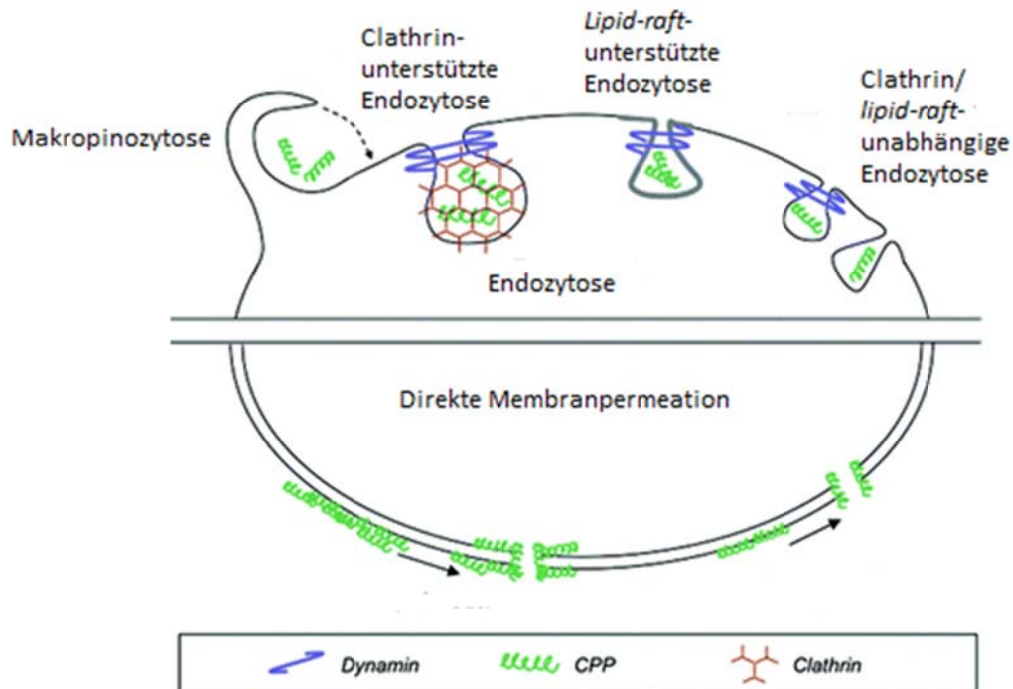


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Aufnahmemechanismen der CPPs^[41].

Die einzelnen Mechanismen der Endozytose unterscheiden sich zwar, führen jedoch zu dem gleichen Ziel, dem Einschluss des CPP mit eventueller Fracht in einem von einer Doppellipidschicht umgebenen Vesikel. Ausschlaggebend für das weitere Schicksal der Fracht ist deren Fähigkeit, das Vesikel zu verlassen, bevor es zur Zellmembran zurückwandert (Recycling der Vesikel und somit Ausschluss aus der Zelle), oder mit einem Lysosom fusioniert wird^[41] (komplette Degradation des Vesikel-Inhalts). Beide Fälle führen zu einer Verminderung der CPP-Effektivität. Der Aufnahmemechanismus ist stark abhängig vom verwendeten CPP und ebenso der Fracht. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass Tat mittels Clathrin-unterstützter Endozytose bei Kupplung an ein Protein^[70] und *lipid-raft*-unterstützter Endozytose bei Kupplung an ein Fluorophor^[71], in Zellen aufgenommen

werden kann. Im Gegensatz dazu wurde für die Aufnahme von Polyargininen ein nicht endozytotischer Aufnahmemechanismus postuliert^[48].

Diese nicht endozytotische Membran-Permeation ist ein Energie-unabhängiger Prozess, der vor allem für Peptide mit zur Lipid-Doppelschicht kompatiblen Eigenschaften (zum Beispiel amphipathische Helix) auftritt. Die in Abbildung 6 gezeigten Modelle beschreiben diese Permeation, wobei in beiden Fällen ein Anlagerung der CPPs an der Zelloberfläche stattfindet, bis die Integrität der Membran durchbrochen und eine Pore geformt wird^[72]. Man geht davon aus, dass CPPs hauptsächlich durch direkte Membranpermeation in Zellen eintreten, da eine erfolgreiche Internalisation für diverse CPPs, in der Anwesenheit von endozytotischen Inhibitoren, gezeigt werden konnte^{[47],[50],[74-82]}. Neue Studien zeigen, dass die Rolle der Endozytose in der Zellaufnahme der CPPs nicht zu vernachlässigen ist^[71-72], die Endozytose könnte somit für bestimmte CPPs ein exklusiver oder alternativer Internalisationsmechanismus sein.

2 Zielsetzung und Motivation

Ein großes Problem der modernen Krebsforschung stellt die Entstehung der MDR in Krebszellen dar. Bei der MDR entsteht in Tumor-Zellen eine unspezifische Resistenz gegen mehrere Chemotherapeutika, wobei es zahlreiche Gründe für die Entstehung dieser Resistenz gibt. Einen großen Einfluss hat das in Krebszellen stark überexprimierte Membrantransport-Protein P-glycoprotein, das für den unspezifischen Efflux strukturell nicht verwandter Zytostatika aus den Zellen verantwortlich ist. Die Unterdrückung der Aktivität des Pgp ist ein wesentlicher Schritt zur Behandlung der MDR. Es wurden bereits diverse strukturell nicht verwandte Inhibitoren für Pgp getestet. Aufgrund diverser Nebenwirkung, die den hohen Konzentrationen für eine effektive Inhibition geschuldet sind, erwies sich dieser Ansatz als bisher nicht erfolgreich. Aktuelle Untersuchungen neuer therapeutischer Strategien zur Behandlung der MDR sollen dieses Problem lösen.

Einen vielversprechenden Ansatz bietet der Einsatz von interferierender Ribonukleinsäure. Diese sogenannte siRNA bindet an komplementäre *messenger* RNA-Sequenzen des Pgp und kann so die Expression, frei von den oben beschriebenen Nebeneffekten, reduzieren. Um dieses Ziel zu erreichen ist ein effektiver Transport der siRNA, entweder kovalent oder elektrostatisch gebunden, in das Cytosol der Zellen notwendig. Aktuell werden verschiedene Transportsysteme auf ihre Wirksamkeit getestet. Hierzu gehören kationische Polymere, Dendrimere, Liposomen und Nanopartikel, welche entweder zytotoxisch, oder aufgrund ihrer Größe nur auf den endosomalen Aufnahmeweg beschränkt sind, was eine Freisetzung der siRNA in das Cytosol der Zelle erschwert. Im Gegensatz dazu wird bei CPPs eine direkte Zellaufnahme postuliert, wobei die siRNA über elektrostatische Wechselwirkungen an kationischen CPPs gebunden wird.

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist die Darstellung eines multivalenten und vollständig biokompatiblen Konjugats zum effektiven Transport von siRNA in Zellen, basierend auf der Verwendung von CPPs. Grundlegend soll das Konjugat aus den folgenden Elementen bestehen:

1. Ein Kern mit einer definierten Anzahl an funktionalisierbaren Gruppen
2. Polyethylenglycol-Reste um die biologische Halbwertszeit des Konjugats *in vivo* und *in vitro* zu erhöhen
3. Mehrere CPPs, die die Zellaufnahme ermöglichen und die siRNA elektrostatisch binden sollen

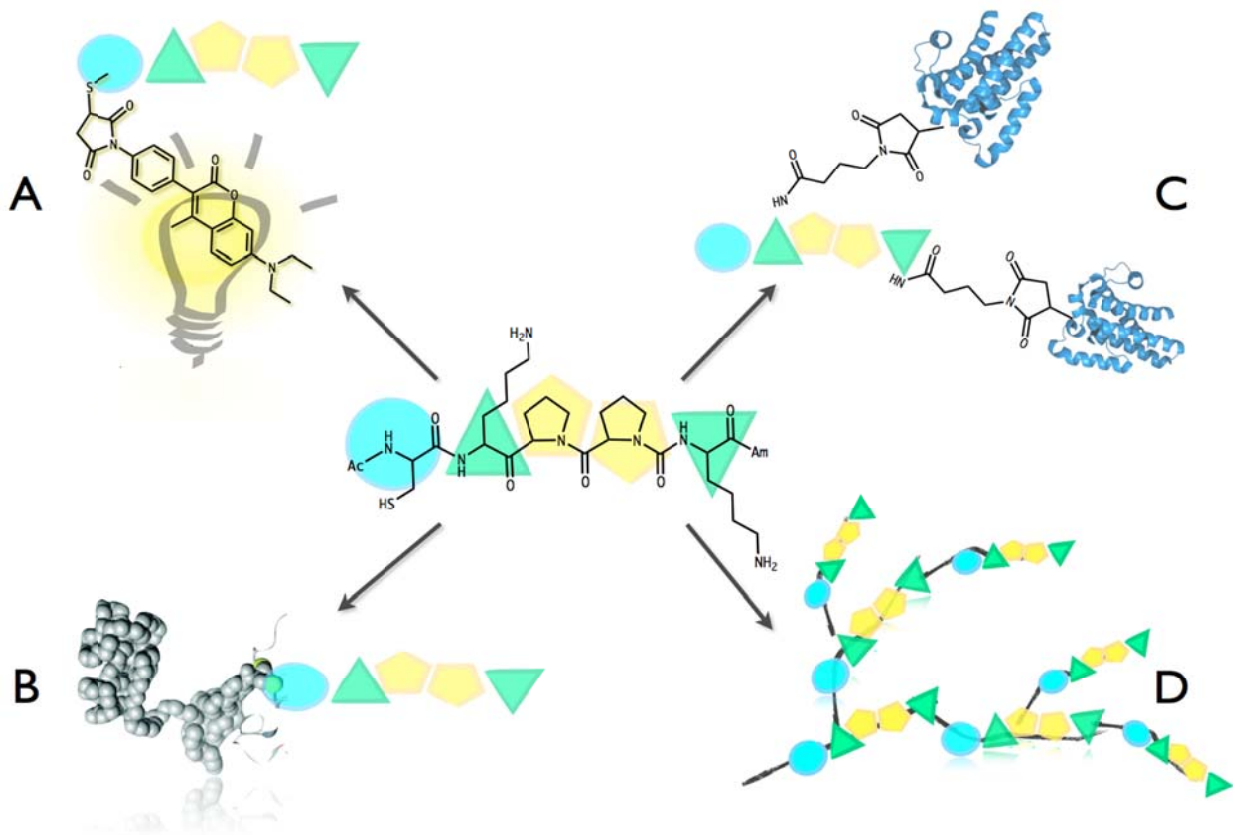


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Synthesemöglichkeiten des Peptid-Kerns; A Verknüpfung eines Fluoreszenzfarbstoffes; B Verknüpfung eines PEG-Restes; C Verknüpfung der CPPs über Linker; D Verzweigter Peptid-Kern.

Zur Herstellung des Konjugats werden zwei unterschiedliche synthetische Vorgehensweisen gewählt, um einerseits den Einfluss der multivalenten Wechselwirkungen der CPPs auf das Internalisationsverhalten des Konjugat zu untersuchen und andererseits mögliche CPPs in einem Screening zu testen. Bei einem Ziel werden Kerne aus der Dendrimer-Synthese mit

einer definierten Anzahl an funktionellen Gruppen verwendet, an welche mehrere kationische CPPs (Octaarginin, Bindung der siRNA über elektrostatische Wechselwirkungen) über Polyethylenglycol-Spacer gebunden werden. Durch multivalente Anknüpfung der CPPs kann die Bindungskonstante der Wechselwirkung mit biologischen Oberflächen im Vergleich zum monovalenten Fall um ein Vielfaches gesteigert werden (beim bivalenten Fall bis zu einer Erhöhung um den Faktor 1000, oder sogar bis zu einer Erhöhung um den Faktor 10^8 beim tri- bis pentavalenten Fall).

Beim zweiten Ansatz werden maßgeschneiderte, orthogonal geschützte Peptide verwendet, bei welchen neben der Kupplung multivalenter CPPs die Kombination kationischer und nicht kationischer CPPs möglich ist, um den Einfluss der siRNA-Bindung auf das Internalisationsverhalten der Konjugate zu untersuchen. Weiterhin werden die Konjugate durch die geschaffene Orthogonalität zusätzlich funktionalisiert, darunter z.B. die Anbringung eines Farbstoffs, zum Visualisieren der Konjugate bei Zellversuchen oder eines Polyethylenglycol-Restes, zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften und des Schutzes gegen Proteolyse (Abbildung 7). Allgemein hat man die Möglichkeit durch die Veränderung der Peptidsequenz die Struktur des finalen Konjugats in Sachen, Form, Flexibilität, sowie Anzahl und Ausrichtung der funktionellen Gruppen maßgeblich zu beeinflussen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Bei der Herstellung der Biokonjugate (siehe Kapitel 2) und der Wahl der einzelnen Komponenten (siehe Abbildung 7) müssen mehrere wichtige Voraussetzungen erfüllt werden. Neben der vollständigen Biokompatibilität müssen die Konjugate wasserlöslich sein und eine genügend große biologische Halbwertszeit besitzen, um für eine Anwendung *in vivo* oder *in vitro* geeignet zu sein. Dabei spielt besonders die Wahl des Kerns eine tragende Rolle, da er als Gerüst für weitere Reaktionen dient und somit die Struktur, sowie Funktionalität des Konjugats maßgebend beeinflusst.

Zusätzlich zum Kern ist auch ein hetero-bifunktionaler Linker (Abbildung 8) nötig, um die CPPs an den Kern zu koppeln und den Abstand zwischen diesen zu erhöhen. Die Linker müssen einerseits über eine Thiol-reaktive Gruppe, um die mit einem zusätzlichen Cystein versehenen CPPs effektiv koppeln zu können und andererseits über eine aktivierte Carbonsäure-Funktionalität zur Kupplung an den Kern (Amin) verfügen.

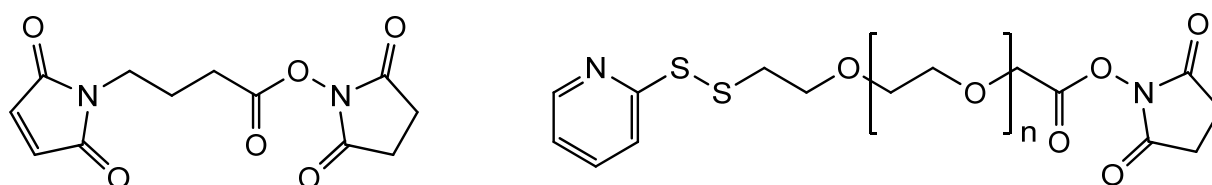


Abbildung 8: Strukturelle Darstellung der verwendeten Linker, links N-(γ -Maleimidobutyryloxy)succinimid (GMBS), rechts heterobifunktionalisierter ortho-pyridyl-Disulfid (OPSS)-PEG-N-Hydroxy-succinimid (NHS)-Ester.

Es werden zwei Linker, die mit einer N-Hydroxy-succinimid-aktivierten (NHS) Carbonsäure versehen sind, verwendet. Die oben beschriebenen Ester sind sehr reaktiv, können aber trotzdem als Zwischenstufe isoliert werden. Zur Kupplung der CPPs werden Maleimid- und

ortho-pyridyl-Disulfid-Funktionalitäten (OPSS) verwendet, auf welche in den folgenden Kapitel detaillierter eingegangen wird. Wie in Abbildung 8 zu sehen eignen sich auch funktionalisierte Polyethylenglycole als Linker zur Kupplung der CPPs an den Kern, welche dem Konjugat einige nützliche Eigenschaften verleihen können.

Bei dem Einsatz von Peptiden *in vivo* können mehrere Probleme auftreten, darunter ein kurze biologische Halbwertszeit, Immunogenität, proteolytische Spaltung und eine geringe Wasserlöslichkeit^[84]. Um diese Probleme zu vermeiden und den Schutz vor zellulären Abwehrmechanismen zu erhöhen werden eine oder mehrere Polyethylenglycol-Reste an das Konjugat gekuppelt. Die besondere Eigenschaft des PEG in wässrigen und organischen Solventien löslich zu sein, ermöglicht eine Verknüpfung der Komponenten unter milden Bedingungen. Allgemein kann die Oberfläche von Peptiden oder Proteinen durch die Kupplung von PEGs maskiert und gleichzeitig das Gesamtmolekulargewicht erhöht werden, was zu einer erniedrigten renalen Ultrafiltration sowie Erkennung durch das Immunsystem oder proteolytisch aktiven Enzymen führt^[85]. Die Gründe für diese Phänomene liegen in den besonderen Eigenschaften der Polymere. PEG kann in wässrigen Lösungen 2-3 Wassermoleküle pro Ethylenglycol-Wiederholungseinheit binden und so, zusammen mit der Flexibilität des Polymer-Rückgrades, ein 10 mal größeres Volumen als Peptide mit vergleichbaren Molekulargewichten^[84], einnehmen. Ebenso wie die Anzahl und die Lokalisation, bestimmt das Molekulargewicht der eingesetzten PEGs maßgeblich den oben beschriebenen Effekt auf das Gesamtkonjugat^[84].

Der abschließende und wichtigste Schritt bei der Konjugat-Synthese, ist die Kupplung der CPPs. Abbildung 9 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten CPPs, darunter die bei physiologischem pH-Wert mehrfach positiv geladenen Peptide Octaarginin (A) und das amphipathische MAP (B), sowie das negativ geladene, Prolin-reiche SAP(E) (C).

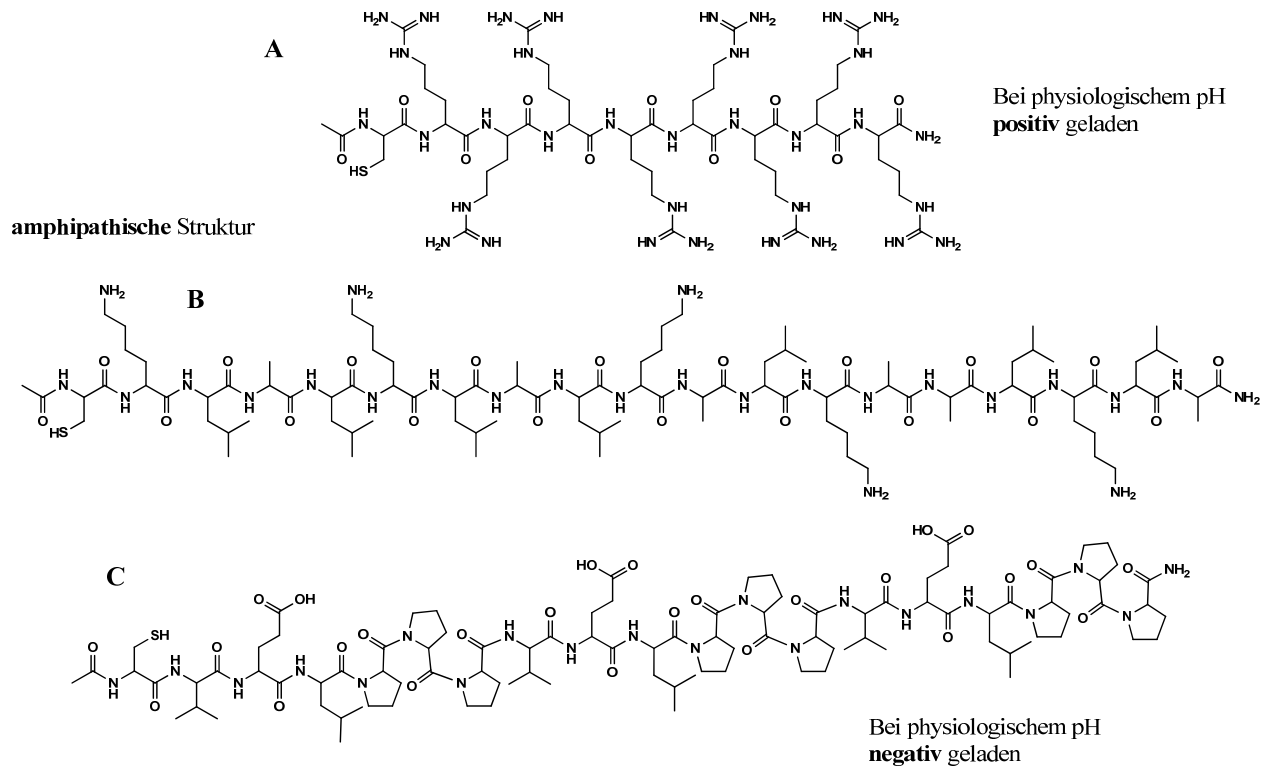


Abbildung 9: Strukturelle Darstellung der verwendeten CPPs (A Octaarginin; B MAP-Peptide; C SAP(E)-Peptid) und deren wichtige Eigenschaften.

Neben der multivalenten Kupplung des für den Transport der siRNA essentiellen positiv geladenen CPPs, soll ebenso der Einfluss der Ladungskompensation der negativ geladenen Phosphate des RNA-Rückgrats auf das Internalisationsverhalten des Konjugats untersucht werden. Dazu ist in besonderem Maße die Verwendung der negativ geladenen in Kombination mit positiv geladenen CPPs fähig, da die Internalisationsfähigkeit der negativen CPPs nicht durch eine RNA-Bindung beeinflusst werden kann^[86].

Im folgenden Abschnitt wird nun die Synthese des symmetrischen multivalenten CPP-Konjugats detailliert beschrieben.

3.1 Biokonjugat mit dendritischem Kern

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses der Multivalenz auf das Internalisationsverhalten der hergestellten Konjugate. Um dies zu erreichen wird ein möglichst einfaches und symmetrisches System, mit Kern-Molekülen die bereits für die Dendrimer-Synthese eingesetzt wurden^[87], verwendet. Diese Moleküle liefern eine definierte Anzahl funktionalisierbarer Gruppen und dienen somit als Gerüst für weitere Derivatisierungen. An den gewählten Kernen werden im nächsten Schritt alle funktionellen Gruppen mit polydispersen, heterobifunktionellen PEG-Linkern eines Molekulargewichts von etwa 2000 g/mol versehen, an welche die Anbringung der CPPs erfolgen kann. Durch die flexiblen PEG-Ketten soll einerseits die gleichzeitige Ausrichtung der CPPs zu biologischen Oberflächen ermöglicht und andererseits die Wasserlöslichkeit, der Schutz gegen zelluläre Abwehrmechanismen sowie die biologische Halbwertszeit des Konjugats erhöht werden. Die CPPs sollen mittels reversibler Disulfid-Bindungen an das Konjugat gebunden werden. Bei Anwendungen von Disulfiden *in vivo* oder *in vitro* kann der CPP/siRNA-Komplex durch Spaltung der Bindung im reduzierenden Milieu des Cytosols der Zellen (beteiligtes Enzym Thioredoxin^[88]) freigesetzt werden^[89]. Durch diesen Prozess kann die siRNA leichter freigesetzt werden, da proteolytisch aktive Enzyme die CPPs in ihre monomeren Bausteine aufspalten (Spaltung im Konjugat aufgrund der mehrfach gekoppelten PEG-Reste unwahrscheinlich).

Zur Synthese des beschriebenen Konjugats liefern Dendrimer-Kerne einen guten Ausgangspunkt. Neben einer definierten Anzahl funktioneller Gruppen, besitzen sie außerdem eine geringe Zytotoxizität^[90]. Abbildung 10 zeigt zwei mögliche 4-fach funktionalisierte Kerne, darunter die Polyamidoamin- (PAMAM) sowie die Polypropylenimin-Dendrimere (PPI).

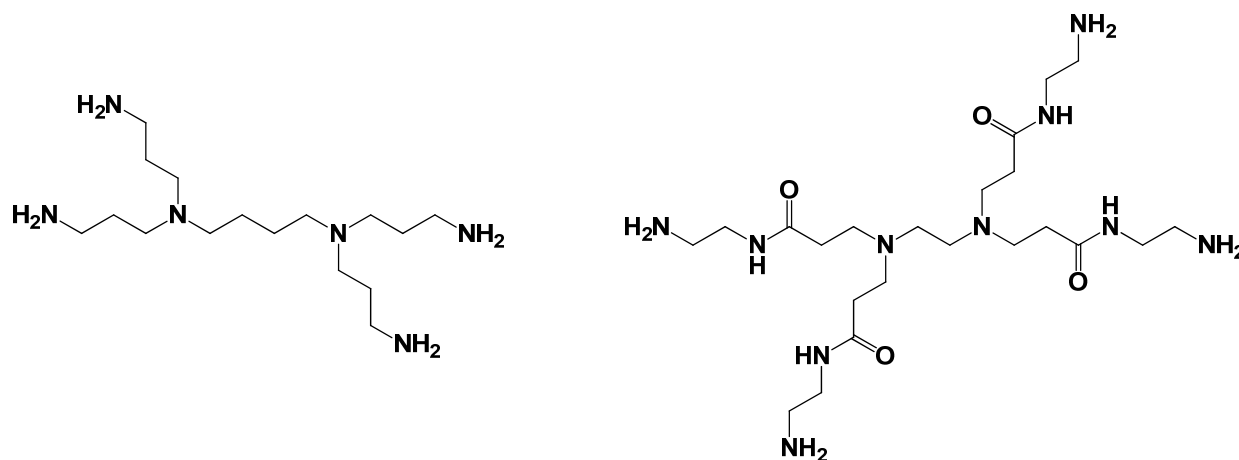


Abbildung 10: Strukturformeln 4-fach funktionalisierbarer PPI- und PAMAM-Dendrimere.

Allgemein besitzen PAMAM-Dendrimere *in vitro* eine relativ geringe Toxizität^[90], wobei diese stark von der Größe und somit der Generation abhängig ist. Dies gilt für PAMAM^[91] und PPI-Dendrimere^[92] gleichermaßen. In dieser Arbeit werden Dendrimere der Generationen G₀ und G₁ mit insgesamt vier Endgruppen (Amine) verwendet. Da im ersten Schritt flexible heterobifunktionelle PEG-Ketten (dienen auch als Spacer zwischen den CPPs) an den Kern gekuppelt werden, wird der deutlich kleinere (ein PAMAM-Dendrimer der ersten Generation hat eine mehr als viermal größere Molekülmasse als ein PPI-Dendrimer gleicher Generation^[87]) und einfachere PPI-Kern (siehe Abbildung 10) verwendet.

3.1.1 Synthese des Dendrimer-PEG-Konjugats

Aufgrund der hohen Anforderungen an Charakterisierung und Aufreinigung der vierfach funktionalisierten Konjugate wurde zur Untersuchung der Reaktionsbedingungen der PEG-Kupplung eine Modellverbindung **1** aus PPI-Kern mit 4 monofunktionellen PEG-Resten eines Molekulargewichts von 2000 g/mol (monofunktionelles NHS-PEG) dargestellt (siehe Abbildung 11).

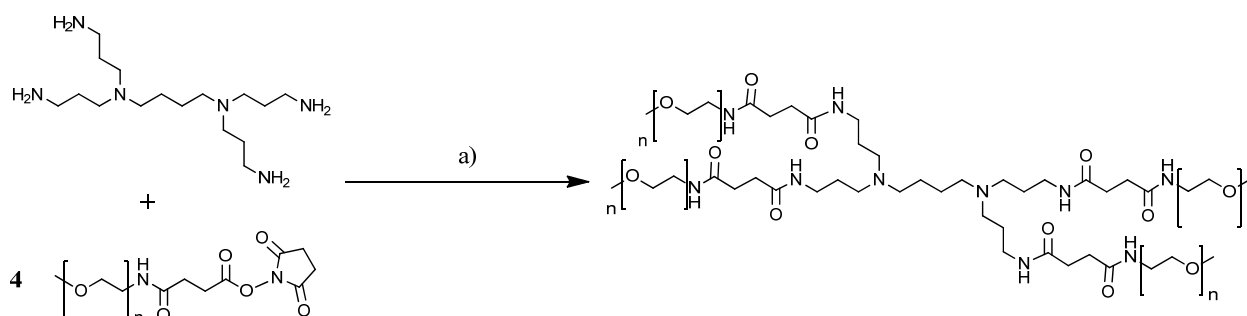


Abbildung 11: Reaktionsgleichung für die Synthese der Modellverbindung 1; a) RT, 24 Stunden, DCM, 4 eq Triethylamin.

Die Kupplungs-Reaktion (Abbildung 11) von **1** wurde in Dichlormethan mit Behandlung der Amine des PPI-Kerns durch Triethylamin durchgeführt und das Produkt aus Diethylether gefällt. Da das PEG-Edukt in einem achtfachen Überschuss eingesetzt wurde ist eine anschließende Aufreinigung von Nöten, bei welcher sich aufgrund der deutlichen Größenunterschiede zwischen PEG-Edukt (2000 g/mol), Produkt (8400 g/mol) und möglichen Nebenprodukten (2400, 4400 und 6400 g/mol) eine Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) anbietet. Da die einzelnen Polymerketten allerdings polydispers sind und PEG keine UV-Aktivität zeigt wurde eine automatisierte *recycling*-GPC mit refraktärem Detektor, Chloroform als mobile und Polystyrol als stationärer Phase durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mittels *matrix-assisted-laser-desorption-ionisation time-of-flight* Massenspektrometrie (MALDI-ToF-MS) analysiert. Abbildung 12 zeigt die Produktfraktion, bei der trotz der Kupplung der 4 polydispersen Polymerketten eine gute Auflösung erzielt werden konnte. Auf dem gezeigten Spektrum ist eine Verteilung der PEG-Wiederholungseinheiten mit den jeweiligen Signalen für Natrium- und Kalium-Addukte von **1** zu sehen. Die ermittelte Masse von 8368,56 g/mol für das Natrium-Addukt stimmt mit der erwarteten von 8368,03 g/mol ($n=43$) nahezu überein (siehe hierzu Kapitel 5.3.2.1 im Experimentalteil).

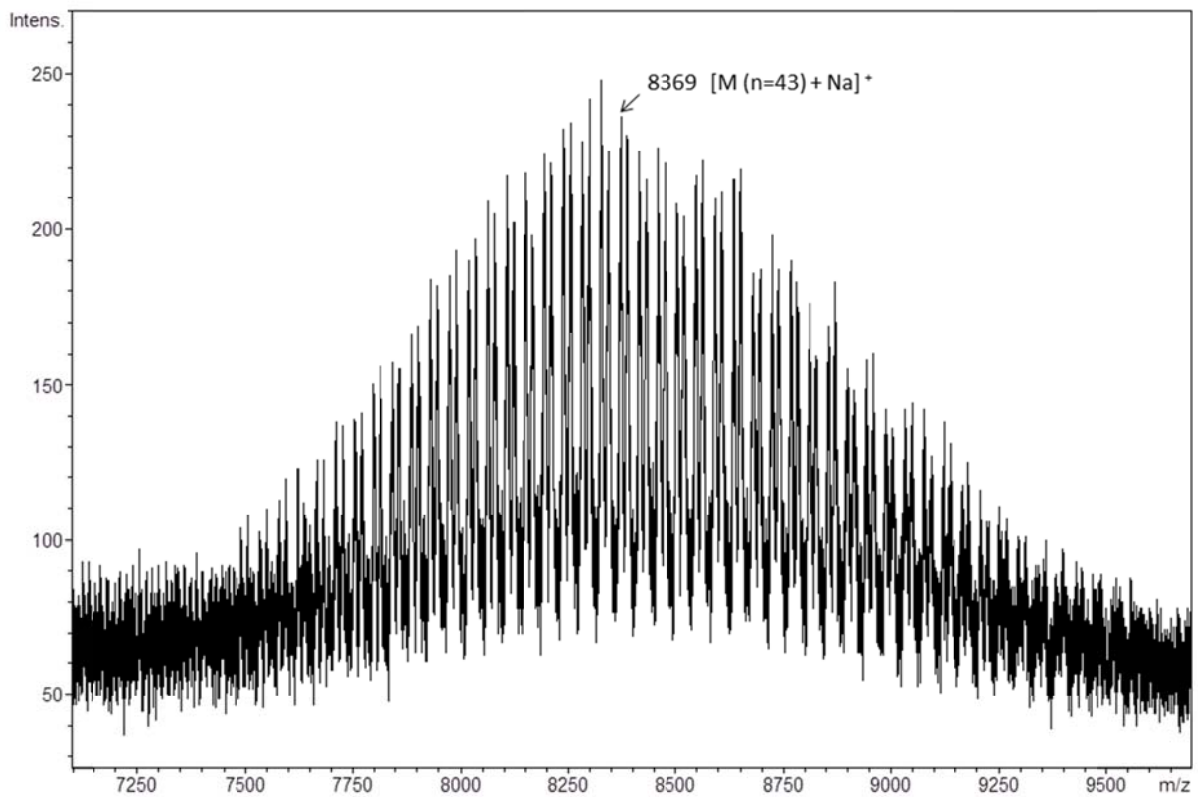


Abbildung 12: MALDI-ToF-MS-Spektrum der Produktfraktion nach der Aufreinigung von 1.

Das Produkt **1** (Abbildung 11) wurde in einer Ausbeute von 32% (48 mg) erhalten und neben MALDI mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die ^{13}C -NMR-Spektren (Abbildung 13) von PEG-Edukt und **1** (Abbildung 11) sind ein zusätzlicher Strukturbeweis der Modellverbindung **1**. Die chemische Verschiebung der zu den C-Atomen der Polymerkette gehörenden Signale bei 70 (a) und 59 ppm (b) ist bei Produkt und Edukt erwartungsgemäß gleich. Im Gegensatz dazu sind die intensiven Signale bei 169,7 (c) und 26,1 ppm (d), gehörend zu den C-Atomen der NHS-Abgangsgruppe des PEG-Edukts, im Produkt-Spektrum nicht zu sehen (Reaktion mit Amin des PPI-Kerns).

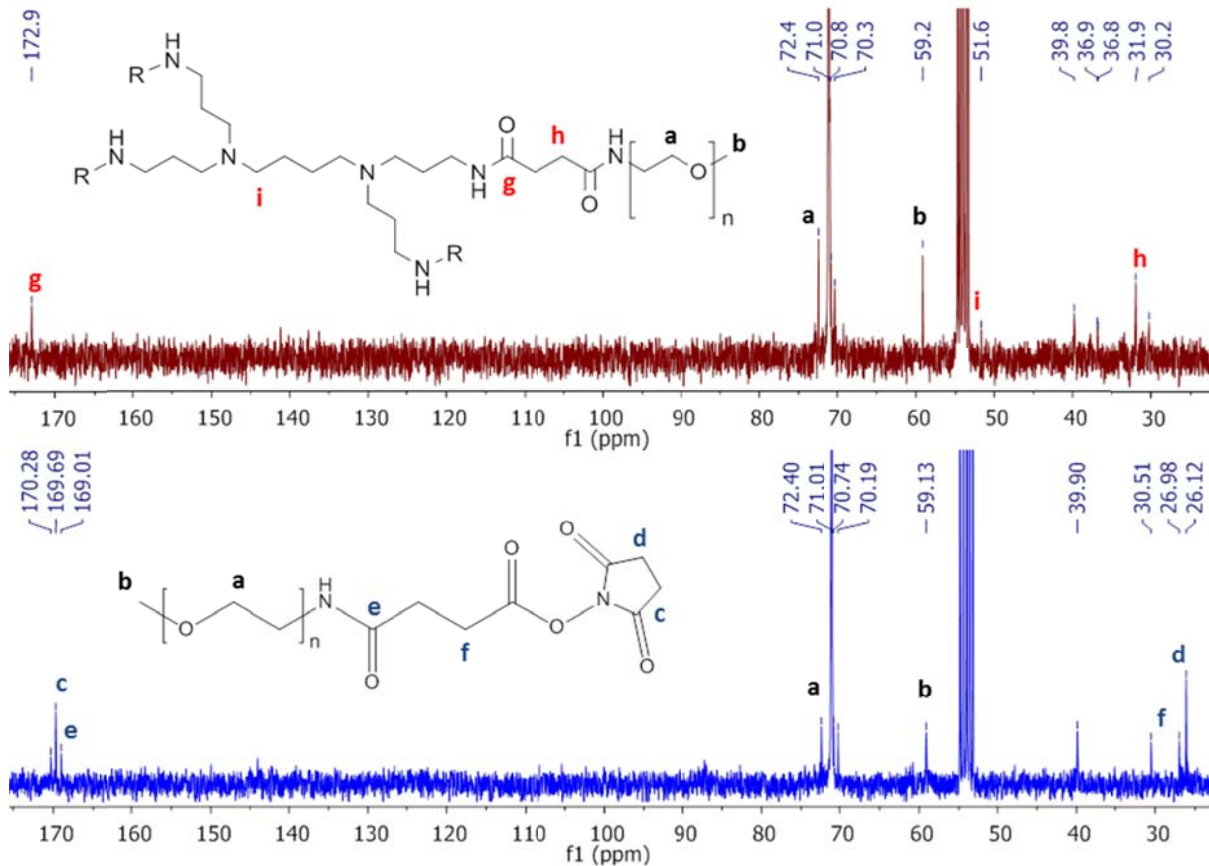


Abbildung 13: ^{13}C -NMR-Spektren des PEG-Edukts (blau) und des Produkts **1** (rot).

Eine Signal-Verschiebung (Vergleich Edukt zu Produkt **1**) ist besonders bei den Kohlenstoffatomen in direkter Nähe zur NHS-Abgangsgruppe zu sehen, darunter die Signale der carbonylischen C-Atome bei 170,3 und 169 ppm (e), sowie der aliphatischen C-Atome bei 30,5 und 27 ppm (f). Aufgrund der geknüpften Amid-Bindung sind für diese C-Atome nur noch zwei Signale (Struktur nun chemisch nahezu gleich) im Produktspektrum bei 172,9 (g) und 31,9 ppm (h) zu sehen. Zusätzlich mit den Signalen des PPI-Kern bei 30,2, 35,8, 35,9 und 51,6 ppm (i) wurde die Struktur des Produktes **1**, unter Zuhilfenahme des ^1H -NMR-Spektrums (siehe Kapitel 5.3.2.1) vollständig charakterisiert.

Ausgehend von den synthetischen Bedingungen der Modellverbindung **1** wurde nun die Synthese von **2** (Abbildung 14) aus PPI-Kern mit 4 heterobifunktionellen OPSS-PEG-NHS-Estern (Molekulargewicht von 2000 g/mol), ebenfalls mit einer Aufreinigung durch *recycling*-GPC, durchgeführt.

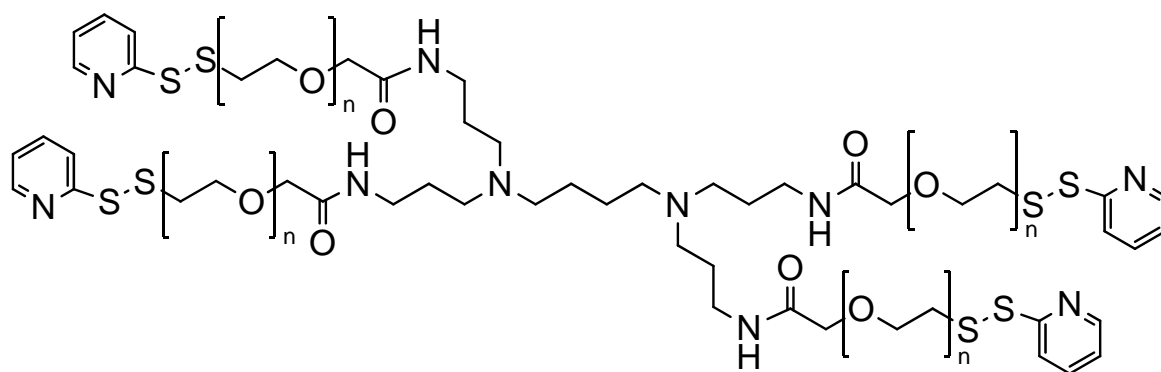


Abbildung 14: Strukturformel der 4 armigigen OPSS-funktionalisierten PPI-Kerns **2**.

Die Modellverbindung **1** wurde als Vergleich (für Reaktionsbedingungen, Aufreinigung und Charakterisierung) zum Produkt des bifunktionellen PEGs synthetisiert, da dieses schwer zu charakterisieren ist, da bereits MALDI-ToF Messungen (Reflektormodus) des bifunktionellen Edukts nur mit einer schlechten Auflösung und Intensität erhalten werden konnten. Dies wurde im folgenden MALDI-ToF-Spektrum (Abbildung 15), das die gesammelten Fraktionen der GPC zeigt, bestätigt. Die Messungen wurden im linearen Modus mit starker Laserbestrahlung durchgeführt um eine höhere Intensität (kein Signal im Reflektormodus, allerdings schlechtere Auflösung im linearen Modus) zu erhalten. Gründe für die schlechte Detektierbarkeit von **2** können ein höherer PDI der Polymerketten sowie Zerfallsprozesse der OPSS-Funktionalitäten durch die Laserbestrahlung sein.

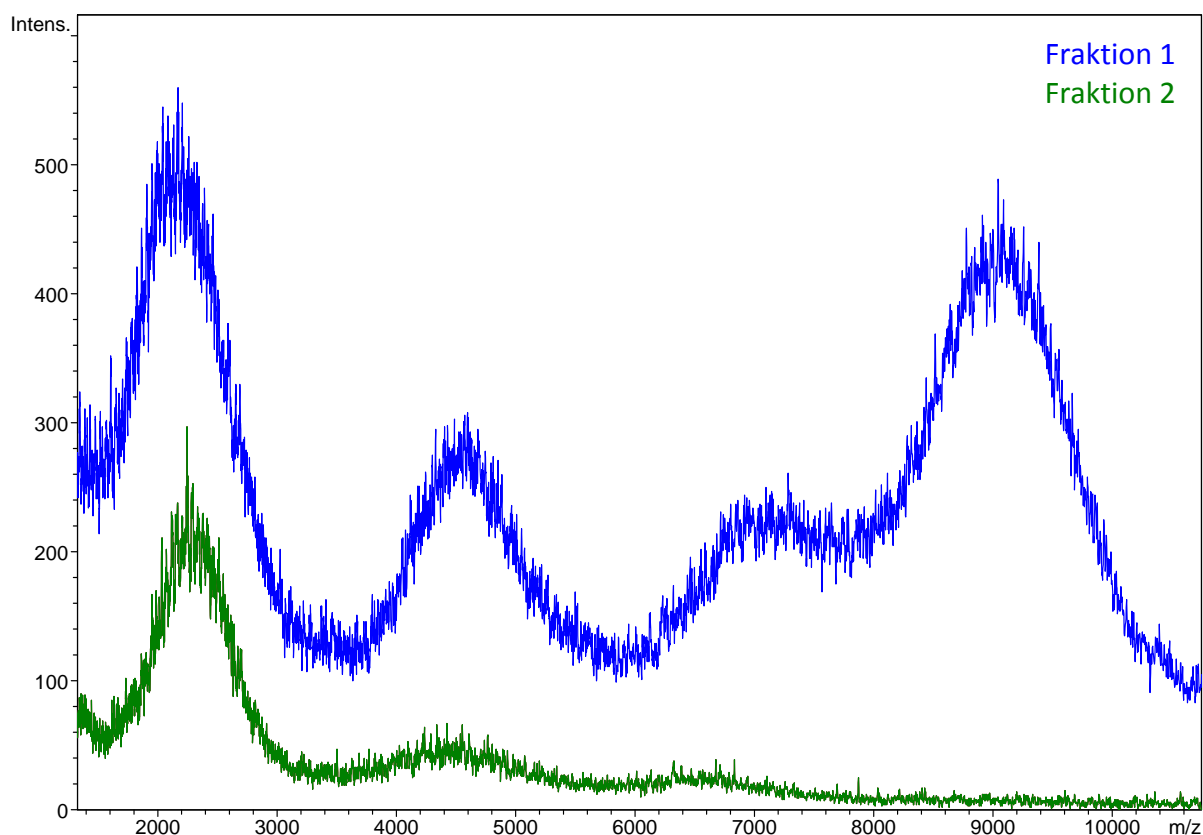


Abbildung 15: MALDI-ToF-MS-Spektrum der recycling-GPC-Fractionen von **2**.

Fraktion 2 kann als das eingesetzte PEG-Edukt (2000 g/mol) identifiziert werden. Fraktion 1 beinhaltet hauptsächlich das 4-fach substituierte (8400 g/mol) **2**, wobei das Auftreten der Signale in den Bereichen bei 4000 und 6000 m/z durch Abspaltung einzelner PEG-Ketten aufgrund der hohen Laserleistung erklärt werden kann (kein Edukt in der Produktfraktion 1, siehe Diskussion $^1\text{H-NMR}$ Abbildung 16). Anhand dieses Spektrums lässt sich allerdings keine qualitative Aussage über die Reinheit des Produkts **2** machen. Dies soll durch das folgende $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 16) von Fraktion 1 gezeigt werden.

Das Spektrum zeigt ein Signal bei 4 ppm (**a**) für die ursprünglich zum NHS-Ester (nun Amid) α -ständigen Protonen (bei PEG-Edukt bei 4,5 ppm gefunden), dieses ist im Produktspektrum von **2** auf Grunde der geknüpften Amid-Bindung Hochfeld-verschoben.

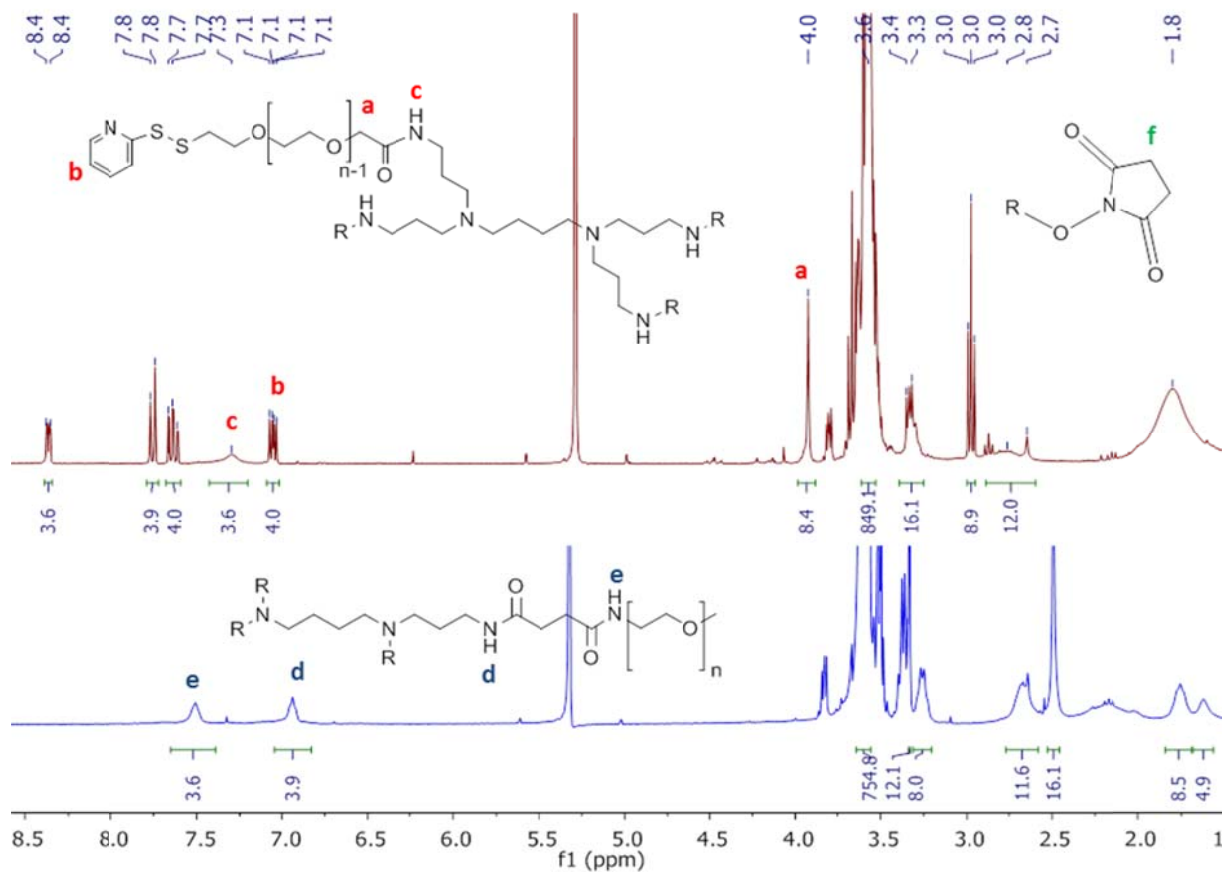


Abbildung 16: ¹H-NMR-Spektren des Produkts 2 (rot) im Vergleich zur Modellverbindung 1 (blau).

Zur Zuordnung der amidischen Protonen wurde mit dem ¹H-Spektrum der Modellverbindung 1 verglichen. 1 besitzt aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit des PEG Edukts (siehe Abbildung 11) zwei Amid-Signale (d und e), 2 besitzt im Gegensatz dazu nur ein Amid-Signal bei 7,3 ppm (c). Durch Vergleich der Integrale der aromatischen Protonen der Pyridyl-Schutzgruppe bei 7,1 ppm (b) mit den amidischen Protonen bei 7,3 ppm (c) konnte eine vierfache Substitution bestätigt werden. Das bei 2,8 ppm zu erwartende Signale für die NHS-Gruppe des PEG-Edukts (f) ist in dem Spektrum nicht zu sehen. Eine Verunreinigung durch überschüssiges Edukt kann somit ausgeschlossen werden. Das 4-fach substituierte Produkt der Reaktion des PPI-Kerns mit dem heterobifunktionellen PEG 2 konnte in einer Ausbeute von 33% (28,2 mg) erhalten und mittels Vergleich der ¹H-NMR-Spektren von Modellverbindung 1 und Produkt 2 charakterisiert werden.

3.1.2 Kupplung der CPPs an das Dendrimer-PEG-Konjugat

Der abschließende und wichtigste Schritt dieses Projekts war die multivalente Kupplung der CPPs, welche zur Verknüpfung an den Kern mit einem zusätzlichen Cystein versehen wurden, wobei die Reaktion durch die OPSS Abgangsgruppe beschleunigt wird und ohne weitere Aktivierung möglich ist (Abbildung 18). Für dieses Konjugat eignet sich in besonderem Maße die Verwendung von dem unter physiologischen Bedingungen mehrfach positiv geladenem Octaarginin, bei welchem eine effektive Zellaufnahme bei gleichzeitiger elektrostatischer Bindung der siRNA postuliert wurde^[63]. Die Reaktion des 4 armigen Kerns mit einem Überschuss an Octaarginin zu Herstellung des finalen Konjugats **3** (Abbildung 17) wurde ohne weitere Aktivierung in *phosphate-buffered-saline*-Puffer (PBS-Puffer), mit anschließendem Fällen aus Diethylether, durchgeführt.

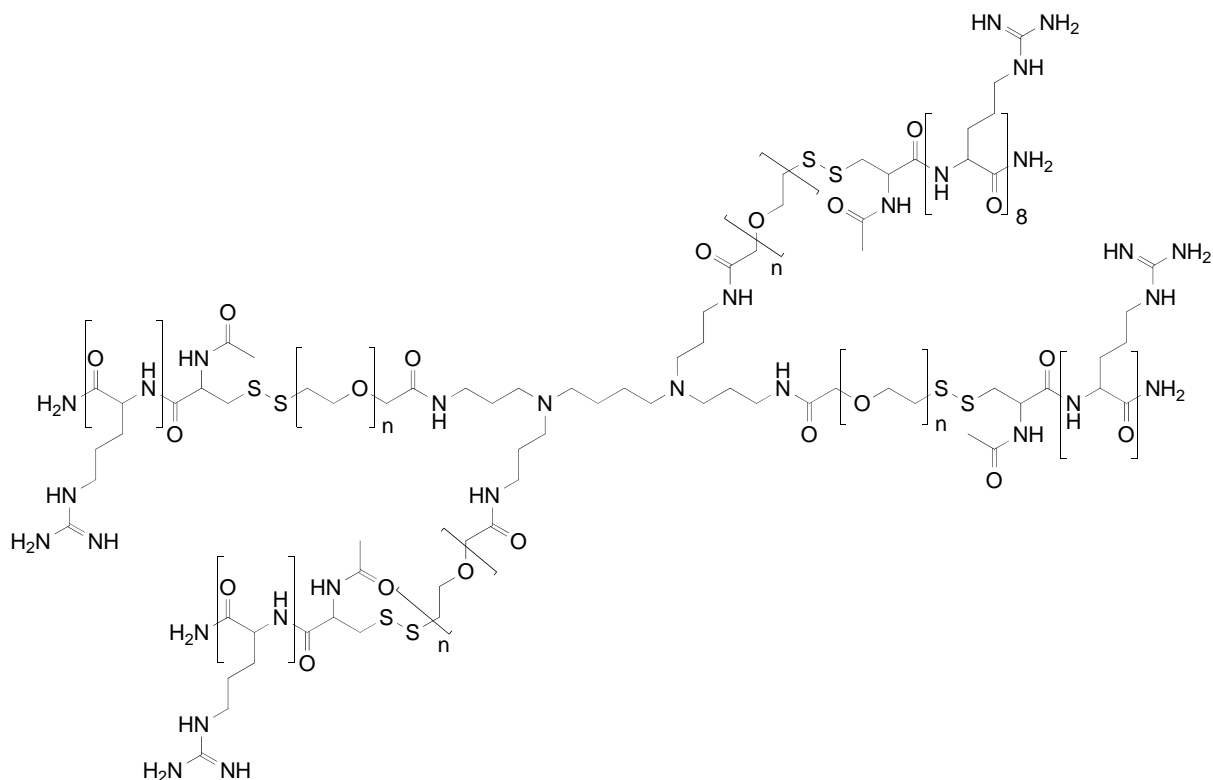


Abbildung 17: Strukturformel der 4 armigen CPP-PEG-Addukts **3**.

Das nach Abbildung 18 aus der OPSS-Abgangsgruppe entstehende Pyridinthion kann durch seine UV-Absorption bei 343 nm^[64] mittels reversed-phase-high-pressure-liquid-chromatographie (RP-HPLC) als Reaktionskontrolle verfolgt werden.

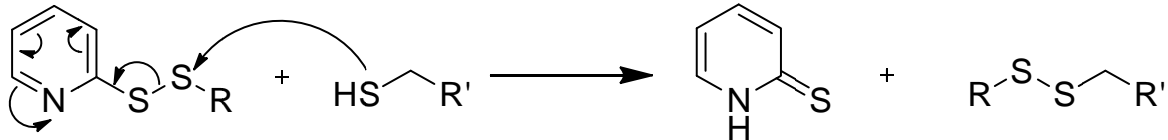


Abbildung 18: Strukturelle Darstellung des Reaktionsverlaufs zur Entstehung des Pyridinthions.

Ein Problem bei der Reaktion ist die Neigung der Octaarginine zur Dimerisierung unter Bildung einer Disulfid-Brücke und der damit verbundenen Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts zu Gunsten der Edukte. Um dem entgegen zu wirken und die Reaktion zu vervollständigen wurde jeweils nach 48 und 72 Stunden zusätzliches Octaarginin zugegeben. Abbildung 19 zeigt das Gel einer *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis* (SDS-PAGE) des in Diethylether ausgefällten Reaktionsproduktes **3** und der zum Vergleich verwendeten Edukte (Tabelle 2).

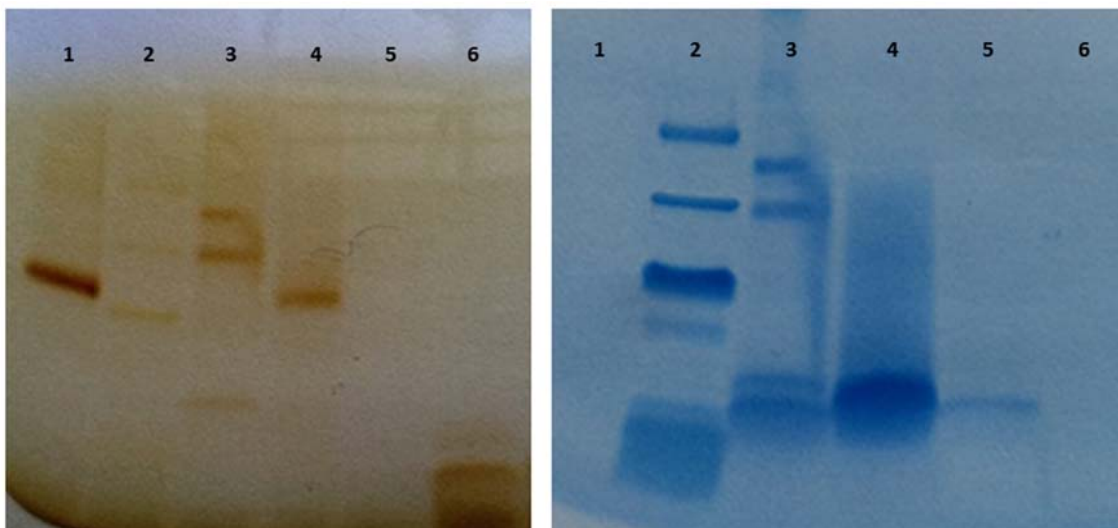


Abbildung 19: SDS-Gele zur Untersuchung der Reaktion des 4-arm OPSS-Dab-Am-4-Addukts mit Octaarginin nach; links selektives Färben des PEG, rechts der Peptide.

Tabelle 2: Tabellarische Auflistung der Inhalte der einzelnen Gelkammern.

Gelkammer	Probe
1	4-arm OPSS-PEG-Addukt 2
2	Protein-Standard 1,400-26,600 g/mol
3	Reaktionsprodukt 3
4	3 reduziert durch Dithiothreitol (DTT)
5	Octaarginin
6	OPSS-PEG-NHS-Ester (2000 g/mol)

Die exakt gleich beladenen und vorgefertigten Tricin-Gele wurden unter gleichen Bedingungen für 90 min bei einer Spannung von 125V (ermöglicht bestmögliche Trennung bei dem verwendeten Gel-System) betrieben. Selektive Anfärbung der Peptide erfolgte auf dem linken Gel durch eine Lösung von Coomassie-Blue, auf dem rechten Gel wurden die PEG-Reste selektiv durch Behandlung mit einer Bariumiodid-Lösung (siehe 5.2) angefärbt. Dabei tritt die Färbung der PEGs durch Bildung eines Komplexes mit Bariumiodid auf^[93-94]. Ein Vergleich der Gelkammern 1 und 6 unterstützt noch einmal die Annahme der 4 fachen Substitution des PPI-Kerns, da die Bande in Kammer 1 (erwartetes Molekulargewicht von 8000 g/mol) im Vergleich zu 6 deutlich höher liegt und keine weiteren Banden für geringer substituierte Produkte in 1 gefunden wurden. In Kammer 3 (finales Produkt) sind zwei Banden, die aufgrund der Peptid-Kupplung größer erscheinen, zu sehen. Aufgrund des Fehlens der Banden für das 1-fach und 2-fach gekuppelte Reaktionsprodukt (Octaarginin an **2**), kann bei den zu sehenden Banden von dem 3- und 4-fach gekuppelten Produkten ausgegangen werden. Die Kupplung der Peptide in Gelkammer 3 kann zudem im rechten Gel durch Anfärben der Octaarginine bestätigt werden. In 4 wurde das Reaktionsprodukt durch Behandlung mit DTT reduziert. Aufgrund der reduktiven Spaltung der Disulfide zwischen Octaarginin und PEG ist im Gel links nur noch eine Bande mit gleicher Größe zu dem 4-arm

PEG-Addukt in Kammer 1 zu sehen. Eine Anfärbung der Peptide dieser Kammer im rechten Gel zeigt lediglich eine starke Bande für das Octaarginin (Vergleich mit Kammer 5).

Eine mehrfache Kupplung der CPPs an den 4-armigen PEG-PPI-Kern konnte mittels dieser SDS-PAGE bewiesen werden, eine Aufreinigung der unterschiedlich Funktionalisierten Produkte war im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr möglich.

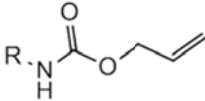
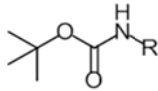
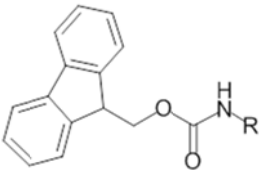
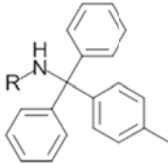
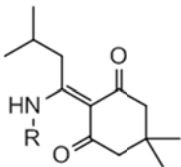
3.2 Biokonjugat mit Peptid-Kern

Im ersten Abschnitt wurde die Synthese eines multivalenten Konjugats auf Basis von Dendrimer-Kernen beschrieben. In diesem vereinfachten Fall wurde der Fokus rein auf die Multivalenz der Konjugate gelegt. Wie schon in Kapitel 1.1.4 beschrieben stellt die Ladungskompensation der positiv geladenen CPPs in Komplexen mit siRNA (negativ geladen) ein großes Problem dar, weil die positive Ladung der CPPs für die Internalisation der Konjugate wichtig ist^[50-51]. Ein möglicher Lösungsansatz ist hierbei die Kombination von kationischen mit ungeladenen oder negativ geladenen CPPs. Eine Synthese eines solchen gemischten Konjugats ist mittels des im vorigen Kapitel beschriebenen symmetrischen Syntheseansatzes allerdings nicht möglich, da dort jeweils nur eine Art von CPP gekoppelt werden kann.

Aus diesem Grund wurden maßgeschneiderte Peptide, welche mit orthogonal geschützten funktionellen Gruppen versehen sind, verwendet. Diese Peptide haben eine definierte Anzahl an funktionalisierbaren Gruppen, die unabhängig voneinander zugänglich sind und so mit weiteren für die Gesamtfunktionalität des Konjugats wichtigen Komponenten versehen werden können (PEG oder Farbstoff, siehe Abbildung 7).

Im Gegensatz zu dem PPI-Konjugat werden die CPPs über kurze heterobifunktionelle Linker (Abbildung 8 links) an das Peptidrückgrat angebunden. Diese Linker besitzen neben dem bereits beschriebenen NHS-Ester eine Thiol-reaktive Funktionalität, ein Maleimid (Michael-Additions-System), das nach Kupplung eines Thiols unter physiologischen Bedingungen und somit *in vivo* und *in vitro* stabil ist^[95]. Aufgrund der vielen, unter ganz unterschiedlichen Bedingungen abgespaltenen Schutzgruppen (Tabelle 3), eignet sich Lysin besonders zur Anbringung der Linker und somit der CPPs, da die so geschaffene Orthogonalität die Kupplung verschiedener CPPs ermöglicht.

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung von Amin-Schutzgruppen, die zum Schutz von Lysinen (Seitenketten) verwendet werden

Schutzgruppe	Struktur	Abspaltung
Alloc (Allyloxycarbonyl)		Pd (0) ^[96]
Boc		50 % TFA ^[97]
Fmoc (Fluorenylmethoxycarbonyl)		20 % Piperidin ^[98]
Mtt (Methyltrityl)		1 % TFA ^[99]
ivDde (siehe Abkürzungen)		2 % Hydrazin ^[100]

Die Synthese des Kerns wurde ausgehend von der Sequenz Cys-Lys-Pro-Pro-Lys (CKPPK, Abbildung 20), mit Veränderung der einzelnen Schutzgruppen von Cystein und Lysinen durchgeführt. Die in der Peptidsequenz eingesetzten Proline dienen als Spacer zwischen den Lysinen (an denen die CPPs gekuppelt werden) und verleihen dem Kern zusätzliche Rigidität (siehe Kapitel 1.1.4).

Das Peptid wurde mit der Peptid-Festphasensynthese (*solid-phase-peptide-synthesis*, SPPS) nach Merrifield hergestellt^[101].

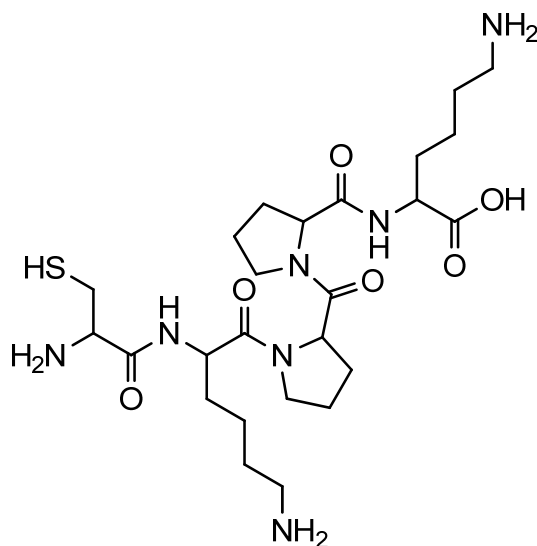


Abbildung 20: Strukturformel der verwendeten Peptidsequenz Cys-Lys-Pro-Pro-Lys (CKPPK)

Bei der SPPS werden Aminosäuren schrittweise an komplett unlösliche Polymere-Trägermaterialien (auch Harze genannt, Kupplung der ersten Aminosäuren über selektiv spaltbare Linker) gekuppelt und können so nach jedem Schritt filtriert und gespült werden. Über die schrittweise Entschützung der N-terminalen Aminosäure (befindet sich am Harz) mit anschließender Umsetzung durch eine N-Terminale geschützte Aminosäure, kann das Peptid so in hohen Reinheiten und Ausbeuten (durch Verwendung eines hohen Überschusses der zu kuppelnden Substanzen) erhalten werden^[101]. Grundsätzlich haben sich bei der SPPS zwei chemisch verschiedene Methoden bewährt, die Verwendung von Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) und tert-Butyloxycarbonyl (Boc) als N-terminale Schutzgruppe der Aminosäuren. Dabei unterscheiden sich die Bedingungen der Entschützungsschritte (der eingesetzte Linker zur Kupplung der Aminosäuren an das Trägermaterial muss in den gewählten Bedingungen stabil sein), die Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA) bei der Boc- und von Piperidin bei der Fmoc-Chemie. In der Literatur

wird beschrieben, dass die Fmoc-Chemie allgemein eine größere Vielfalt an Möglichkeiten zur Schaffung orthogonaler Gruppen besitzt^[98], außerdem wird das N-Terminale Ende des Peptids (Fmoc-Cys) mit Fmoc geschützt und stellt die erste selektiv erreichbare Funktionalität dar. Die Boc-Schutzgruppe erfüllt diese Voraussetzung nicht, da eine Abspaltung bei Konzentration von 25-50 % TFA erfolgt und bereits bei geringeren TFA-Konzentration partiell abgespalten wird (zum Beispiel 1 % TFA bei der Abspaltung der Mtt-Schutzgruppe)^[97].

In der Literatur werden neben Schutzgruppen für Amine der Lysine auch Schutzgruppen für Thiole der Cystein beschrieben. Besonders interessant ist hier die Acetamidomethyl (Acm)-Schutzgruppe (Abbildung 22), die bei den in Tabelle 3 gezeigten Abspaltungsreaktionen der Lysin-Schutzgruppen stabil ist und so dem Konjugat eine weitere selektiv erreichbare Funktionalität ermöglicht. Diese soll im Rahmen der Arbeit zur Anbringung eines Maleimid-funktionalisierten Farbstoffs genutzt werden, welcher zur Visualisierung des Konjugats bei Zellversuchen geeignet ist (Abbildung 35).

Ein großes Problem bei der therapeutischen Anwendung von Peptiden ist deren Zersetzung durch Proteasen (zelluläre Enzyme zur Proteinspaltung)^[102]. Ein Schutz gegen diese Proteasen kann durch Verwendung verzweigter Peptid-Strukturen (Abbildung 21) erreicht werden, da die Enzyme eine geringere Affinität gegen die verzweigten Peptide im Vergleich mit natürlichen Strukturen aufweisen^[103]. Dieser Effekt kann auch durch die Kupplung von PEG-Resten an das Peptid erreicht werden, die zudem noch den Schutz gegen zelluläre Abwehrmechanismen sowie die biologische Halbwertszeit des Konjugats erhöhen^[84]. Ein weiterer positiver Nebeneffekt der Verwendung verzweigter Peptide ist, dass die Anzahl der funktionellen Gruppen erhöht werden kann, ohne das die Struktur des Grundgerüsts (in diesem Fall des Peptid-Kerns der Sequenz CKPPK) verändern werden muss. Die in Abbildung 21 gezeigten Peptide können aufgrund ihrer Struktur auch als dendritische Peptide bezeichnet werden.

Bevor ein Konjugat hergestellt werden kann, welches alle beschriebenen Komponenten beinhaltet (siehe Abbildung 7), mussten im Rahmen dieser Diplomarbeit die dazu nötigen

Strategien und Arbeitsschritte für die Anbindung der einzelnen Komponenten an die Peptid-Kerne, in Form von mehreren *proof of principle* Experimenten, erarbeitet werden.

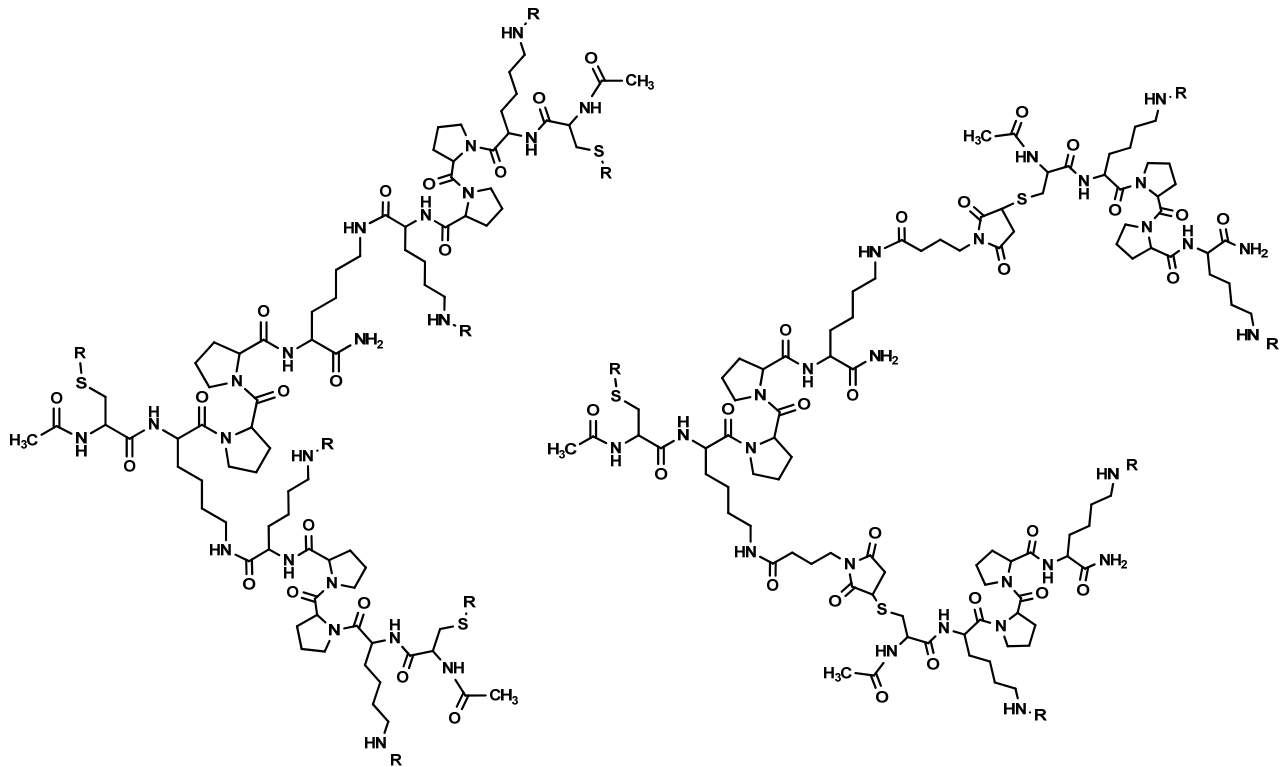


Abbildung 21: Strukturformeln verschiedener verzweigter Peptide auf Basis der verwendeten Peptidsequenz Cys-Lys-Pro-Pro-Lys, links Kupplung über den C-Terminus, rechts über Maleimid-funktionalisierte Linker.

3.2.1 Synthesen der Peptid-CPP-Konjugate

Ausgehend von der gewählten Peptid-Sequenz CKPPK wurde drei Peptid-Kerne hergestellt, bei welchen die Lysin-Schutzgruppen (ungeschützt, Alloc, ivDde) sowie der C-Terminus (Carboxamin, freie Säure) variiert wurden (Abbildung 22).

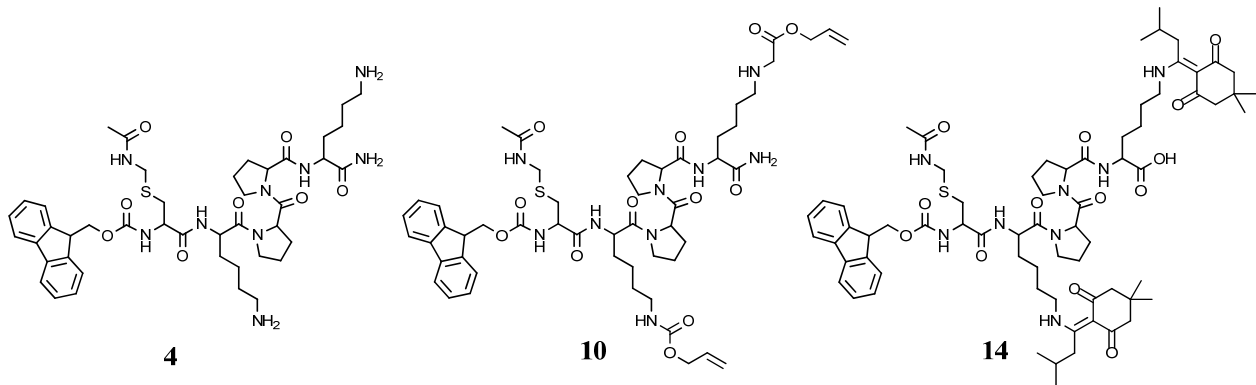


Abbildung 22: Strukturformeln der hergestellten Peptide; A Fmoc-Cys(Acm)-Lys-Pro-Pro-Lys-NH₂ **4; B Fmoc-Cys(Acm)-Lys(Alloc)-Pro-Pro-Lys(Alloc)-NH₂ **10**; C Fmoc-Cys(Acm)-Lys(ivDde)-Pro-Pro-Lys(ivDde)-OH **14**.**

Die Synthese erfolgte mittels manueller und automatisierter Fmoc-SPPS unter Verwendung von Rink-Amid- (liefert nach Abspaltung Carboxamine am C-Terminus der Peptide) und Wang-Harzen (freie Säure am C-Terminus). Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der Aminosäuren erfolgt mittels Piperidin (20%; manuelle Synthese) oder Piperazin (5%; automatische Synthese) in DMF. Die Aktivierung des ungeschützten C-Terminus der zu kuppelnden Aminosäure erfolgte mittels drei Äquivalenten O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU) und 1-Hydroxybenzotriazole (HOBT, manuelle Synthese) oder HBTU und Ethyl cyanoglyoxylat-2-oxim (automatische Synthese) in DMF, sowie drei Äquivalenten Diisopropylethylamin (DIPEA) zur Deprotonierung des ungeschützten N-Terminals Amins. Zwischen allen Entschützungs- und Kupplungsschritten wurde das Harz intensiv mit DMF und DCM gewaschen. Abspaltung des fertigen Peptids vom Harz erfolgte mittels einer Mischung aus 95:2,5:2,5 Trifluoressigsäure/ Wasser/ Triisopropylsilan. Die Peptide wurden in Ausbeuten von 83,3 % (72 mg, **4**), 49 % (249 mg, **10**) und 60,1 % (77 mg, **14**) erhalten und mittels ¹H-, sowie ¹³C-NMR und Massen-Spektrometrie vollständig charakterisiert. Aufgrund von Überlagerungen einzelner Signale in den ¹H-NMR Spektren der Peptide wurden zusätzliche Messungen durchgeführt. Unter Verwendung der Kernspinresonanz-Techniken H,H-COSY (*correlation spectroscopy*, zweidimensionale H,H-Resonanz benachbarter Kerne)-, TOCSY (*total correlated spectroscopy*, zweidimensionale H,H-Resonanz eines Spinsystems)-, C,H-HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*,

zweidimensionale Kopplungen benachbarter, unterschiedlicher Kerne)- und C,H-HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*, zweidimensionale Kopplungen unterschiedlicher Kerne über mehrere Bindungen)-Spektren konnte eine genaue Auswertung der Messdaten erfolgen (Spektren nicht gezeigt, Auswertung siehe Experimentalteil Kapitel 5.3.3.1, 5.3.3.7 und 5.3.3.10).

Zur Zuordnung der Signale der ^{13}C -Daten wurden ebenfalls die H,C-HSQC und H,C-HMBC-Messungen zu Hilfe genommen (Spektren nicht gezeigt, Auswertung siehe Experimentalteil Kapitel 5.3.3.1, 5.3.3.7 und 5.3.3.10). Um die Signale der amidischen Protonen, sowie der Lysine (mit Schutzgruppen) zu charakterisieren wurden außerdem ^{15}N ,H-HSQC-Messungen durchgeführt. Diese sollen beispielhaft an folgendem Spektrum des Peptids **10** gezeigt werden (Abbildung 23).

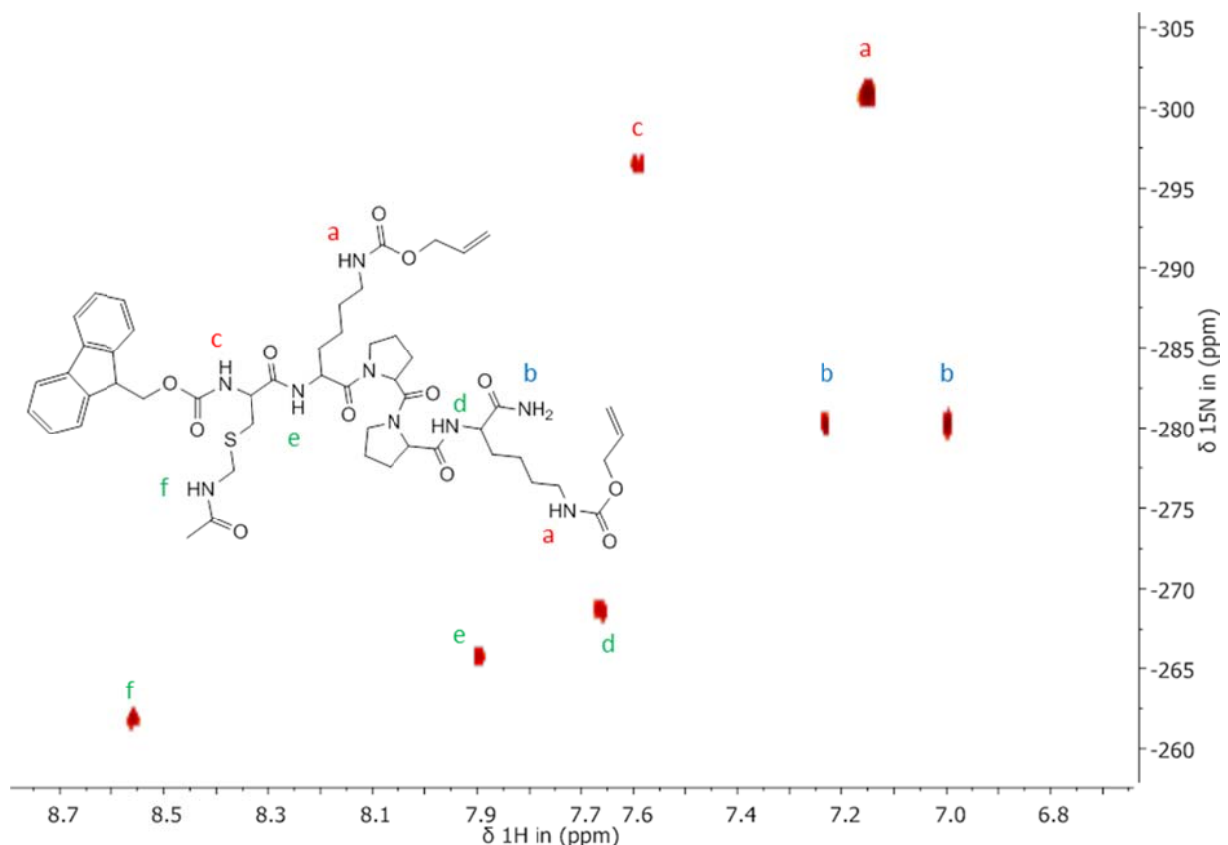


Abbildung 23: ^{15}N , ^1H -HSQC-Spektrum des Peptids **10**

Durch die chemische Verschiebung der ^{15}N -Messungen können die Signale chemische Gruppen (Amid 260-270 ppm, Carboxamin 280 ppm und Carbamat 290-300 ppm) unterteilt werden. Die Signale d, e und f sind den amidischen Protonen zu zuordnen, wobei e und f aufgrund des benachbarten Schwefelatoms im H-NMR Tieffeld-verschoben sind. Für die beiden Alloc-geschützten Lysine (a) wird nur ein intensives Signal gefunden, da die chemische Umgebung der Protonen gleich ist. Das zweite Carbamat-Signal (c) ist durch das benachbarte Schwefelatom ebenfalls im H-NMR Tieffeld-verschoben. Die carboxamidischen Protonen (b) sind als zwei Signale im H-NMR bei 7,2 und 7,0 ppm zu sehen. Gründe hierfür kann der partielle Doppelbindungs-Charakter der Carboxamid-Gruppe und die daraus resultierende chemische Ungleichheit der Protonen sein.

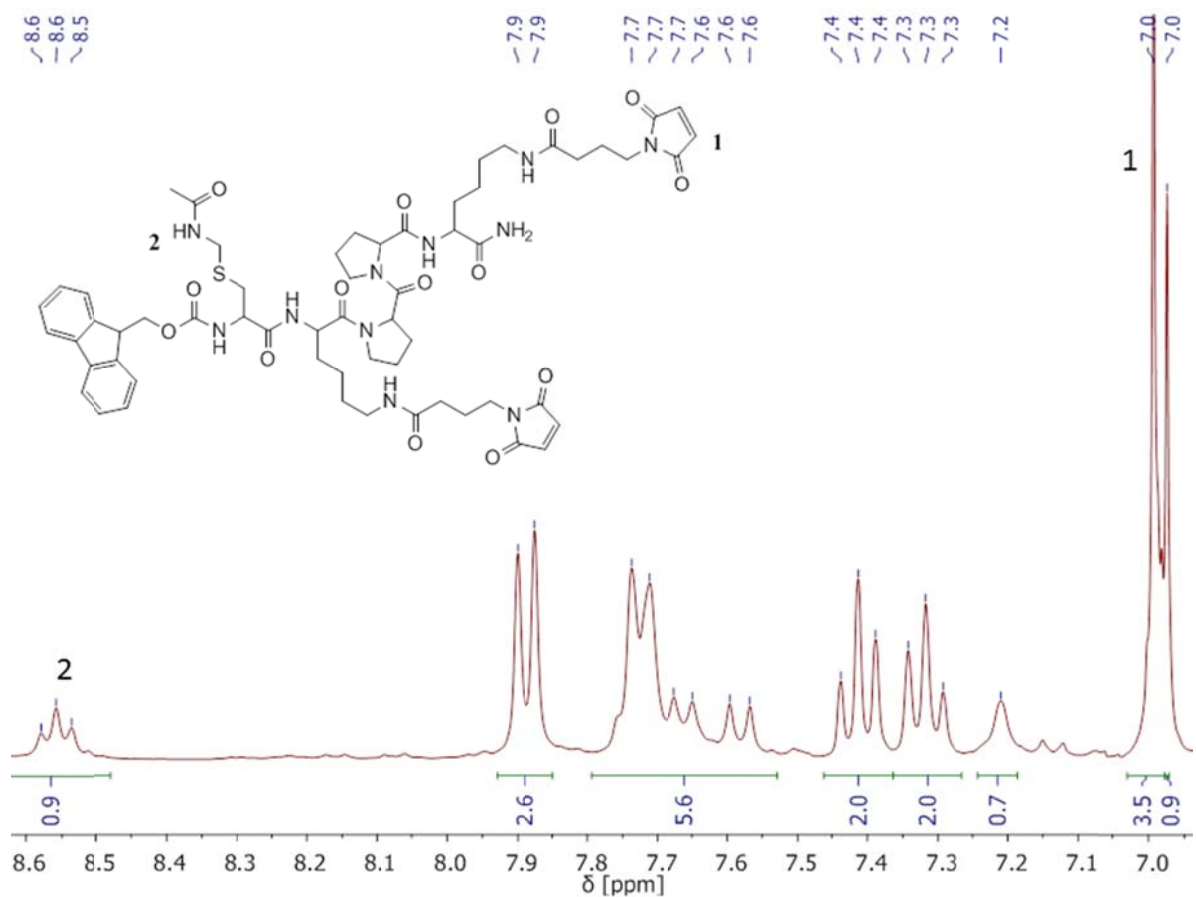


Abbildung 24: Ausschnitt aus ^1H -NMR-Spektrums des Maleimid-funktionalisierten Peptids 5

Als erster Schritt wurden die Amine der Lysin-Seitenketten von **4** (Abbildung 22 A) unter Behandlung durch Diisopropylethylamin (DIPEA) mit dem bifunktionellen Linker N-(γ -Maleimidobutyryloxy)succinimid (GMBS, Abbildung 8) in DMF umgesetzt. Das Produkt **5** (Abbildung 24) konnte mittels Fest-flüssig Extraktion von überschüssigem GMBS getrennt und nach Trocknung im Hochvakuum mit einer Ausbeute von 70,1 % (29,3 mg) erhalten werden. Charakterisierung erfolgte mittels ^1H - und ^{13}C -NMR, sowie MALDI-ToF-MS. Im ^1H -NMR-Spektrum. In Abbildung 24 ist das charakteristische Signal (1) des Maleimids zu sehen.

Durch einen Vergleich der Integrale der Signale des Amids (2) bei 8,6 ppm mit dem Maleimid-Signal (1) (erwartetes Verhältnis von 1:4) kann die zweifache Kupplung von GMBS belegt werden. Die vollständige Charakterisierung des Produkts **5** kann in Kapitel 5.3.3.2 im Experimentalteil eingesehen werden.

Ausgehend von **5** wurden die in Abbildung 9 gezeigten CPPs jeweils über eine Michael-Addition der Thiole (Cystein-Seitengruppe der CPPs) an die Maleimide des Peptid-Kerns gekuppelt (Abbildung 25).

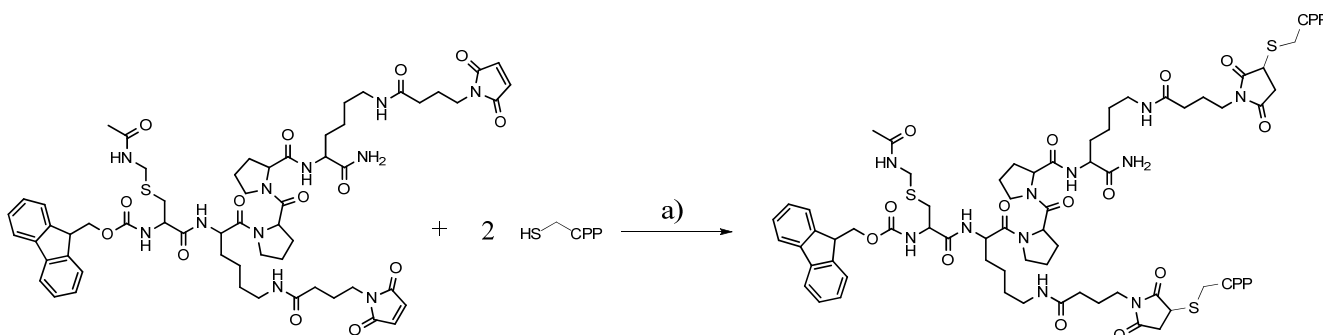


Abbildung 25: Allgemeine Reaktionsgleichung für die Synthese der CPP-Addukte mit 5; a) DMF, RT, 48-96 Stunden

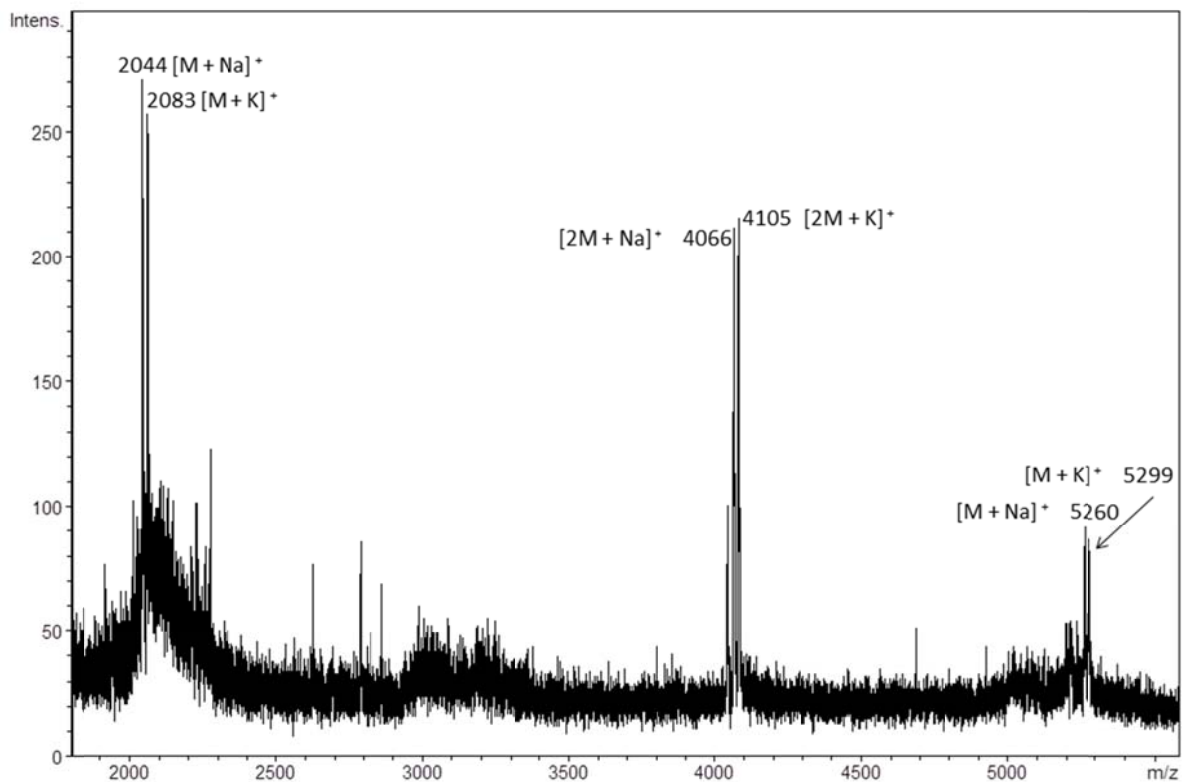


Abbildung 27: MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-MAP-Addukts **7**.

Das gemessene Signal des Produkts **7** von 5259,8 m/z für das Natrium-Addukt stimmt mit der erwarteten Masse von 5259,2 g/mol im Rahmen der Messgenauigkeit überein (siehe hierzu Kapitel 5.3.3.4). Das Signal bei 2044 m/z stellt das Natrium-Addukt des im Überschuss eingesetzten MAP-Edukts (2021 g/mol) dar. Wobei das Signal bei 4066 m/z als Natrium-Addukt zweier MAP-Peptide ($2 \times 2021,34 + 23 = 4066$ g/mol) erklärt werden kann. Zusätzlich sind alle beschriebenen Signale als Kalium-Addukte ($MW + 39$ m/z) im Spektrum zu sehen. Das ebenfalls unter den gleichen Bedingungen mittels MALDI nachgewiesene Edukt **5** ist im Spektrum nicht zu erkennen, weshalb von einer vollständigen Umsetzung zum Produkt **7** ausgegangen werden kann.

Das Reaktionsprodukt **6** (Abbildung 28) der Reaktion von **5** mit Octaarginin konnte erfolgreich mittels RP-HPLC aufgereinigt werden, wobei drei Signale im HPLC-Elutionsdiagramm zu sehen waren und die entsprechenden getrennten Fraktionen mittels

MALDI-ToF untersucht wurden. Dabei konnte durch Messung im Reflektionsmodus lediglich das Octaarginin als Bestandteil einer Fraktion nachgewiesen werden (keine Signale in den anderen Fraktionen).

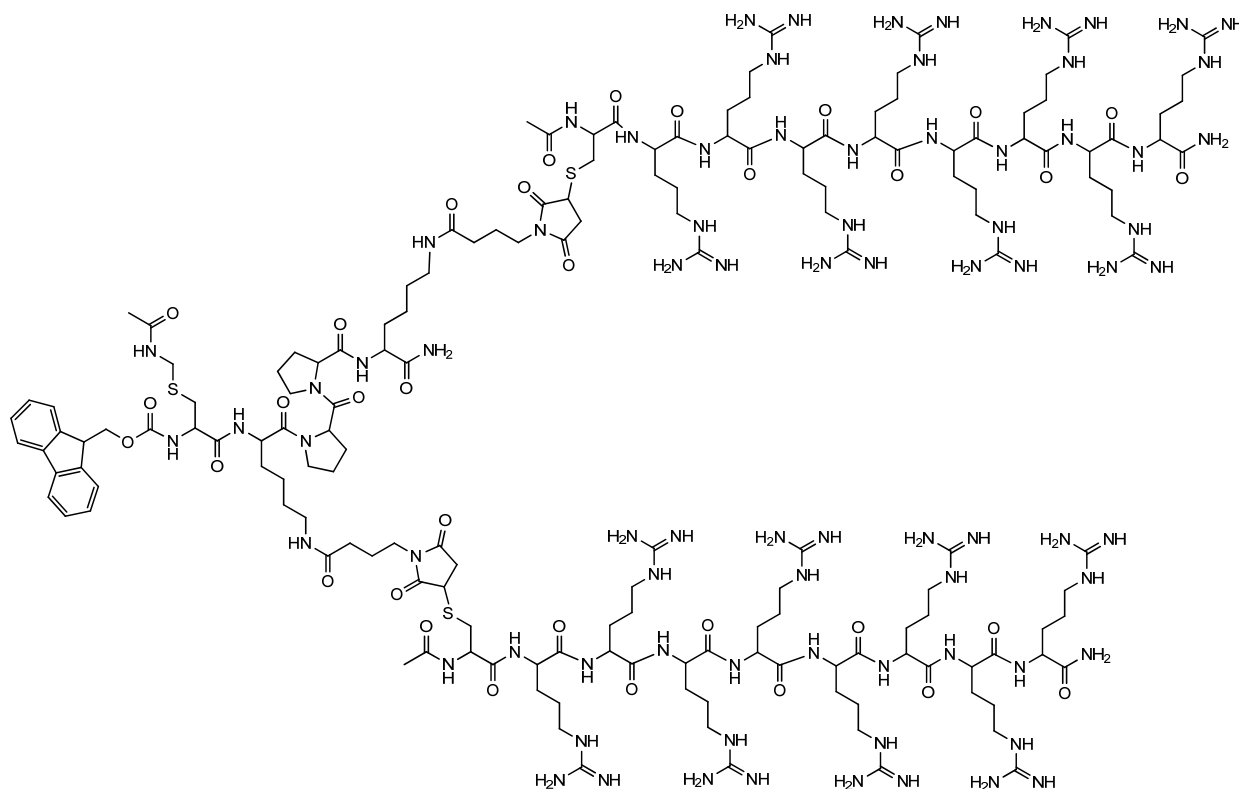


Abbildung 28: Strukturformel des Produkts 6 der Reaktion von 5 mit Octaarginin

Bei MALDI-ToF-Messungen im Reflektionsmodus werden die ionisierten Moleküle zusätzlich durch ein elektrisches Feld in die entgegengesetzte Richtung reflektiert. Ionen gleicher Masse, aber unterschiedlicher Fluggeschwindigkeit, ausgelöst durch die zeitversetzte Desorption des MALDI-targets, dringen unterschiedlich tief in das E-Feld ein. Die Reflektion kompensiert den Flugzeitunterschied und die Ionen gleicher Masse driften fokussiert auf den Detektor. Neben der erhöhten Auflösung ist die verlängerte Flugzeit im Vergleich zum linearen Modus zu nennen, was die Wahrscheinlichkeit des Zerfalls von Analyt-Ionen zur Folge hat und die Detektionsintensität reduziert oder ganz unterdrückt.

Durch MALDI-ToF-MS im linearen Modus (direkte Detektion mit geringerer Auflösung) konnte **6** mit einem Signal bei 3957 m/z (erwartet 4015 m/z, Abbildung 29), sowie das einfach substituierte Nebenprodukt als Bestandteile der anderen Fraktionen nachgewiesen werden. Aufgrund fehlender Kalibrationsmöglichkeiten des linearen Modus sind die Signal gegenüber ihrer eigentlichen Masse verschoben. Geht man von einer Verschiebung von + 53 m/z aus (Octaarginin-Signale als Kalibration, gemessen bei 1360 m/z und erwartet bei 1413 m/z), so stimmen die gemessenen Werte mit den erwarteten im Rahmen der Messgenauigkeit überein. Trotz der Messung im linearen Modus können im MALDI-ToF-MS von **6** Signale für das einfach substituierte Nebenprodukt bei 2549 m/z (erwartet bei 2604 m/z), sowie für das Octaarginin bei 1360 m/z (erwartet bei 1413 m/z) erkannt werden. Als Grund für die Zerfallsprozesse kann die Stabilität der Analyt-Ionen aufgeführt werden.

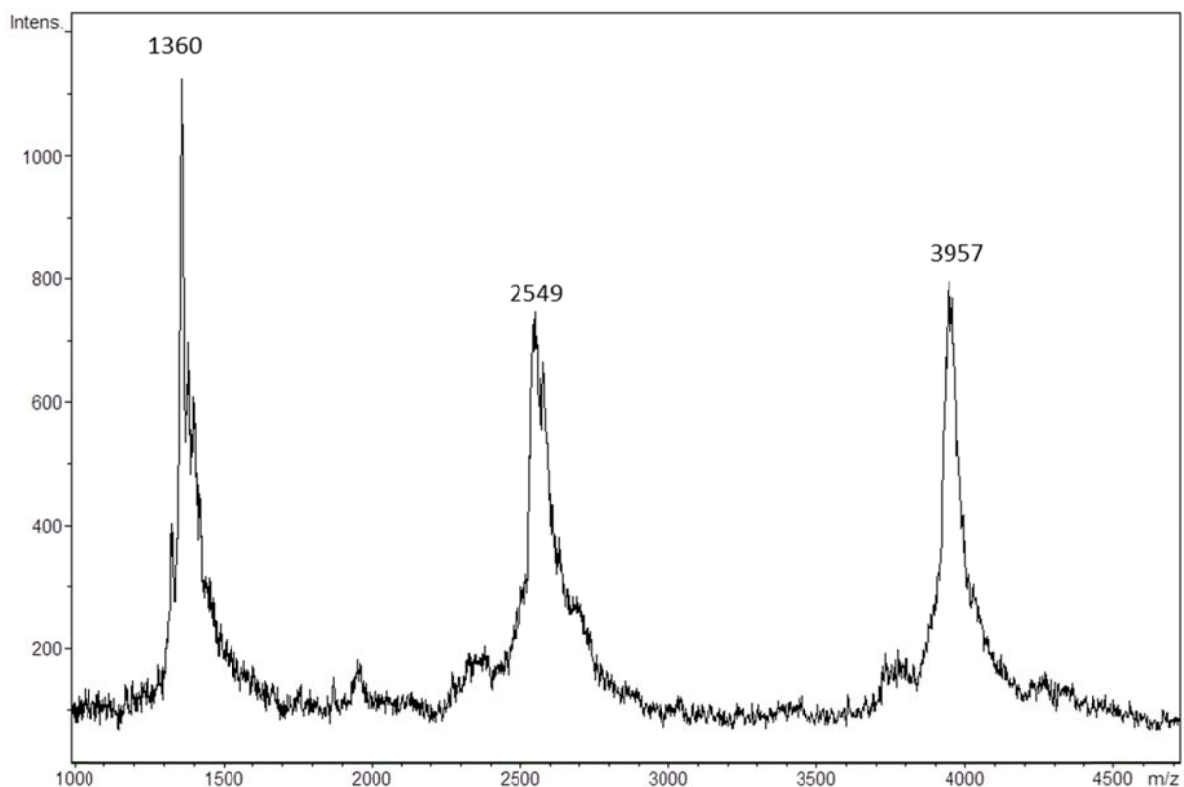


Abbildung 29: MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-CPP-Addukts **6**.

Das Reaktionsprodukt **8** (Abbildung 30) der Reaktion von **5** mit SAP(E) wurde analog mittels RP-HPLC aufgereinigt, wobei vier Signale im HPLC-Elutionsdiagramm (Abbildung 31) zu sehen waren und die entsprechenden getrennten Fraktionen mittels MALDI-ToF untersucht wurden.

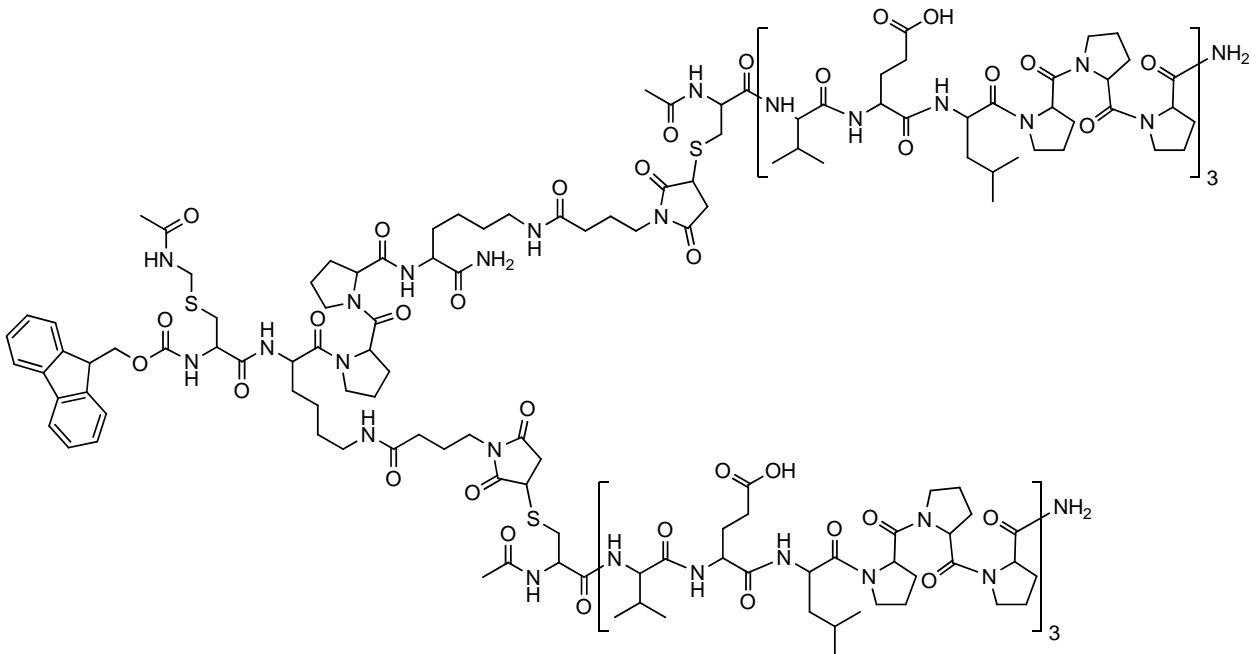


Abbildung 30: Strukturformel des Produkts **8** der Reaktion von **5** mit dem Prolin-reichen CPP SAP(E)

Die Signale konnten dem SAP(E)-Edukt und dessen disulfidischer Spezies, sowie dem Haupt-**8** (Kupplung zweier CPPs) und Nebenprodukt (einfache Kupplung) der Reaktion zugeordnet werden. Das in Abbildung 32 gezeigte MALDI-ToF-MS Spektrum der gesammelten Produktfraktion **8** soll die Qualität der beschriebenen Aufreinigung bewerten. Im Spektrum ist ein Signal bei 5339 m/z zu sehen, dass durch Vergleich mit der zu erwartenden Masse von 5338 g/mol als Produkt **8** der Reaktion identifiziert werden kann. Zusätzlich ist das Signal für das Produkt als Kalium-Addukt (MW + 39 m/z) bei 5356 m/z zu sehen. Die Massenspektrometrische Untersuchung belegt die erfolgreiche Trennung von **8** mittels RP-HPLC.

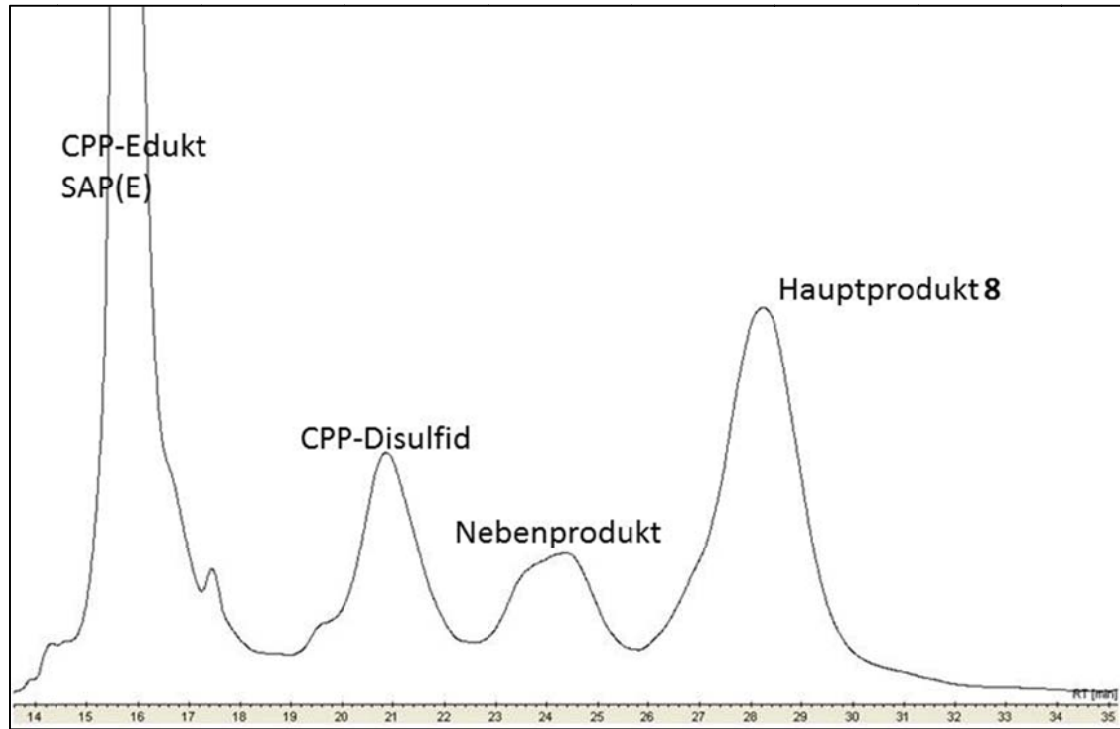


Abbildung 31: RP-HPLC-Eluogramm des Reaktionsgemisches von 8

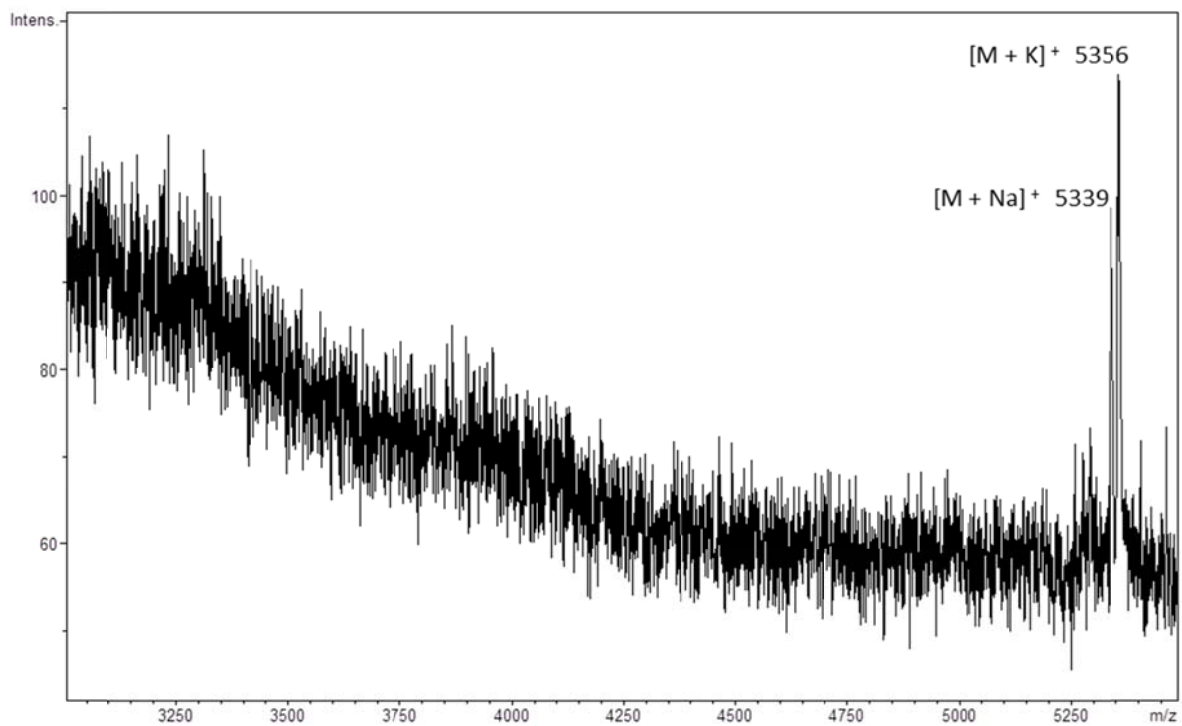


Abbildung 32: MALDI-ToF-MS-Spektrum der RP-HPLC-Fraktion des Hauptprodukts 8 der Aufreinigung der Reaktion von 5 mit dem CPP SAP(E).

Abbildung 34 zeigt das MALDI-ToF-MS der Reaktionsmischung der Synthese des PEG-Peptid-Addukts **13** (Abbildung 33). Dort sind Signale für das Peptid-Edukt (erwartet bei 809,4 m/z), die Verteilung (jeweils + 44 m/z für jede PEG-Wiederholungseinheit) für das PEG-Edukt (erwartet bei etwa 2000 m/z) und eine zusätzliche Verteilung mit Maximum bei etwa 2800 m/z zu sehen. Das Signal der neuen Verteilung bei 2768,18 m/z kann dem Natrium-Addukt des PEG-Peptid-Addukts mit einer Anzahl der PEG-Wiederholungseinheiten von 42 (berechnete Masse 2768,54 g/mol) zugeordnet werden. Dies ist Grund zur Annahme einer erfolgreichen Kupplung des PEG-Restes an das Peptid, lässt aber keinen Schluss auf die Quantität der Reaktion zu.

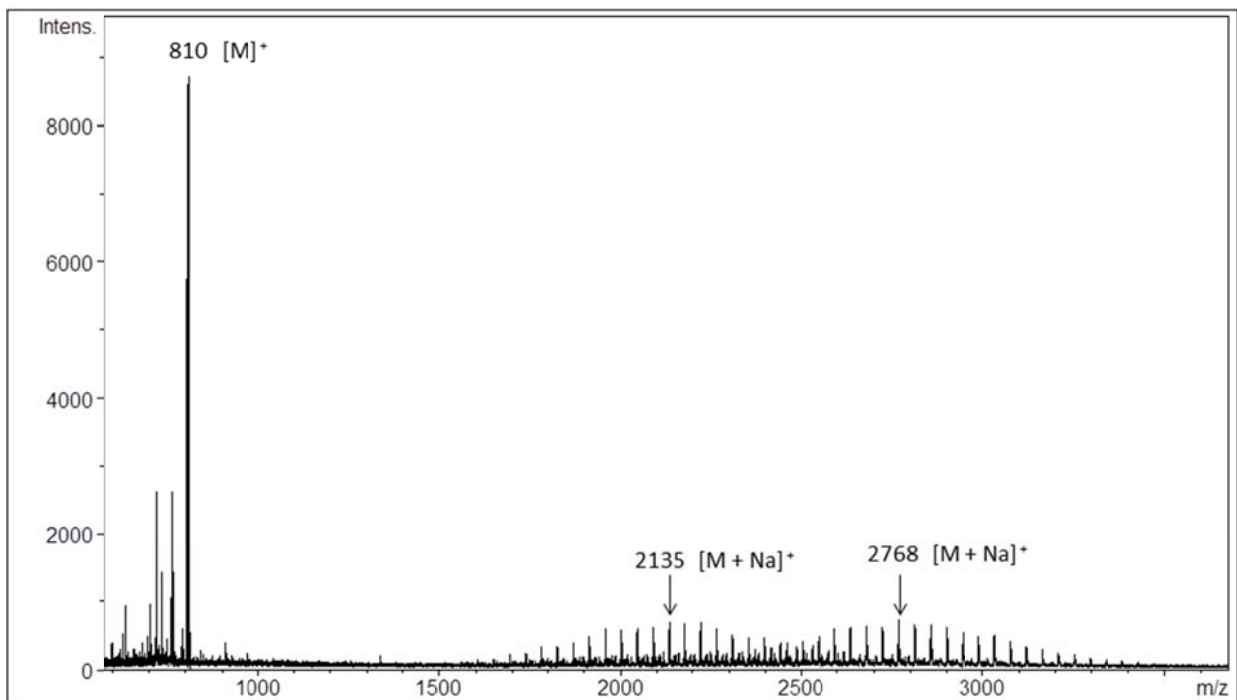


Abbildung 34: MALDI-ToF-MS-Spektrum der Kupplungsreaktion des Peptid-Kerns mit einem NHS-PEG-Ester

Da die Aufreinigung des Produkts **13** mittels *recycling*-GPC (geringer Einfluss des Peptids im Vergleich zu PEG auf hydrodynamischen Radius des Konjugats^[84]) und präparativer RP-HPLC (kein refraktiver Detektor, somit keine Detektion des PEG) nicht erfolgreich war, muss eine neue Synthesestrategie entwickelt werden, was im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht mehr

möglich war. Um die beschriebene Aufreinigung des PEG-Peptid-Konjugats zu erleichtern können monodisperse PEGs zur Kopplung verwendet werden, welche neben der Kopplung an das N-terminale Ende der Peptide, auch als bifunktionelle Linker eine Kopplung der CPPs an die Seitenketten der Lysine ermöglichen.

3.2.3 Synthese des Farbstoff-Peptid-Konjugats

Neben einem PEG-Rest wurde untersucht, ob auch ein Fluoreszenz-Farbstoff erfolgreich an den Peptid-Kern gekuppelt werden kann. Hierzu wurde ein Maleimid-funktionalisierter Farbstoff (7-Diethylamino-3-(4-maleimidophenyl)-4-methylcoumarin) zur Reaktion mit dem Thiol der Cystein-Seitenkette des Peptid-Kerns ausgewählt. Der verwendete Farbstoff entwickelt erst nach Reaktion des Maleimids seine charakteristische Fluoreszenz (Anregung bei 405 nm, Emission bei 530 nm^[104]). In der Literatur wird eine selektive Reaktion von Thiolen, in Gegenwart von ebenfalls zur Kupplung an ein Maleimid befähigten Aminen, in wässrigen Medien bei einem pH-Wert von 7,4 (bei pH-Wert größer als 8,5 wird Reaktion mit Aminen bevorzugt) beschrieben^[105]. Da der Farbstoff schlecht in wässrigen Medien löslich ist und eine Einstellung des pH-Wertes so kaum möglich ist, wurden Peptide mit geschützten und ungeschützten Lysinen als Kerne verwendet. Die beschriebenen Bedingungen wurden zuerst zur Kupplung des Farbstoffes an den ungeschützten Peptid-Kern **4** (Abbildung 22) verwendet. Die Cystein-Schutzgruppe des Peptid-Kerns **4** wurde im ersten Schritt durch Reaktion mit Quecksilber(II)-Acetat in 10%iger Essigsäure nach der Literaturvorschrift von D. Veber^[53] entfernt und das entstandene Produkt **9** mittels MALDI-ToF-MS und ¹H-NMR-Spektroskopie charakterisiert (siehe Kapitel 5.3.3.6). Die Reaktion von **9** mit einem dreifachen Überschuss des Coumarin-Farbstoffs und deren Bedingungen werden in Abbildung 35 beschrieben.

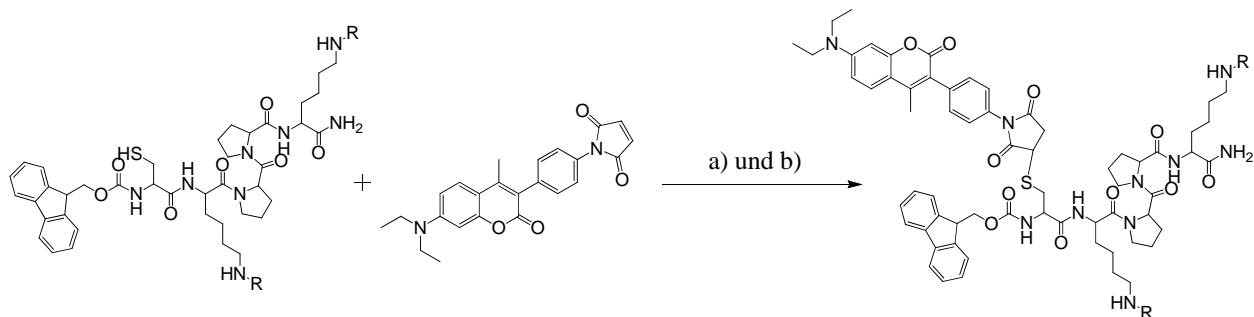


Abbildung 35: Strukturelle Darstellung der Reaktion des Peptid-Kerns mit dem beschriebenen Fluoreszenz-Farbstoff; a) Reaktion von **9 mit R = H, 24 Stunden, RT, PBS-Puffer pH = 7,4, DMF; b) Reaktion von **11** mit R = Alloc, 24 Stunden, RT, DMF.**

Aufgrund der Löslichkeiten der Edukte (Farbstoff schlecht in wässrigen Medien löslich) musste ein Überschuss an DMF (DMF/PBS-Puffer 10:1) verwendet werden. Die Untersuchung der Reaktionsmischung mit MALDI-ToF-MS (nicht gezeigt) zeigt neben dem Signal für das Produkt der Reaktion von **9** mit dem Farbstoff auch Signale die einer Reaktion der Amine zuzuordnen sind. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Puffer-Kapazität der PBS-Lösung mit dem Überschuss an DMF nicht ausreicht um den pH-Wert zu stabilisieren und somit eine Addition der Thiole an das Maleimid nicht mehr selektiv ist. Der Ansatz konnte chromatographisch nicht aufgearbeitet werden. Um die beschriebenen Nebenreaktionen zu vermeiden wurde der Alloc-geschützte Peptid-Kern **10** (Abbildung 22 B) zur Kopplung des Farbstoffs verwendet. Da das Peptid nicht in wässrigen Medien löslich ist, wurde durch Behandlung mit Silbertrifluormethansulfonat in einer Mischung aus TFA und Anisol (99:1) entschützt^[106] und das entstehende Disulfid durch Behandlung mit 1,3-Propanedithiol zu dem Reaktionsprodukt **11** reduziert. Das Produkt **11** wurde mittels MALDI-ToF-MS und ¹H-NMR-Spektroskopie charakterisiert (siehe Kapitel 5.3.3.8).

Die Reaktionsbedingungen der Umsetzung von **11** mit dem Fluoreszenzfarbstoff (3 Äquivalente) sind in Abbildung 35 zu sehen. Der überschüssige Farbstoff konnte mittels manueller GPC entfernt und das Produkt **12** mittels RP-HPLC aufgereinigt werden. Charakterisierung erfolgte mittels MALDI-ToF-MS und ¹H-NMR-Spektroskopie (Abbildung 36).

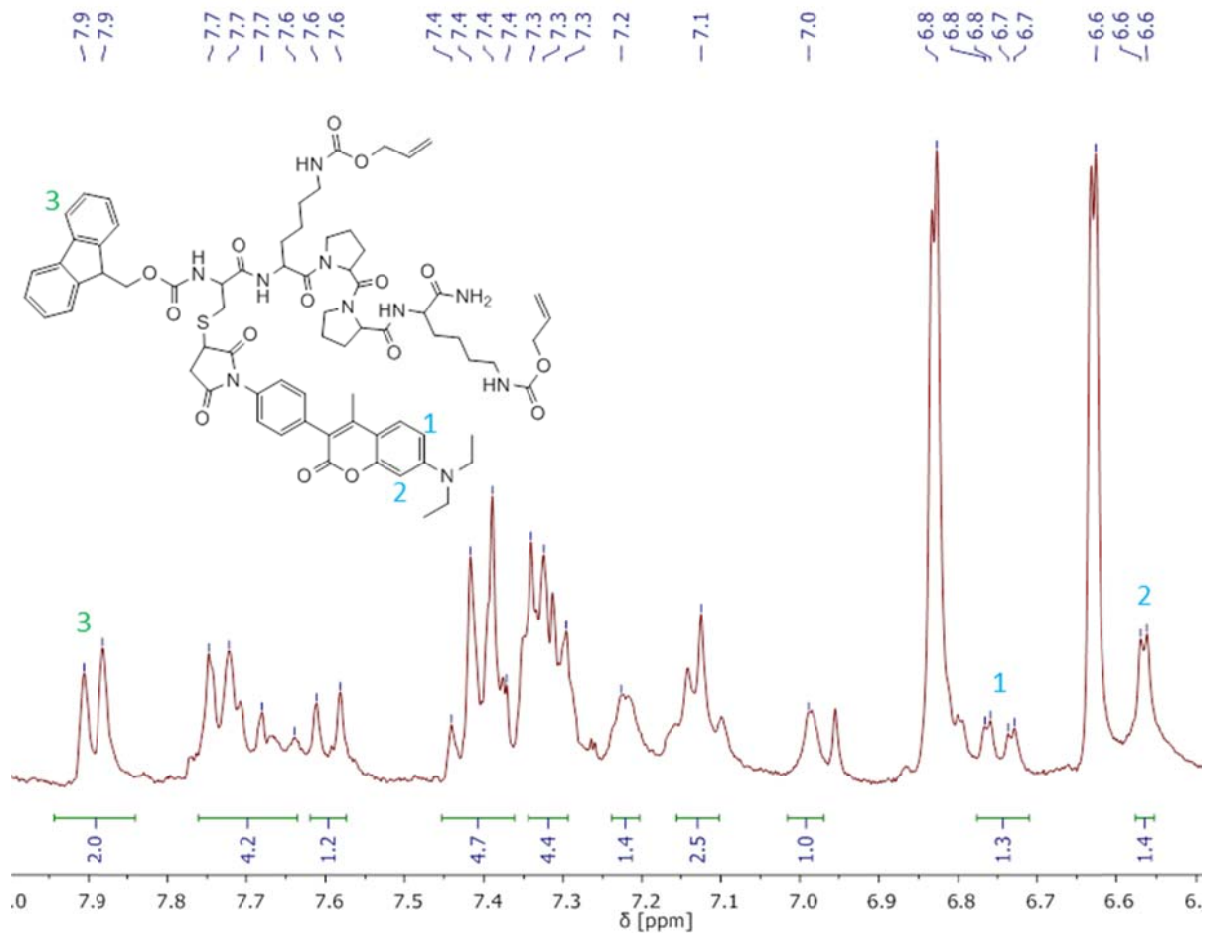


Abbildung 36: Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des Farbstoff-Peptid-Addukts (**12**)

Eine Zuordnung der einzelnen Protonen ist aufgrund der Überlagerung der amidischen, sowie der aromatischen Signale der Fmoc-Schutzgruppe und des Farbstoffs nicht eindeutig. Trotzdem bestätigt ein Vergleich der Signale (und deren Integralwert) bei 7,9 (**3**, Duplett ^2J -Kopplung, Fmoc), 6,7 (**1**, Duplett von Duplett ^2J - und ^3J -Kopplung, Farbstoff) und 6,6 ppm (**2**, Duplett ^3J -Kopplung, Farbstoff) die Struktur des Produkts **12**.

Das Peptid-Farbstoff-Konjugat **12** konnte vollständig charakterisiert (siehe Kapitel 5.3.3.9) und in einer Ausbeute von 27,5 % (6 mg) erhalten werden.

3.2.4 Synthese des verzweigten Peptid-Kerns

Neben der Kupplung eines PEGs zur Erhöhung der Stabilität des Peptid-Konjugats gegen Proteasen, wurde ein weiterer Ansatz, die Synthese eines verzweigten Peptid-Kerns, verfolgt.

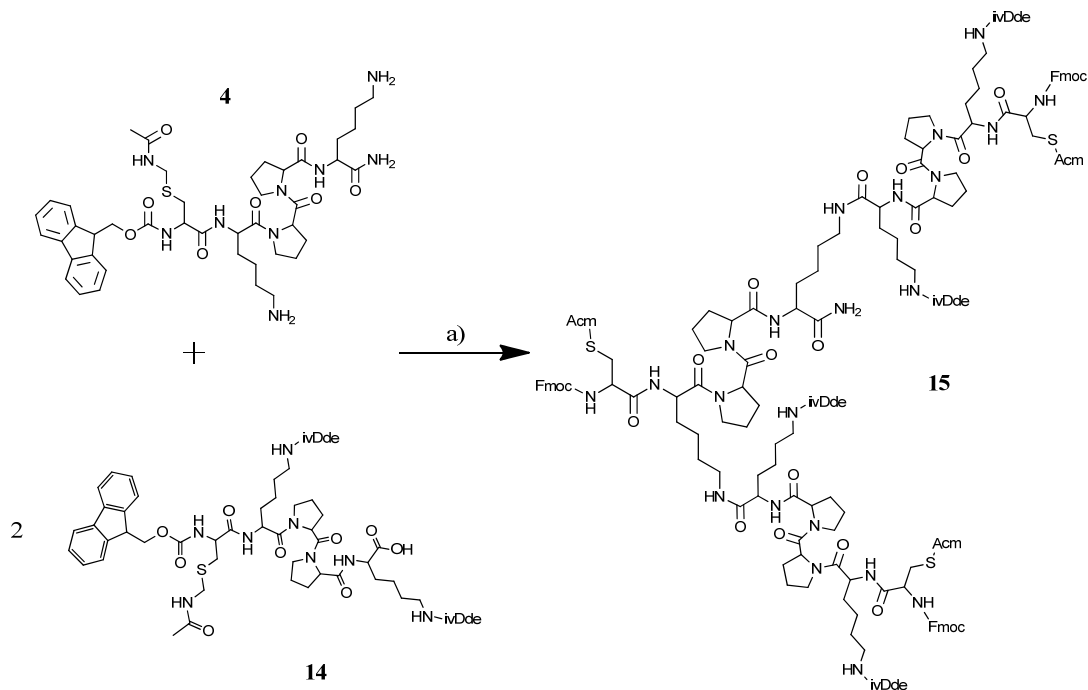


Abbildung 37: Reaktionsgleichung der Synthese des verzweigten Peptid-Kerns 15; a) 24 Stunden, RT, 3 eq HBTU/HOBt/DIPEA

Neben der Erhöhung der Stabilität gegen Proteasen führt die verzweigte Peptid-Struktur auch zu einer erhöhten Anzahl funktioneller Gruppen. Die Synthese von **15** wurde durch Kupplung der Carbonsäure-Funktion des ivDde-geschützten Peptids **14** an die Lysin-Seitenketten von **4** (Abbildung 22) unter Ausbildung von Amid-Bindungen durchgeführt (Abbildung 37).

Die Aktivierung des ungeschützten C-Terminus von **14** (dreifacher Überschuss) erfolgte mittels HBTU und HOBt in DMF, sowie DIPEA zur Aktivierung der freien Amine (Lysin-Seitenketten) von **4** (analog der Synthesen von **4,10** und **14**). Das Rohprodukt der Reaktion

15 wurde anschließend aus Diethylether gefällt und der erhaltene Feststoff mittels MALDI-ToF-MS untersucht (Abbildung 38).

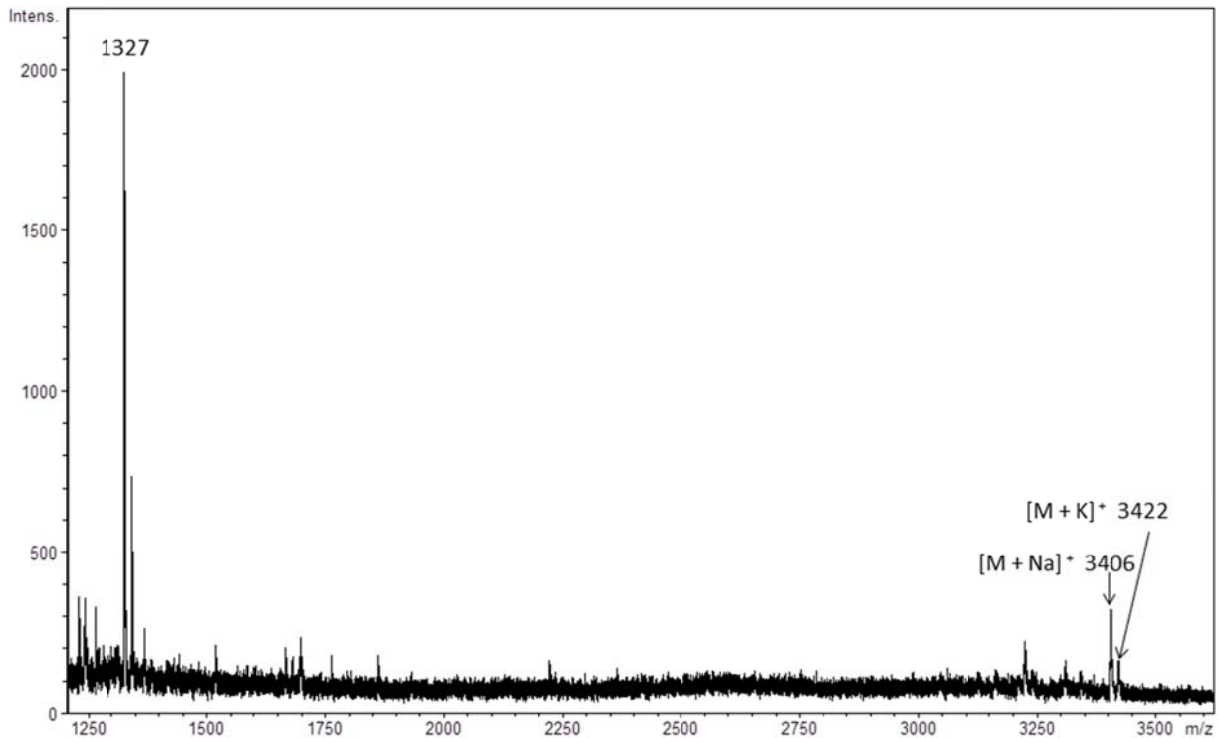


Abbildung 38: MALDI-ToF-MS-Spektrum des verzweigten Peptid-Kerns **15**

Abbildung 38 zeigt das MALDI-ToF-MS-Spektrum des Rohprodukts **15**, wobei das Signal bei 1327 m/z überschüssigem Edukt **14** zugeordnet werden kann. Das Signal bei 3406 m/z wird dem Natrium-Addukt des verzweigten Peptids **15** (erwartet 3405,78 g/mol) zugeschrieben, wobei das einfach verzweigte Nebenprodukt der Reaktion nicht zu sehen war. Zusätzlich ist auch das Kalium-Addukts des Peptids **15** bei 3422 m/z (erwartet 3421,76 g/mol) zu sehen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese eines verzweigten Peptid-Kerns **15** mittels Kupplung der C-Terminus von **14** an die Lysin-Seitenketten des ursprünglichen Peptid-Kerns **4** möglich ist. Jedoch war eine Aufreinigung von **15** im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht mehr möglich. Ein möglicher Lösungsansatz ist die Synthese des verzweigten Kerns mittels SPPS, wobei die Lysine nach Entschützung (zum Beispiel durch Verwendung der Mtt-

Schutzgruppe mit Abspaltung bei 1% TFA) am Harz schrittweise mit den einzelnen Aminosäuren der Seitenkette funktionalisiert werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Verwendung von small-interfering-RNA stellt einen sehr erfolgversprechenden Ansatz zur Behandlung der multi-drug-resistance in Krebszellen dar. Das Hauptproblem hierbei ist der Transport der siRNA durch die Zellmembran zu ihrem zellulären Ziel, der komplementären messenger-RNA des P-glycoprotein im Cytosol der Krebszellen. Dabei ist der Einsatz von cell-penetrating-peptides vielversprechend, da für diese ein direkter Zellaufnahme-Mechanismus (keine Endozytose) postuliert wird und da durch die positive Gesamtladung der CPPs eine gleichzeitige elektrostatische Bindung der siRNA erfolgen kann. Zum Schutz gegen intrazelluläre Abwehrmechanismen (Immunsystem, Proteasen, Nukleasen, etc.) kann die Verknüpfung eines Polyethylenglycolrestes, oder die Verwendung von verzweigten Peptiden (als Kerne) zu einer deutlichen Erhöhung der biologischen Halbwertszeit führen.

In dieser Arbeit wurde über die Synthese multivalenter und vollständig biokompatibler Konjugate zum effektiven Transport von siRNA in Zellen, basierend auf der Verwendung von *cell-penetrating peptides*, berichtet. Dabei wurden synthetisch zwei verschiedene Ansätze, zur Untersuchung der Multivalenz und einem Screening einzelner CPPs, gewählt.

Beim ersten Ansatz wurden an 4-armige Polypropylenimin-Kerne aus der Dendrimer-Synthese, mono- und bifunktionelle PEG-Ketten gekuppelt. Zur Untersuchung der Kupplungs- und Aufreinigungs-Bedingungen wurden zuerst monofunktionelle NHS-PEG-Reste gekuppelt. Das vierfach substituierte Produkt dieser Reaktion konnte aufgereinigt und komplett charakterisiert werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte das vierfach substituierte Produkt der Reaktion des Kerns mit bifunktionalem PEG (NHS-Ester, Orthopyridyl-Disulfid) hergestellt, aufgereinigt und charakterisiert werden. Anschließend wurde dieses Produkt mit Octaarginin (mit zusätzlichem Cystein) umgesetzt. Die erfolgreiche Kupplung mehrerer CR₈-Peptide über Disulfid-Brücken konnte mittels SDS-Gelelektrophorese gezeigt werden.

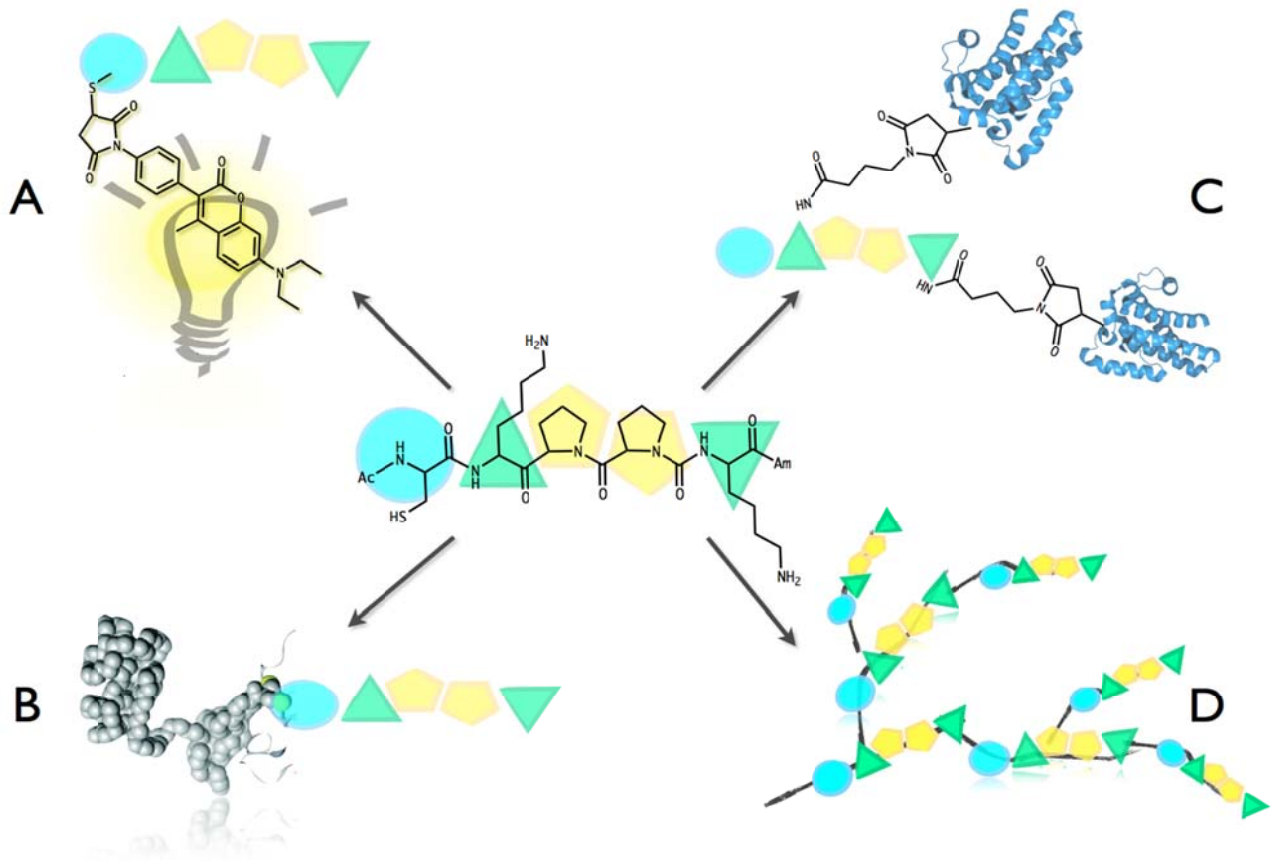


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Synthesen ausgehend vom Peptid-Kern; A Verknüpfung eines Fluoreszenzfarbstoffes; B Verknüpfung eines PEG-Restes; C Verknüpfung der CPPs über Linker; D Verzweigter Peptid-Kern.

Beim zweiten Ansatz wurden orthogonal geschützte Peptide als Kerne verwendet. Dabei wurde in allen Fällen die Sequenz Cys-Lys-Pro-Pro-Lys als Ausgangspunkt für weitere Derivatisierungen verwendet. Die Veränderung der Schutzgruppen an Lysin und Cystein, konnte die benötigte Orthogonalität zur Kupplung verschiedener CPPs, sowie weiterer für die Funktionalität des Konjugats wichtiger Komponenten (Abbildung 39, PEG-Kette, Farbstoff zur Visualisierung) ermöglichen. Insgesamt wurden drei Peptidsequenzen Fmoc-Cys(Acm)-Lys-Pro-Pro-Lys-NH₂, Fmoc-Cys(Acm)-Lys(Alloc)-Pro-Pro-Lys(Alloc)-NH₂ und Fmoc-Cys(Acm)-

Lys(ivDde)-Pro-Pro-Lys(ivDde)-NH₂ mittels *solid-phase-peptide-synthesis* als Ausgangspunkt für die weiteren Derivatisierungen hergestellt und detailliert charakterisiert.

In mehreren *proof of principle* Experimenten konnten die einzelnen Bestandteile der Konjugate, darunter die verwendeten CPPs (Octaarginin, MAP, SAP(E)), PEG, sowie ein Maleimid-funktionalisierter Fluoreszenz-Farbstoff, erfolgreich an die jeweiligen Kerne gekuppelt werden. Zusätzlich wurde eine Möglichkeit der Synthese eines verzweigten Peptid-Kerns gezeigt. Dieser soll in zukünftigen Experimenten als Ausgangspunkt für die Konjugat-Synthese, zum Beispiel eines Systems, das alle in Abbildung 39 gezeigten Komponenten (PEG, Farbstoff, multivalente CPPs) in sich vereint, Verwendung finden (Abbildung 40). Dabei können die aus den *proof of principle*-Experimenten gewonnenen Erkenntnisse der Reaktionsbedingungen der einzelnen Schritte bei der Umsetzung dieses chemisch sehr anspruchsvollen Ziels helfen. Weiterhin soll der Einfluss der Sekundärstrukturen der Peptide (Kerne und CPPs) auf das Gesamtkonjugat, durch Ermittlung der 3D-Strukturen der Kerne mit detaillierten NMR-Studien (NOESY, *nuclear overhauser enhancement spectroscopy*, Kernspinresonanz-Messungen räumlich benachbarter Kerne zur Strukturberechnung) untersucht werden.

Die synthetisierten Konjugate sollen auf ihre Fähigkeit siRNA zu binden untersucht werden. Dies kann mittels Gelelektrophorese (wichtig ohne SDS), bei der separat Peptide und RNA angefärbt werden, erfolgen. Die untersuchten siRNA-Komplexe sollen anschließend in Zellexperimenten mit *multidrug* resistenten Krebszellen auf die Transportfähigkeit für siRNA getestet werden. Die Zellen werden dabei in Chemotherapeutika enthaltenden Medien gezüchtet, wobei eine erfolgreiche Transfektion mit siRNA, durch eine auftretende Sensitivität der Zellen gegen die Chemotherapeutika (Absterben der Zellen) erkannt werden kann^[22]. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Studien soll die Synthese weiterer Konjugate geplant werden, um den Einfluss der Anzahl und Art der verwendeten CPPs zu evaluieren. Dabei kann die Kupplung unterschiedlicher CPPs durch die Synthese eines Peptide-Kerns mit orthogonal geschützten Lysinen ermöglicht (zum Beispiel die Sequenz Fmoc-Cys(Acm)-Lys-Pro-Pro-Lys(Alloc)-NH₂) werden. Die Anzahl der CPPs kann durch die Verwendung

trifunktionaler Kerne aus der Dendrimer-Synthese oder mit zusätzlichen Lysininen versehenen Peptide-Kernen variiert werden (Abbildung 41).

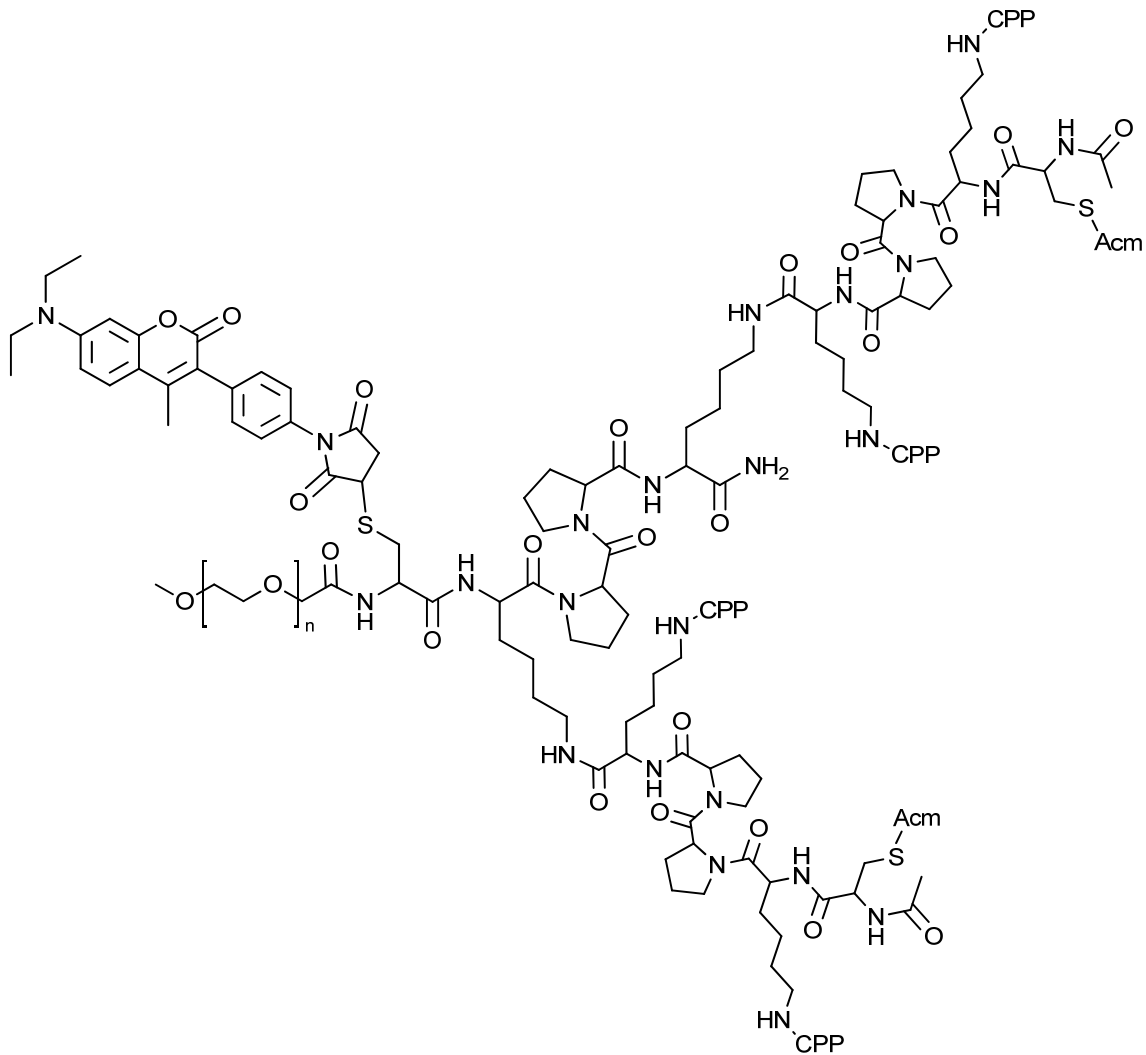


Abbildung 40: Strukturformel des kombinierten dendritischen Peptid-Konjugats mit Farbstoff, CPPs und PEG

Die Verwendung von siRNA birgt ein großes Potential zur Bekämpfung der MDR in Krebszellen. Durch die Verwendung der multivalenten CPP-Konjugate kann der siRNA-Transport in diese Zellen ermöglicht werden. Die in dieser Arbeit synthetisierten Konjugate

und die damit verbundenen Funktionalitäts-Studien können einen fortschrittlichen Beitrag für die Untersuchung der beschriebenen Prozesse liefern.

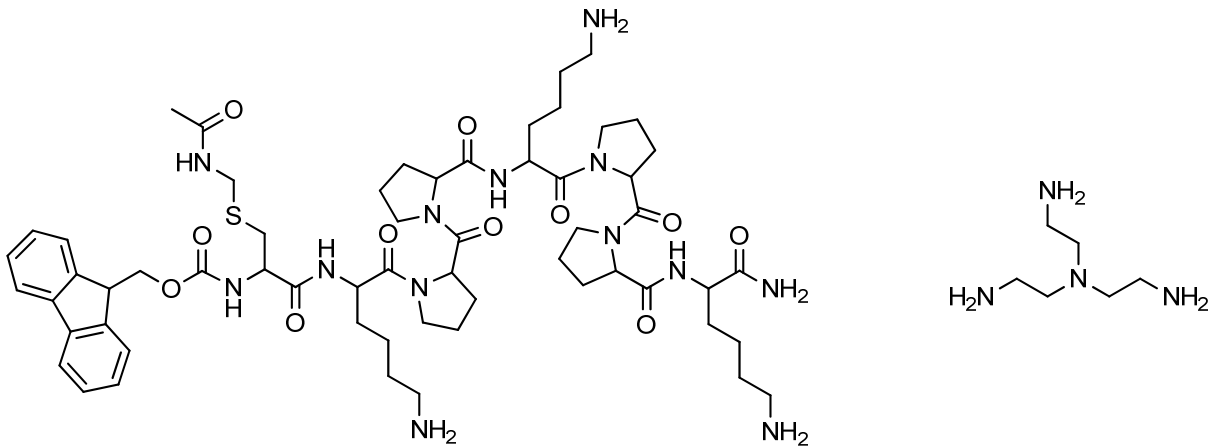


Abbildung 41: Strukturelle Darstellung möglicher Kerne für die Veränderung der Multivalenz.

5 Experimenteller Teil

5.1 Instrumentelle Analytik

Hochaufgelöste ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der hergestellten Verbindungen wurden an den Geräten „Bruker AC 300“, „Bruker AMX 500“ und „Bruker Avance 700 Ultrashield™“ aufgenommen. Sofern nicht anders angegeben wurden alle Messungen bei Raumtemperatur unter Verwendung des jeweils angegebenen deuterierten Lösungsmittels vorgenommen.

Massenspektrometrie

Die MALDI-ToF-MS-Spektren der hergestellten Verbindungen wurden an dem Gerät „Bruker Reflex II“ gemessen. Sofern nicht anders angegeben wurden alle Spektren im Reflektionsmodus mit positiver Ionisation gemessen.

Infrarotspektrometrie

Die IR-Spektren der hergestellten Verbindungen wurden an dem Gerät „FT-IR-Spektrometer 320“ der Firma Nicolet aufgenommen.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Alle analytischen und präparativen HPLC-Methoden wurden an dem Gerät „JASCO HPLC 2000“, mit den Säulen „Reprosil 100-C18 5 μ (analytisch)“ und „Reprosil C18-PQ 5 μ (semi-präparativ)“ durchgeführt. Es wurden Flussraten von 1ml/min für die analytischen und 5 ml/min für die präparativen Anwendungen gewählt, als Laufmittel dienten 0,1% TFA in Wasser, sowie 0,1% TFA in Acetonitril. Sofern nicht anders angegeben wurde entweder mit einem linearen Gradienten (45 Minuten) von 0 bis 100 Prozent Acetonitril in Wasser, oder von 0 bis 60 Prozent eluiert.

Recycling-Gelpermeationschromatographie

Die Aufreinigung der hergestellten Verbindungen durch recycling-GPC wurde an dem Gerät „*prominence*“ der Firma Shimadzu mit analysenreinem Chloroform als Eluent durchgeführt.

Peptid-Synthesizer

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Peptide mittels Mikrowellen-unterstütztem automatischem Peptid-Synthesizer „Liberty“ der Firma CEM hergestellt (siehe hierzu auch Kapitel 5.3.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften).

5.2 Allgemeine Experimentelle Bedingungen

Lösungsmittel

Die verwendeten Solventien wurden in den Reinheitsgraden zur Analyse (p.A.) bzw. „Chromasolv“ von den Firmen Sigma-Aldrich und Acros bezogen.

Schutzgas

Als Inertgas wurde Argon der Firma Linde verwendet.

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Roth, Acros, Iris Biotech, Endotherm, Serva, sowie VWR bezogen und sofern nicht explizit angegeben ohne weitere Aufreinigung verwendet. Weiterhin wurden die verwendeten Polyethylenglycole von Jenkem Technology (heterobifunktionell) und Sigma-Aldrich (monofunktionell), sowie die verwendeten Peptide von Biomatik und Genscript bezogen und ebenfalls nicht weiter aufgereinigt. Fmoc-geschützte Aminosäuren wurden bei der Firma Merck erworben.

Dünnschichtchromatographie

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien 60 F254 der Fa. E. Merck verwendet. Die Detektion der Chromatographie Zonen erfolgte durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sowie durch Eigenfluoreszenz bei 366 nm. Weiterhin wurde mit Iod oder einer Ninhydrin-Lösung in Ethanol angefärbt. Bei Farbgebung mit ethanolischer Ninhydrin-Lösung wurde zusätzlich mit einem Heißluft Fön erhitzt.

Präparative Säulenchromatographie

Als stationäre Phase wurde Flash-Kieselgel der Korngröße 0,040 - 0,063 mm benutzt. Als Eluenten dienten analysenreine Solventien.

Präparative Gelpermeationschromatographie

Als stationäre Phase wurde das GPC-Material „Bio-Bads S-X“ der Firma Bio-Rad benutzt. Als Eluent wurde analysenreines Dichlormethan verwendet.

SDS-Gelelektrophorese

Alle Gelelektrophoresen wurden an Geräten der Firma Invitrogen und Bio-Rad durchgeführt. Dabei wurden vorgefertigte Tricin-Gele mit passenden Puffern (ebenfalls Invitrogen) verwendet (Laufzeit von 90 Minuten mit einer angelegten Spannung von 125 Volt). Die zu analysierenden Peptide wurden mittels einer Coomassie-Blau-Lösung (Invitrogen) für 30 min, die PEGs durch aufeinander folgende Behandlung mit 0,1 molarer Perchlorsäure (15 min) und 0,1 molarer Bariumiodid-Lösung (15 min) selektiv angefärbt^[107] und anschließend mehrere Stunden in Wasser gespült.

Entsalzung von Peptiden

Entsalzung der hergestellten Peptide erfolgte mittels „Sep-Pak Plus C18“-Kartuschen der Firma Waters, mit C18 reversed-phase-Material als stationäre und einer Mischung aus Wasser und Methanol als mobile Phase.

5.3 Beschreibung der Synthesen

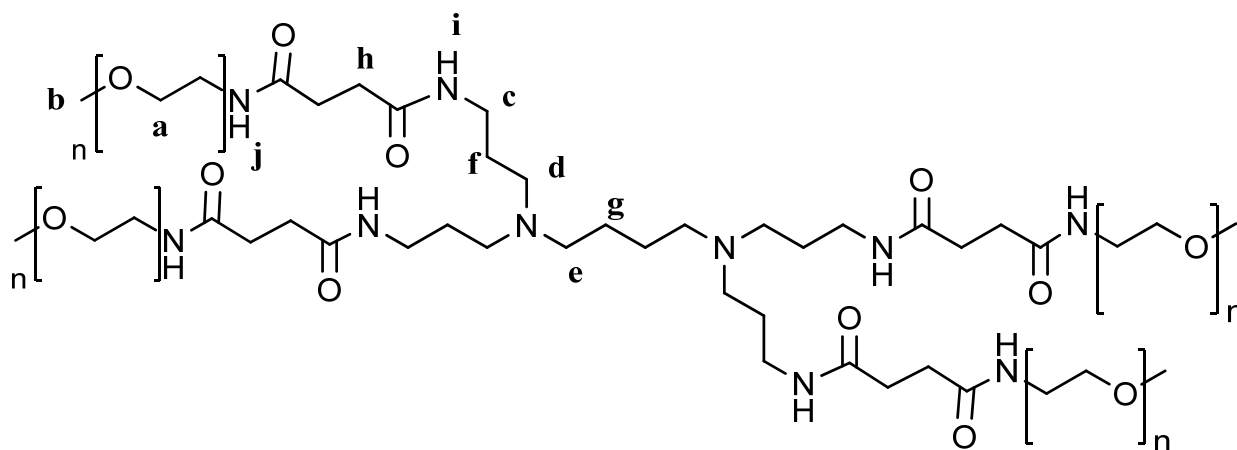
5.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

5.3.1.1 *Protokoll zur Peptid-Festphasen-Synthese*

Alle Aminosäuren der Peptidsequenz werden mittels Fmoc-Chemie an das jeweilige Harz gekuppelt, welches man vorab für 1 Stunde in DMF quellen lässt. Abspaltung der n-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der Aminosäuren erfolgt mittels Piperidin (20%; manuelle Synthese) oder Piperazin (5%; automatische Synthese) in DMF. Die Aktivierung des ungeschützten C-Terminus der zu kuppelnden Aminosäure erfolgt mittels drei Äquivalenten O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate und 1-Hydroxybenzotriazole (manuelle Synthese)/ Ethyl cyanoglyoxylat-2-oxim (automatische Synthese) in DMF, sowie drei Äquivalenten Diisopropylethylamin zur Aktivierung des ungeschützten n-Terminals Amins. Zwischen allen Entschützungs- und Kupplungsschritten wird das Harz intensiv mit DMF und DCM gewaschen. Abspaltung des fertigen Peptids vom Harz erfolgt mittels einer Mischung aus 95:2,5:2,5 Trifluoressigsäure/H₂O/Triisopropylsilan. Alle Entschützungs- und Kupplungsschritte werden bei der manuellen Synthese durch Anfärbung mit Ninhydrin-Lösung kontrolliert. Alle Peptide wurden mittels NMR- und Massenspektrometrie untersucht. Die Zuordnung der einzelnen Signale im ¹H- und ¹³C-NMR erfolgte mittels H,H-COSY, HMBC, HSQC, TOCSY und ¹⁵N,H-Korrelations-Messungen.

5.3.2 Biokonjugat mit dendritischem-Kern

5.3.2.1 Synthese von (Me-PEG)₄-N-DAB-Am-4 (1)



293 mg (0,15 mmol; 8 eq) *O*-Methyl-*O'*-[(*N*-succinimidyl)succinyl-aminoethyl]polyethylenglycol (Me-PEG-NHS-Ester, Molekulargewicht ungefähr 2000 g/mol), 5,9 mg (0,018 mmol) *N,N,N,N*-Tetrakis(3-aminopropyl)-1,4-butandiamin (Dab-Am-4) und 7,6 mg (0,08 mmol, 4 eq) Triethylamin werden in 2 ml Dichlormethan (DCM) gelöst und für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Produkt in eiskaltem Diethylether ausgefällt, abgesaugt und im Hoch-Vakuum getrocknet. Zur Entfernung der Lösemittelreste wird das Produkt anschließend mit Wasser gefriergetrocknet. Aufreinigung erfolgt mittels recycling-GPC, wobei die einzelnen Fraktionen durch MALDI-ToF-MS untersucht werden

Ausbeute:

48 mg gelblicher Feststoff (32%)

¹H-NMR-Spektrum (700 MHz, DMSO-d₆, 293 K):

δ [ppm] : 7,51 (s; 4 H, **j**), 6,94 (s, 4 H, **i**), 3,7-3,5 (m, 755 H, **a**), 3,33 (s, 12 H, **b**), 3,25-3,27 (m, 8 H, **c**), 2,61-2,68 (m, 12 H, **d,e**), 2,49 (m, 16 H, **h**), 1,73-1,77 (m, 8 H, **f**), 1,60-1,63 (m, 4 H, **g**)

Alle Aminosäuren der Peptid-Sequenz werden nach 5.3.1 mittels manueller Peptid-Festphasensynthese an ein Rink-Amid-Harz (0,1 mmol) gekuppelt. Abspaltung erfolgt mit einer Mischung aus 95:2,5:2,5 TFA/H₂O/TIS. Danach wird das Produkt in eiskaltem Diethylether ausgefällt, im Hochvakuum getrocknet und anschließend mittels reversed-phase-Kartuschen entsalzt.

Ausbeute:

72 mg (0,083 mmol) weißer Feststoff (83,3 %)

¹H-NMR-Spektrum (700 MHz, DMSO-d₆, 293 K):

δ [ppm] : 8,55 (t, J = 6,44 Hz, 1 H, **q**), 7,93 (d, J = 7,92, 1 H, **m**), 7,89 (d, J = 7,51, 2 H, **x**), 7,72 (m, 2 H, **u**), 7,65 (m, 7 H, **h,a**), 7,57 (d, J = 8,66, 1 H, **r**), 7,41 (t, J = 7,39, 2 H, **w**), 7,32 (t, J = 7,33, 2 H, **v**), 7,22 (s, 1 H, **g**), 7,03 (s, 1 H, **g**), 4,56-4,10 (m, 10 H, **f,i,n,p,s,t**), 3,69-3,46 (m, 4 H, **l**), 2,85 (m, 1 H, **o**), 2,73 (m, 4 H, **b**), 2,65 (m, 1 H, **o**), 2,26-1,86 (m, 11 H, **j,e,y**), 1,68-1,49 (m, 8 H, **c,k**), 1,35-1,25 (m, 4 H, **d**)

¹³C-NMR-Spektrum (175 MHz, DMSO-d₆, 293 K, spinecho):

δ [ppm] : 173,82 (NH₂-C=O); 171,67 (NH-C=O); 171,05 (NH-C=O); 170,81 (NH-C=O); 170,56 (NH-C=O); 169,71 (NH-C=O); 156,48 (O-C=O); 144,26 (Ar-C-R, 2 C); 141,20 (Ar-C-R, 2 C); 128,15 (Ar-CH, 2 C); 127,56 (Ar-CH, 2 C); 125,79 (Ar-CH, 2 C); 120,61 (Ar-CH, 2 C); 66,27 (R-CH₂-O); 60,14 (R₂-CH-NH); 58,06 (R₂-CH-NH); 54,84 (R₂-CH-NH); 52,29 (R₂-CH-NH); 50,61 (R₂-CH-NH); 47,26 (R₂N-CH₂-R, 2 C); 47,10 (R₂-CH-CH₂-O); 40,53 (S-CH₂-NH); 39,24 (R-CH₂-NH₂); 39,18 (R-CH₂-NH₂); 33,03 (S-CH₂-CR₂); 31,77 (R₂N-CH₂-CH₂-CH₂-R, 2 C); 29,32 (R₂N-CH₂-CH₂-CH₂-R, 2 C); 27,11 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, 2 C); 24,95 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, 2 C); 23,04 (NH-CO-CH₃); 22,62 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, 2 C)

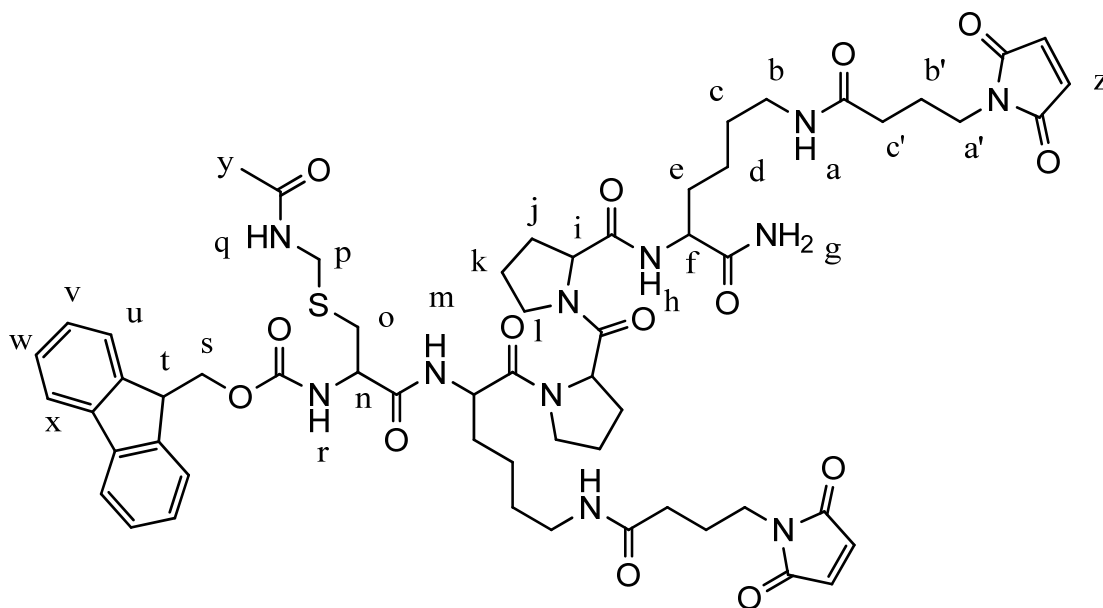
FT-IR:

ν [cm^{-1}]: 2920, 1662, 1626, 1529, 1448, 1323, 1248, 1200, 1176, 1128, 1043, 833, 798, 762, 741, 721

MALDI-ToF-MS (+) (α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHCA)):

$[\text{M} + \text{Na}]^+ = 886,41 \text{ m/z}$ (Ber. : 886,43 m/z)

5.3.3.2 Synthese von *N*- α -Fluorenylmethoxycarbonyl -Cys(*S*-Acetamidomethyl)-Lys(4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-*N*- ϵ -butanamid)-Pro-Pro-Lys(4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-*N*- ϵ -butanamid)-NH₂ (5)



30,1 mg **4** (0,035 mmol), 9 mg DIPEA (2 eq; 0,069 mmol) und 77,8 mg (8 eq; 0,28 mmol) *N*-(γ -Maleimidobutyryloxy)succinimid (GMBS) werden in 2 ml trockenem DMF gelöst und für 48 Stunden bei RT gerührt. Das Produkt wird in eiskaltem Diethylether ausgefällt und im

Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird das Produkt mittels reversed-phase-Kartuschen entsalzt.

Ausbeute:

29,3 mg (0,025 mmol) weißer Feststoff (70,1%)

¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-d₆, 293 K):

δ [ppm] : 8,56 (t, J = 6,54 Hz, 1 H, **q**), 7,90-7,88 (m, 3 H, **x,m**), 7,74-7,57 (m, 6 H, **u,r,h,a**), 7,41 (t, J = 7,41, 2 H, **w**), 7,32 (t, J = 7,38, 2 H, **v**), 7,21 (s, 1 H, **g**), 6,99-6,97 (m, 5 H, **g,z**), 4,55-4,08 (m, 10 H, **f,i,n,p,s,t**), 3,67-3,38 (m, 8 H, **l,a'**), 2,96 (m, 4 H, **b**), 2,89 (m, 1 H, **o**), 2,72 (m, 1 H, **o**), 2,12-1,86 (m, 11 H, **j,e,y,c'**), 1,72-1,24 (m, 16 H, **c,d,k,b'**)

¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, DMSO-d₆, 293 K):

δ [ppm] : 177,34 (NH₂-C=O); 172,53 (NH-C=O); 171,15 (NH-C=O, 2 C); 170,98 (O=C-NR-C=O; 4 C); 170,44 (NH-C=O); 170,22 (NH-C=O); 170,06 (NH-C=O); 166,38 (NH-C=O); 155,69 (O-C=O); 143,81 (Ar-C-R, 2 C); 140,66 (Ar-C-R, 2 C); 134,40 (O=C-CH=CH-C=O, 4 C); 127,60 (Ar-CH, 2 C); 127,05 (Ar-CH, 2 C); 125,26 (Ar-CH, 2 C); 120,06 (Ar-CH, 2 C); 74,99 (R-CH₂-O); 69,74 (R₂-CH-NH); 68,24 (R₂-CH-NH); 65,81 (R₂-CH-NH); 55,15 (R₂-CH-NH); 50,33 (R₂-CH-NH); 48,54 (R₂-CH-CH₂-O); 46,62 (R₂N-CH₂-R, 2 C); 40,93 (S-CH₂-NH); 38,37 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=O, 2 C); 36,86 (O=C-CH₂-CH₂-CH₂-NR₂; 2 C); 33,98 (S-CH₂-CR₂); 32,57 (O=C-CH₂-CH₂-CH₂-NR₂; 2 C); 32,55 (R₂N-CH₂-CH₂-CH₂-R, 2 C); 30,56 (R₂N-CH₂-CH₂-CH₂-R, 2 C); 28,78 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=O, 2 C); 24,34 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=O, 2 C); 24,14 (O=C-CH₂-CH₂-CH₂-NR₂; 2 C); 22,64 (NH-CO-CH₃); 22,54 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=O, 2 C)

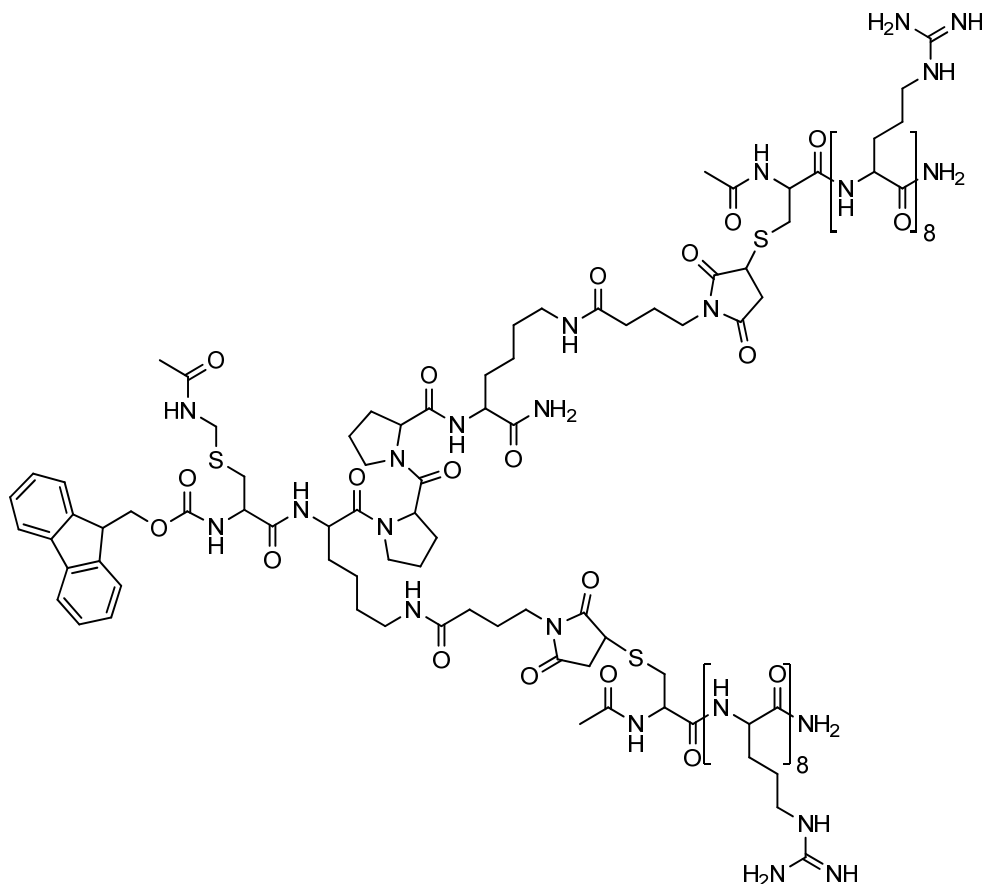
HPLC (linearer Gradient 0-60 % Acetonitril mit 0,1% TFA):

Retentionszeit: 34,5 Minuten mit Elution bei 43,1% Acetonitril

MALDI-ToF-MS (+) (Dithranol):

[M + Na]⁺ = 1217,19 m/z (Ber. : 1216,51 m/z)

5.3.3.3 Synthese von N- α -Fluorenylmethoxycarbonyl-Cys(S-Acetamidomethyl)-Lys(4-(3-(S- ϵ (N- α -acetamidomethyl-Cys-Arg₈-NH₂))-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-N- ϵ -butanamid)-Pro-Pro-Lys(4-(3-(S- ϵ (N- α -acetamido-Cys-Arg₈-NH₂))-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-N- ϵ -butanamid)-NH₂ (6)



9,8 mg **5** (0,008 mmol) und 34,6 mg N- α -Acetamidyl-CR₈-COOH (3 eq; 0,025 mmol) werden in 2 ml DMF gelöst und für 48 Stunden bei RT gerührt. Das Produkt wird in eiskaltem Diethylether ausgefällt und im Hochvakuum getrocknet. Aufreinigung und Reaktionskontrolle erfolgt mittels reversed-phase HPLC.

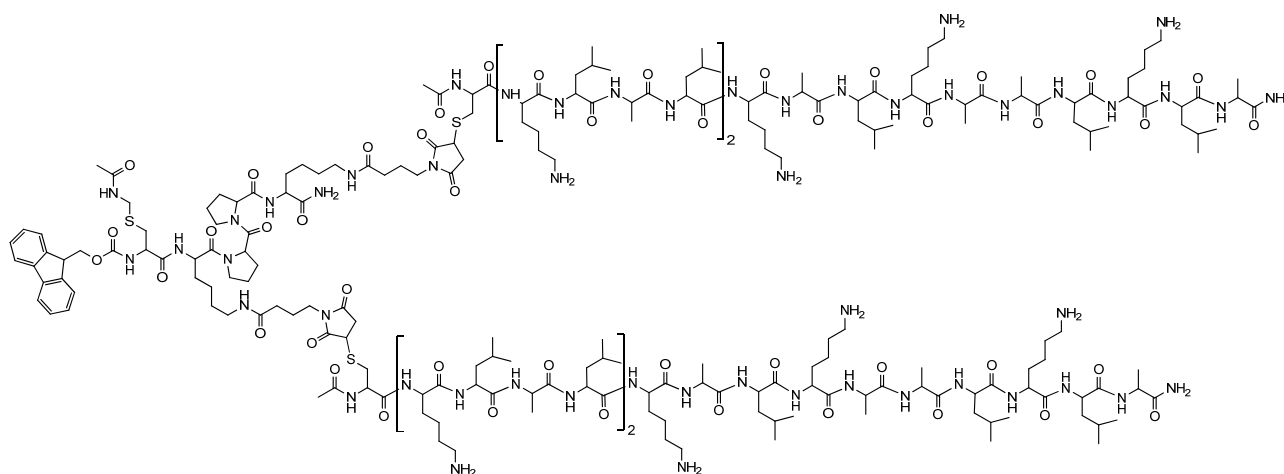
HPLC (linearer Gradient 0-60% Acetonitril mit 0,1 % TFA):

Retentionszeit: 23,08 Minuten mit Elution bei 30,8 % Acetonitril

MALDI-ToF-MS (+) (CHCA, linearer Modus):

$[M + Na]^+ = 4009,5 \text{ m/z}$ (Ber. : 4015,23 m/z)

5.3.3.4 Synthese von *N*- α -Fluorenylmethoxycarbonyl-Cys(*S*-Acetamidomethyl)-Lys(4-(3-(*S*- ϵ (*N*- α -Acetamidomethyl-Cys-Lys-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-NH₂))-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-*N*- ϵ -butanamid)-Pro-Pro-Lys(4-(3-(*S*- ϵ (*N*- α -Acetamidomethyl-Cys-Lys-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Leu-Lys-Ala-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-NH₂))-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-*N*- ϵ -butanamid)-NH₂ (7)

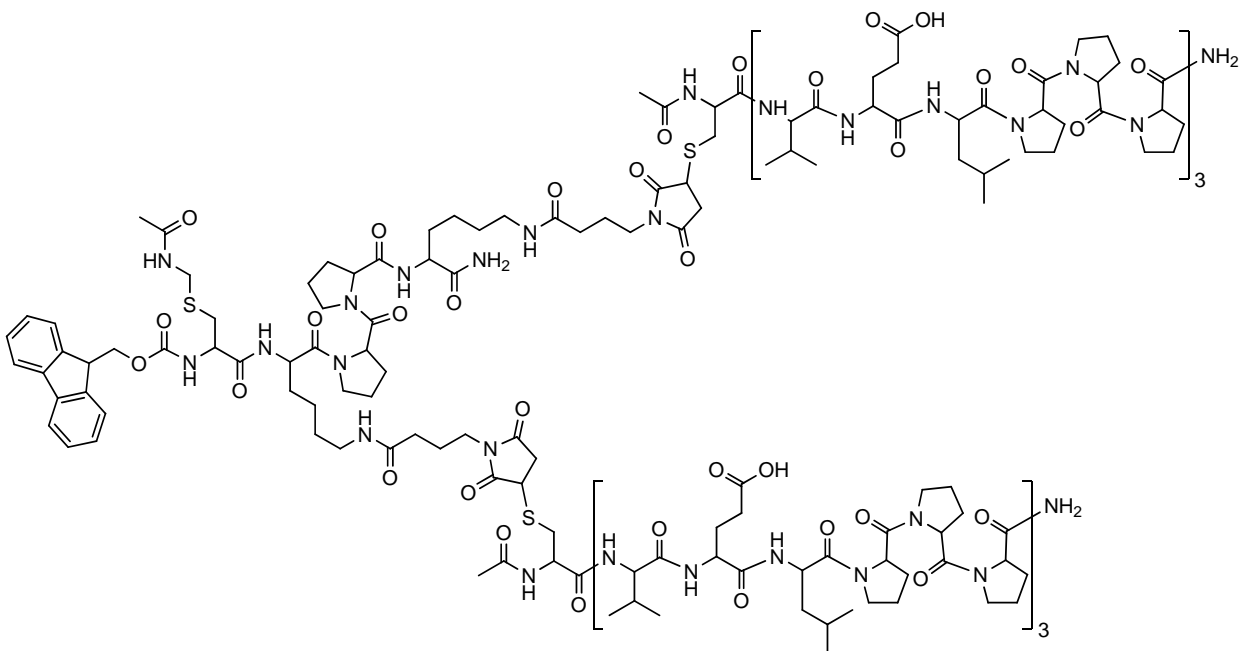


9,8 mg **5** (0,008 mmol) und 49,6 mg *N*- α -Acetamidyl-CKLALKLALKALKKAALKLA-NH₂ (3 eq; 0,025 mmol) werden in 2 ml DMF gelöst und für 96 Stunden bei RT gerührt. Das Produkt wird in eiskaltem Diethylether ausgefällt und im Hochvakuum getrocknet. Reaktionskontrolle erfolgt mittels reversed-phase HPLC.

MALDI-ToF-MS (+) (CHCA):

$[M + Na]^+ = 5259,80 \text{ m/z}$ (Ber. : 5259,18 m/z)

5.3.3.5 Synthese von *N*- α -Fluorenylmethoxycarbonyl-Cys(*S*-Acetamidomethyl)-Lys(4-(3-(*S*- ϵ (*N*- α -Acetamidomethyl-Cys-Val-Glu-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-Glu-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-Glu-Leu-Pro-Pro-Pro-NH₂))-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-*N*- ϵ -butanamid)-Pro-Pro-Lys(4-(3-(*S*- ϵ (*N*- α -Acetamidomethyl-Cys-Val-Glu-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-Glu-Leu-Pro-Pro-Pro-NH₂))-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-*N*- ϵ -butanamid)-NH₂ (8)



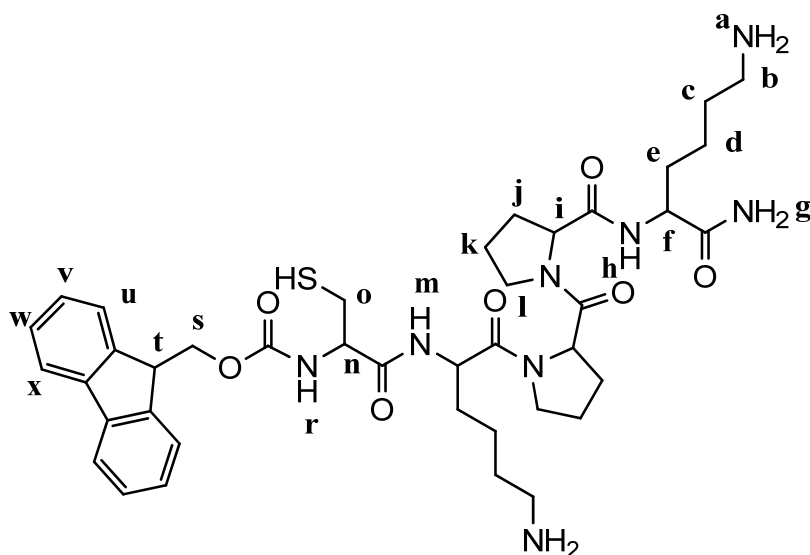
9,8 mg **5** (0,008 mmol) und 50,5 mg *N*- α -Acetamidyl-CVELPPPVELPPPVELPPP-NH₂ (3 eq; 0,025 mmol) werden in 2 ml DMF gelöst und für 96 Stunden bei RT gerührt. Das Produkt wird in eiskaltem Diethylether ausgefällt und im Hochvakuum getrocknet. Aufreinigung und Reaktionskontrolle erfolgt mittels reversed-phase HPLC.

HPLC (linearer Gradient 0-60% Acetonitril mit 0,1 % TFA):

Retentionszeit: 43,3 Minuten mit Elution bei 57,7 % Acetonitril

MALDI-ToF-MS (+) (CHCA):

$[M + Na]^+ = 5339,14 \text{ m/z}$ (Ber. : 5337,73 m/z)

5.3.3.6 Synthese von *N*- α -Fluorenylmethoxycarbonyl-Cys-Lys-Pro-Pro-Lys-NH₂ (9)

23,7 mg (0,027 mmol) **4** werden in 10%ger Essigsäure gelöst und der pH-Wert mit Eisessig auf 4.0 eingestellt. Anschließend werden 87,4 mg (10 eq; 0,27 mmol) Quecksilber(II)Acetat zugegeben und 3h bei RT gerührt. Zur Reaktionsmischung werden 42,9 mg (20 eq; 0,55 mmol) β -Mercaptoethanol gegeben und der ausgefallene Feststoff nach 5 Stunden abzentrifugiert. Der Überstand wird entsalzt und abschließend Gefriergetrocknet.

Ausbeute:

21 mg (0,026 mmol) weißer Feststoff (98,1 %)

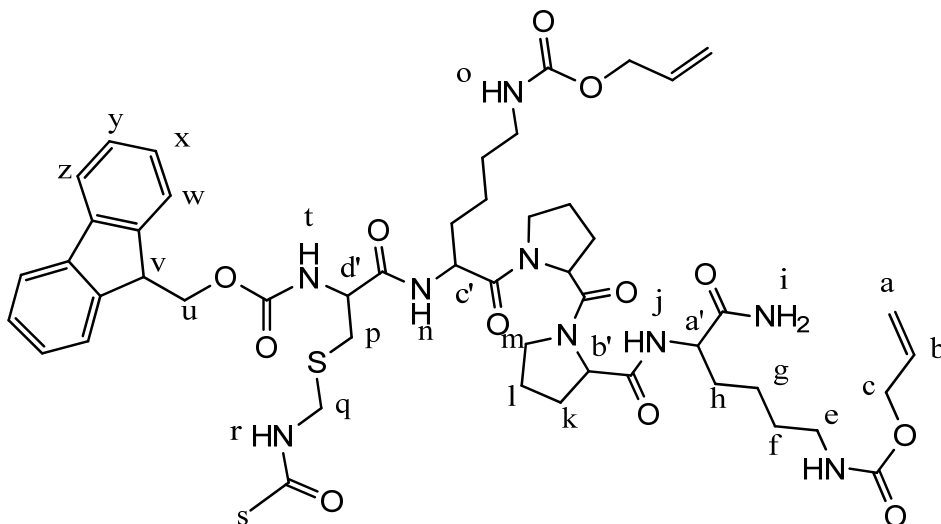
¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-d₆, 293 K):

δ [ppm] : 7,91 (d, $J = 7,29$, 2 H, **x**), 7,85 (m, 1 H, **m**), 7,73 (m, 2 H, **u**), 7,65 (m, 1 H, **h**), 7,50 (m, 1 H, **r**), 7,43 (t, $J = 7,37$, 2 H, **w**), 7,34 (t, $J = 7,47$, 2 H, **v**), 7,24 (s, 1 H, **g**), 7,07 (s, 1 H, **g**), 5,24 (m, 4 H, **a**), 4,60-4,12 (m, 8 H, **f+i+n+s+t**), 3,71-3,46 (m, 4 H, **l**), 2,73 (m, 6 H, **b+o**), 2,15-1,88 (m, 8 H, **j+e**), 1,68-1,50 (m, 8 H, **c+k**), 1,23 (m, 4 H, **d**)

MALDI-ToF-MS (+) (CHCA):

$[M + K]^+ = 831,62 \text{ m/z}$ (Ber. : 831,36 m/z)

5.3.3.7 Synthese von *N*- α -Fluorenylmethoxycarbonyl-Cys(*S*-Acetamidomethyl)-Lys(*N*- ϵ -Allyloxycarbonyl)-Pro-Pro-Lys(*N*- ϵ -Allyloxycarbonyl)-NH₂ (10)



Das Peptid wird nach 5.3.1 mittels automatischem Peptid-Synthesizer an ein Rink-Amid-Harz (0,5 mmol) gekuppelt. Abspaltung vom Harz erfolgt mit einer Mischung aus 95:2,5:2,5 TFA/H₂O/TIS. Danach wird das Produkt in eiskaltem Diethylether ausgefällt, im Hochvakuum getrocknet und anschließend mittels reversed-phase-Kartuschen entsalzt.

Ausbeute:

249 mg (0,24 mmol) gelblicher Feststoff (48 %)

R_f (MeOH 1 : EtAc 5): 0,2

¹H-NMR-Spektrum (700 MHz, DMSO-d₆, 293 K):

δ [ppm] : 8,56 (t, J = 6,54 Hz, 1 H, **r**), 7,91 (d, J = 7,37 Hz, 2 H, **z**), 7,89 (m, 1 H, **n**), 7,73 (m, 2 H, **w**), 7,66 (d, J = 7,8 Hz, 1 H, **j**), 7,60 (d, J = 8,61 Hz, 1 H, **t**), 7,43 (t, J = 7,56 Hz, 2 H, **y**), 7,33 (t, J = 7,21 Hz, 2 H, **x**), 7,23 (s, 1 H, **i**), 7,15 (m, 2 H, **o**), 7,00 (s, 1 H, **i**), 5,90 (m, 2 H, **b**), 5,27 (m, 2 H, **a**), 5,16 (m, 2 H, **a**), 4,56-4,10 (m, 14 H, **c,a',b',c',d',q,u,v**), 3,69-3,51 (m, 4 H, **m**), 2,95 (m, 4 H, **e**), 2,88-2,65 (m, 2 H, **p**), 2,14-1,80 (m, 11 H, **l,h,s**), 1,64-1,48 (m, 4 H, **k**), 1,38-1,25 (m, 8 H, **f,g**)

¹³C-NMR-Spektrum (175 MHz, DMSO-d₆, 293 K, spinecho):

δ [ppm] : 173,49 (NH₂-C=O); 171,5 (NH-C=O); 170,30 (NH-C=O); 170,26 (NH-C=O); 169,94 (NH-C=O); 169,39 (NH-C=O); 155,98 (O-C=O); 155,84 (O-C=O, 2 C); 143,74 (Ar-C-R, 2 C); 140,69 (Ar-C-R, 2 C); 133,83 (Ar-CH, 2 C); 127,62 (Ar-CH, 2 C); 127,06 (Ar-CH, 2 C); 125,28 (Ar-CH, 2 C); 120,09 (R-CH=CH₂, 2 C); 116,83 (R-CH=CH₂, 2 C); 65,76 (R-CH₂-O); 64,08 (R-O-CH₂-CH=CH₂, 2 C); 59,44 (R₂-CH-NH); 57,57 (R₂-CH-NH); 54,31 (R₂-CH-NH); 52,12 (R₂-CH-NH); 50,39 (R₂-CH-NH); 46,71 (R₂N-CH₂-R, 2 C); 46,60 (R₂-CH-CH₂-O); 40,18 (R-CH₂-NH-C=O); 40,02 (S-CH₂-NH); 32,56 (S-CH₂-CR₂); 31,56 (R₂N-CH₂-CH₂-CH₂-R); 30,68 (R₂N-CH₂-CH₂-CH₂-R); 29,09 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=O, 2 C); 28,68 (R₂N-CH₂-CH₂-CH₂-R); 27,89 (R₂N-CH₂-CH₂-CH₂-R); 24,48 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=O); 24,42 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=O); 22,55 (NH-CO-CH₃); 22,50 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=O); 22,20 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=O);

FT-IR:

ν [cm^{-1}]: 3296, 2943, 1657, 1630, 1527, 1442, 1373, 1326, 1248, 1203, 1132, 1038, 995, 926, 837, 800, 762, 742, 721

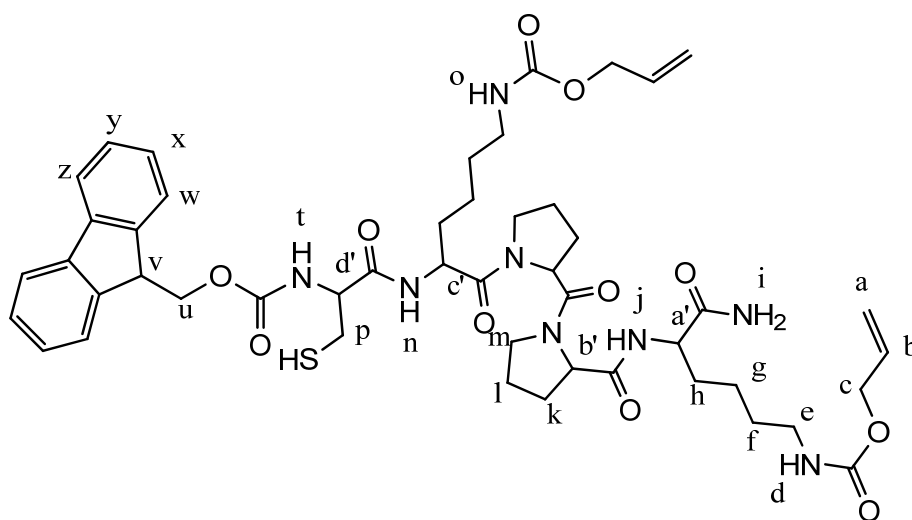
HPLC (linearer Gradient 0-60% Acetonitril mit 0,1% TFA in 40 min):

Retentionszeit 37,7 Minuten mit Elution bei 56,6% Acetonitril

MALDI-ToF-MS (+) (CHCA):

$[\text{M} + \text{Na}]^+ = 1055,32 \text{ m/z}$ (Ber. : 1054,47 m/z)

5.3.3.8 Synthese von *N*- α -Fluorenylmethoxycarbonyl-Cys-Lys(*N*- ϵ -Allyloxycarbonyl)-Pro-Pro-Lys(*N*- ϵ -Allyloxycarbonyl)-NH₂ (11)



20 mg (0,02 mmol) **10**, sowie 497,8 mg (100 eq; 1,9 mmol) Silbertrifluormethansulfonat werden in 10 ml 99:1 TFA/Anisol gelöst und für 3 Stunden bei 0°C gerührt. Das Produkt wird in Diethylether ausgefällt, im Hochvakuum getrocknet und im Anschluss zusammen mit 10,5

mg (5 eq; 0,1 mmol) 1,3-Propandithiol in 5 ml Methanol für 6 Stunden gerührt. Danach wird die Reaktionsmischung zur Trockene ein rotiert und mittels reversed-phase-Kartuschen entsalzt.

Ausbeute:

15,6 mg (0,016 mmol) gelblicher Feststoff (81%)

R_f (MeOH 1 : EtAc 5): 0,3

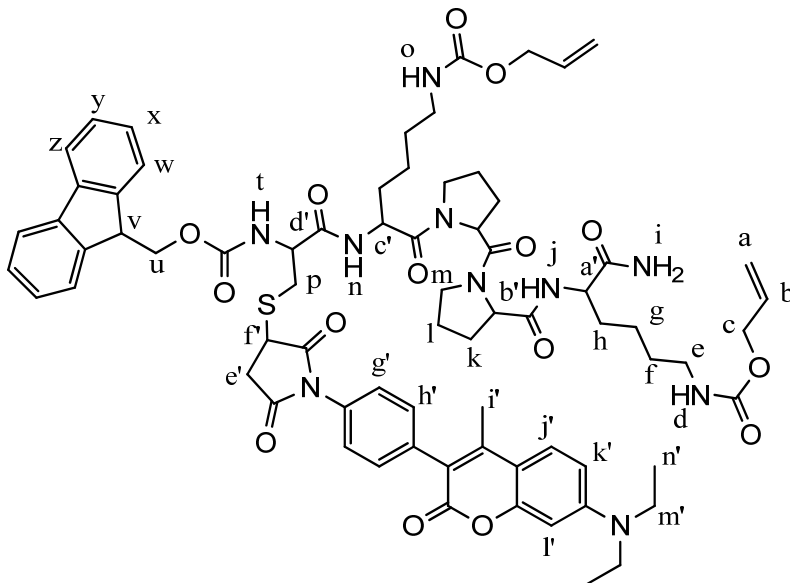
¹H-NMR-Spektrum (700 MHz, DMSO-d₆, 293 K):

δ [ppm] : 8,06 (d, J = 7,45 Hz, 1 H, **n**), 7,90 (d, J = 7,36 Hz, 2 H, **z**), 7,72-7,63 (m, 3 H, **w,j**), 7,53 (d, J = 8,31 Hz, 1 H, **t**), 7,42 (t, J = 7,30 Hz, 2 H, **y**), 7,32 (t, J = 7,34 Hz, 2 H, **x**), 7,22 (s, 1 H, **i**), 7,14 (m, 2 H, **o**), 6,98 (s, 1 H, **i**), 5,95-5,82 (m, 2 H, **b**), 5,28-5,12 (m, 4 H, **a**), 4,53-4,07 (m, 12 H, **c,a',b',c',d',u,v**), 3,69-3,48 (m, 4 H, **m**), 2,94 (m, 4 H, **e**), 2,82-2,59 (m, 2 H, **p**), 2,08-1,86 (m, 8 H, **l,h**), 1,48-1,23 (m, 12 H, **f,g,k**)

MALDI-ToF-MS (+) (CHCA):

[M + Na]⁺ = 984,39 m/z (Ber. : 983,43 m/z)

5.3.3.9 Synthese von *N*-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-Cys(3-S-1-(4-(7-(diethylamino)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)phenyl)-pyrrolidine-2,5-dione)-Lys(*N*-ε-Allyloxycarbonyl)-Pro-Pro-Lys(*N*-ε-Allyloxycarbonyl)-NH₂ (12)



15,6 mg (0,016 mmol) **11**, 18,7 mg (3 eq; 0,048 mmol) 7-Diethylamino-3-(4-maleimidophenyl)-4-methylcoumarin werden in 2 ml trockenem DMF gelöst und für 24 h bei RT gerührt. Der Umsatz der Reaktion wird mittels DC verfolgt. Das Produkt wird anschließend in Diethylether ausgefällt und im Hochvakuum getrocknet. Aufreinigung des Reaktionsgemisches erfolgt mittels präparativer GPC und reversed-phase HPLC.

Ausbeute:

6 mg (0,004 mmol) gelblicher Feststoff (27,5 %)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (700 MHz, DMSO- d_6 , 293 K):

δ [ppm] : 7,90 (d, $J = 7,47$ Hz, 2 H, **z**), 7,75-7,64 (m, 4 H, **w,j,n**), 7,60 (d, $J = 8,93$ Hz, 1 H, **t**), 7,44-7,37 (m, 5 H, **y,h',j'**), 7,34-7,30 (m, 4 H, **x,g'**), 7,23 (s, 1 H, **i**), 7,12 (m, 2 H, **o**), 6,99 (s, 1 H, **i**), 6,77-6,73 (dd, $^2J = 9,13$ Hz, $^3J = 2,36$ Hz, 1 H, **k'**), 6,57 (d, $^3J = 2,29$ Hz, 1 H, **l'**), 5,95-5,81 (m, 2 H, **b**), 5,27-5,12 (m, 4 H, **a**), 4,53-4,14 (m, 12 H, **c,a',b',c',d',u,v**), 3,75-3,57 (m, 4 H, **m**), 3,47 (m, 4 H, **m'**), 2,93 (m, 4 H, **e**), 2,79-2,63 (m, 2 H, **p**), 2,21 (s, 3 H, **i'**), 1,87-1,78 (m, 8 H, **l,h**), 1,68-1,55 (m, 12 H, **f,g,k,n'**)

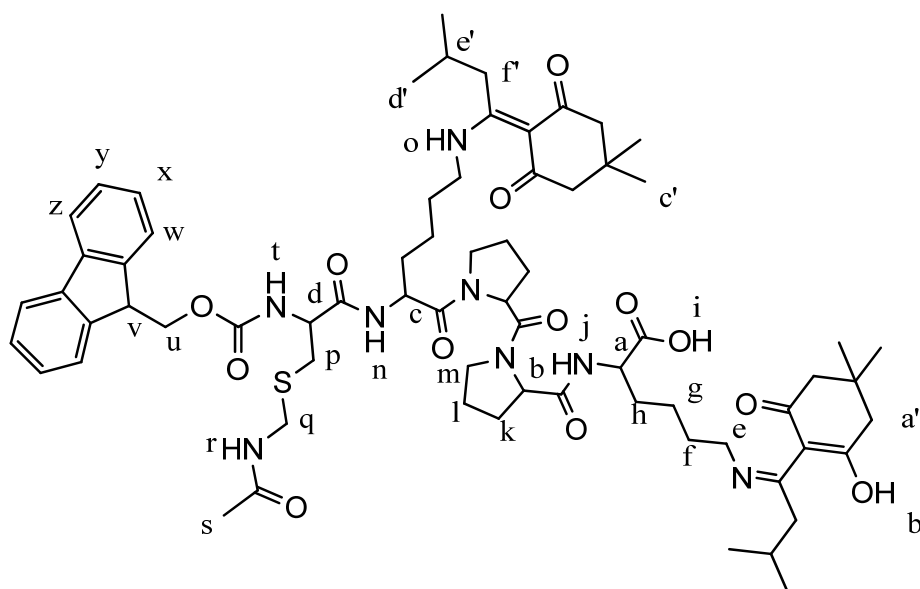
HPLC (linearer Gradient 0-60 % Acetonitril mit 0,1% TFA in 5 min, 60-100 % Acetonitril mit 0,1% TFA in 40 min):

Retentionszeit 18,7 Minuten mit Elution bei 73,7 % Acetonitril

MALDI-ToF-MS (+) (CHCA):

$[M + Na]^+ = 1386,56 \text{ m/z}$ (Ber. : 1386,59 m/z)

5.3.3.10 Synthese von *N*- α -Fluorenylmethoxycarbonyl-Cys(*S*-Acetamidomethyl)-Lys(*N*- ϵ -1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbuty)-Pro-Pro-Lys(*N*- ϵ -1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbuty)-NH₂ (14)



Das Peptid wird nach 5.3.1 mittels automatischem Peptid-Synthesizer an ein Fmoc-Lys(ivDde)-Wang-Harz (0,1 mmol) gekuppelt. Die Abspaltung vom Harz erfolgt mit einer Mischung aus 95:2,5:2,5 TFA/H₂O/TIS. Danach wird das Produkt in eiskaltem Diethylether

ausgefällt, im Hochvakuum getrocknet und anschließend mittels reversed-phase-Kartuschen entsalzt.

Ausbeute:

76,8 mg (0,06 mmol) gelblicher Feststoff (60,1 %)

R_f (MeOH 1 : Acetonitril 2): 0,5

¹H-NMR-Spektrum (700 MHz, DMSO-d₆, 293 K):

δ [ppm] : 13,58 (m, 2 H, **b'**), 12,56 (s, 1 H, **i**), 8,54 (t, J = 6,35 Hz, 1 H, **r**), 7,99 (d, J = 7,88 Hz, 1 H, **j**), 7,93 (d, J = 7,78 Hz, 1 H, **n**), 7,89 (d, J = 7,44 Hz, 2 H, **z**), 7,72 (d, J = 7,31 Hz, 2 H, **w**), 7,61 (d, J = 8,5 Hz, 1 H, **t**), 7,41 (t, J = 7,36 Hz, 2 H, **y**), 7,31 (t, J = 7,31 Hz, 2 H, **x**), 4,55-4,09 (m, 10 H, **a,b,c,d,q,u,v**), 3,67-3,51 (m, 4 H, **m**), 2,94 (m, 4 H, **e**), 2,86-2,66 (m, 2 H, **p**), 2,25 (m, 8 H, **a'**), 2,12-1,66 (m, 17 H, **k,h,s,e',f'**), 1,59-1,22 (m, 12 H, **f,g,l**), 0,93-0,85 (m, 24 H, **c',d'**)

¹³C-NMR-Spektrum (175 MHz, DMSO-d₆, 293 K, spinecho):

δ [ppm] : 175,17 (OH-C=O); 173,48 (NH-RCH=R; 2 C); 171,54 (NH-C=O); 170,25 (NH-C=O); 169,86 (NH-C=O); 169,71 (NH-C=O); 169,16 (NH-C=O); 155,94 (O-C=O); 143,72 (Ar-C-R, 2 C); 140,67 (Ar-C-R, 2 C); 133,83 (Ar-CH, 2 C); 127,62 (Ar-CH, 2 C); 127,06 (Ar-CH, 2 C); 125,28 (Ar-CH, 2 C); 106,08 (O=C-CH-C=O, 2 C); 65,80 (R-CH₂-O); 58,87 (R₂-CH-NH); 57,54 (R₂-CH-NH); 54,35 (R₂-CH-NH); 52,41 (R₃C-CH₂-C=O, 4 C); 51,40 (R₂-CH-NH); 50,06 (R₂-CH-NH); 46,76 (R₂N-CH₂-R); 46,59 (R₂-CH-CH₂-O); 46,53 (R₂N-CH₂-R); 42,83 (R-CH₂-NH-CR=CR₂); 39,93 (S-CH₂-NH); 36,16 (R₂CH-CH₂-C=CR₂); 32,51 (S-CH₂-CR₂); 31,44 (R₂N-CH₂-CH₂-CH₂-R); 30,62 (R₂N-CH₂-CH₂-CH₂-R); 30,58 ((CH₃)₂-C-(CH₂-R)₂, 2 C); 29,52 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-CR=CR₂, 2 C); 28,43 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-CR=CR₂, 2 C); 28,28 ((CH₃)₂-C-(CH₂-R)₂, 2 C); 27,85 (R₂N-CH₂-CH₂-CH₂-R, 2 C); 27,76 (R₂C-(CH₃)₂, 4 C); 24,48 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=O); 24,38 (R-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-CR=CR₂, 2 C); 22,55 (NH-CO-CH₃); 22,09 (R₂C-(CH₃)₂, 4 C)

FT-IR:

ν [cm^{-1}]: 3271, 2956, 2929, 2870, 1718, 1633, 1564, 1450, 1367, 1323, 1248, 1200, 1130, 1101, 1024, 1005, 823, 760, 742, 621

HPLC (linearer Gradient 0-100 % Acetonitril mit 0,1% TFA):

Retentionszeit: 36,4 Minuten mit Elution bei 80,9 % Acetonitril

MALDI-ToF-MS (+) (CHCA):

$[\text{M} + \text{Na}]^+ = 1300,06 \text{ m/z}$ (Ber. : 1299,67 m/z)

6 Literatur

- [1] J. Ferlay, P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet, P. Boyle, *Annals of Oncology* **2007**.
- [2] A. Persidis, *Nat Biotech* **1999**, *17*, 94-95.
- [3] M. M. Gottesman, *Cancer Research* **1993**, *53*, 747-754.
- [4] D. Shen, I. Pastan, M. M. Gottesman, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 268-275.
- [5] D. W. Shen, S. Goldenberg, I. Pastan, M. M. Gottesman, *J. Cell Physiol.* **2000**, *183*, 108-116.
- [6] Y. Y. Liu, T. Y. Han, A. E. Giuliano, M. C. Cabot, *FASEB J.* **2001**, *15*, 719-730.
- [7] M. M. Gottesman, T. Fojo, S. E. Bates, *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 48-58.
- [8] S. V. Ambudkar, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39*, 361-398.
- [9] M. Dean, A. Rzhetsky, R. Alliknets, *Genome Res.* **2001**, *11*, 1156-1166.
- [10] P. Borst, A. H. Schinkel, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **1996**, *32*, 985-990.
- [11] P. Borst, R. Evers, M. Kool, J. Wijnholds, *Journal of the National Cancer Institute* **2000**, *92*, 1295-1302.
- [12] E. G. Schuetz, W. T. Beck, J. D. Schuetz, *Mol. Pharmacol.* **1996**, *49*, 311-318.
- [13] G. Szakacs, J. K. Paterson, J. A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M. M. Gottesman, *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 219-234.
- [14] C. J. Chen, *Cell* **1986**, *47*, 371-380.
- [15] A. E. Senior, S. Bhagat, *Biochemistry* **1998**, *37*, 831-836.
- [16] L. van Zuylen, K. Nooter, A. Sparreboom, J. Verweij, *Investigational New Drugs* **2000**, *18*, 205-220.
- [17] J. L. Biedler, H. Riehm, *Cancer Research* **1970**, *30*, 1174-&.
- [18] A. P. Wolffe, in *Encyclopedia of Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., **2002**.

-
- [19] T. Tsuruo, *Cancer Science* **1988**, 79, 285-296.
- [20] M. Horio, M. M. Gottesman, I. Pastan, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1988**, 85, 3580-3584.
- [21] M. Horio, E. Lovelace, I. Pastan, M. M. Gottesman, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1991**, 1061, 106-110.
- [22] E. Logashenko, A. Vladimirova, M. Repkova, A. Venyaminova, E. Chernolovskaya, V. Vlassov, *ChemInform* **2005**, 36, no-no.
- [23] A. Stege, A. Krühn, H. Lage, *Vol. 596*, **2009**, pp. 447-465.
- [24] H. Lage, *Current Drug Targets* **2006**, 7, 813-821.
- [25] A. de Fougerolles, H.-P. Vornlocher, J. Maraganore, J. Lieberman, *Nat Rev Drug Discov* **2007**, 6, 443-453.
- [26] C. Nieth, A. Pribsch, A. Stege, H. Lage, *FEBS Letters* **2003**, 545, 144-150.
- [27] H. Wu, W. N. Hait, J.-M. Yang, *Cancer Research* **2003**, 63, 1515-1519.
- [28] R. Juliano, M. R. Alam, V. Dixit, H. Kang, *Nucleic Acids Research* **2008**, 36, 4158-4171.
- [29] N. Dias, C. A. Stein, *Molecular Cancer Therapeutics* **2002**, 1, 347-355.
- [30] R. Robinson, *PLoS Biol* **2004**, 2, e28.
- [31] P. A. Sharp, *Genes & Development* **2001**, 15, 485-490.
- [32] A. Aigner, *Journal of Biotechnology* **2006**, 124, 12-25.
- [33] M. T. McManus, P. A. Sharp, *Nat Rev Genet* **2002**, 3, 737-747.
- [34] P. J. Paddison, G. J. Hannon, *Cancer Cell* **2002**, 2, 17-23.
- [35] C. Dufès, I. F. Uchegbu, A. G. Schätzlein, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, 57, 2177-2202.
- [36] M. D. Brown, A. G. Schätzlein, I. F. Uchegbu, *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, 229, 1-21.
- [37] A. Pathak, S. Patnaik, K. C. Gupta, *Nucleic Acids Symposium Series* **2009**, 53, 57-58.
- [38] M. Zorko, Ü. Langel, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, 57, 529-545.
- [39] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, 55, 1189-1193.

-
- [40] M. Green, P. M. Loewenstein, *Cell* **1988**, *55*, 1179-1188.
- [41] K. M. Stewart, K. L. Horton, S. O. Kelley, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2008**, *6*, 2242-2255.
- [42] J. Oehlke, E. Krause, B. Wiesner, M. Beyermann, M. Bienert, *Protein Pept. Lett.* **1996**, *3*, 393-398.
- [43] R. Fischer, M. Fotin-Mleczek, H. Hufnagel, R. Brock, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2126-2142.
- [44] D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 10444-10450.
- [45] J. B. Rothbard, S. Garlington, Q. Lin, T. Kirschberg, E. Kreider, P. L. McGrane, P. A. Wender, P. A. Khavari, *Nat Med* **2000**, *6*, 1253-1257.
- [46] I. Martín, M. Teixidó, E. Giralt, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 896-903.
- [47] E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 16010-16017.
- [48] D. J. Mitchell, L. Steinman, D. T. Kim, C. G. Fathman, J. B. Rothbard, *The Journal of Peptide Research* **2000**, *56*, 318-325.
- [49] J. B. Rothbard, E. Kreider, C. L. VanDeusen, L. Wright, B. L. Wylie, P. A. Wender, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 3612-3618.
- [50] T. Suzuki, S. Futaki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 2437-2443.
- [51] M. Silhol, M. Tyagi, M. Giacca, B. Lebleu, E. Vivès, *European Journal of Biochemistry* **2002**, *269*, 494-501.
- [52] J. Oehlke, G. Wallukat, Y. Wolf, A. Ehrlich, B. Wiesner, H. Berger, M. Bienert, *European Journal of Biochemistry* **2004**, *271*, 3043-3049.
- [53] J. Fernández-Carneado, M. J. Kogan, S. Pujals, E. Giralt, *Peptide Science* **2004**, *76*, 196-203.
- [54] B. J. Stapley, T. P. Creamer, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 587-595.
- [55] A. L. Rucker, T. P. Creamer, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 980-985.
- [56] L. Crombez, G. Aldrian-Herrada, K. Konate, Q. N. Nguyen, G. K. McMaster, R. Brasseur, F. Heitz, G. Divita, *Mol Ther* **2008**, *17*, 95-103.
- [57] A. Lehninger, D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, **2008**.

-
- [58] M. Manoharan, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12*, 103-128.
- [59] J. J. Turner, G. D. Ivanova, B. Verbeure, D. Williams, A. A. Arzumanov, S. Abes, B. Lebleu, M. J. Gait, *Nucleic Acids Research*, **33**, 6837-6849.
- [60] S. El-Andaloussi, H. J. Johansson, P. Lundberg, Ü. Langel, *The Journal of Gene Medicine* **2006**, *8*, 1262-1273.
- [61] N. Bendifallah, F. W. Rasmussen, V. Zachar, P. Ebbesen, P. E. Nielsen, U. Koppelhus, *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 750-758.
- [62] H. M. Moulton, M. C. Hase, K. M. Smith, P. L. Iversen, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2003**, *13*, 31-43.
- [63] J. Howl, I. D. Nicholl, S. Jones, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 767-769.
- [64] V. Bulmus, M. Woodward, L. Lin, N. Murthy, P. Stayton, A. Hoffman, *Journal of Controlled Release* **2003**, *93*, 105-120.
- [65] R. Haag, F. Kratz, *Angewandte Chemie* **2006**, *118*, 1218-1237.
- [66] P. Lundberg, S. El-Andaloussi, T. Sütlü, H. Johansson, Ü. Langel, *The FASEB Journal* **2007**, *21*, 2664-2671.
- [67] A. Aderem, D. M. Underhill, *Annual Review of Immunology* **1999**, *17*, 593-623.
- [68] J. A. Champion, S. Mitragotri, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 4930-4934.
- [69] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, *422*, 37-44.
- [70] A. Fittipaldi, A. Ferrari, M. Zoppé, C. Arcangeli, V. Pellegrini, F. Beltram, M. Giacca, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 34141-34149.
- [71] J. P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu, L. V. Chernomordik, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 15300-15306.
- [72] Y. Shai, *Peptide Science* **2002**, *66*, 236-248.
- [73] A. Elmquist, M. Lindgren, T. Bartfai, U. Langel, *Experimental Cell Research* **2001**, *269*, 237-244.
- [74] J. Oehlke, A. Scheller, B. Wiesner, E. Krause, M. Beyermann, E. Klauschenz, M. Melzig, M. Bienert, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1998**, *1414*, 127-139.
- [75] M. Pooga, M. Hällbrink, M. Zorko, Ü. Langel, *FASEB Journal* **1998**, *12*, 67-77.

-
- [76] K. Killk, M. Magzoub, M. Pooga, L. E. G. Eriksson, Ü. Langel, A. Gräslund, *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12*, 911-916.
- [77] U. Soomets, M. Lindgren, X. Gallet, M. Hällbrink, A. Elmquist, L. Balaspiri, M. Zorko, M. Pooga, R. Brasseur, U. Langel, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2000**, *1467*, 165-176.
- [78] S. Violini, V. Sharma, J. L. Prior, M. Dyszlewski, D. Piwnica-Worms, *Biochemistry* **2002**, *41*, 12652-12661.
- [79] J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 585-590.
- [80] G. Drin, M. Mazel, P. Clair, D. Mathieu, M. Kaczorek, J. Temsamani, *European Journal of Biochemistry* **2001**, *268*, 1304-1314.
- [81] P. E. G. Thorén, D. Persson, P. Isakson, M. Goksör, A. Önfelt, B. Nordén, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *307*, 100-107.
- [82] E. Vivès, J. P. Richard, C. Rispal, B. Lebleu, *Current Protein and Peptide Science* **2003**, *4*, 125-132.
- [83] J. A. Leifert, J. L. Whitton, *Molecular Therapy* **2003**, *8*, 13-20.
- [84] M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 459-476.
- [85] V. Francesco M, *Biomaterials* **2001**, *22*, 405-417.
- [86] S. Pujals, J. Fernández-Carneado, M. D. Ludevid, E. Giralt, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 296-301.
- [87] F. Vögtle, G. Richardt, N. Werner, in *Dendrimer Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2009**.
- [88] S. Raina, D. Missiakas, *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51*, 179-202.
- [89] G. Saito, J. A. Swanson, K.-D. Lee, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 199-215.
- [90] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Kriegelstein, T. Kissel, *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121-1131.
- [91] J. C. Roberts, M. K. Bhalgat, R. T. Zera, *Journal of Biomedical Materials Research* **1996**, *30*, 53-65.
- [92] B. H. Zinselmeyer, S. P. Mackay, A. G. Schatzlein, I. F. Uchegbu, *Pharmaceutical Research* **2002**, *19*, 960-967.
-

-
- [93] C. C.E, *Microchemical Journal* **1975**, *20*, 190-192.
- [94] B. Skoog, *Vox Sanguinis* **1979**, *37*, 345-349.
- [95] G. Mattson, E. Conklin, S. Desai, G. Nielander, M. D. Savage, S. Morgensen, *Molecular Biology Reports* **1993**, *17*, 167-183.
- [96] F. Albericio, *Peptide Science* **2000**, *55*, 123-139.
- [97] R. E. Reid, *The Journal of Organic Chemistry* **1976**, *41*, 1027-1031.
- [98] G. B. Fields, R. L. Noble, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1990**, *35*, 161-214.
- [99] A. Aletras, K. Barlos, D. Gatos, S. Koutsogianni, P. Mamos, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1995**, *45*, 488-496.
- [100] S. R. Chhabra, A. N. Khan, B. W. Bycroft, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 3585-3588.
- [101] R. B. Merrifield, in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., **2006**, pp. 221-296.
- [102] B.-S. Andreas, *Journal of Controlled Release* **1998**, *52*, 1-16.
- [103] C. Falciani, L. Lozzi, A. Pini, F. Corti, M. Fabbrini, A. Bernini, B. Lelli, N. Niccolai, L. Bracci, *Chemical Biology & Drug Design* **2007**, *69*, 216-221.
- [104] C. C. Chung, K. Ohwaki, J. E. Schneeweis, E. Stec, J. P. Varnerin, P. N. Goudreau, A. Chang, J. Cassaday, L. Yang, T. Yamakawa, O. Kornienko, P. Hodder, J. Inglese, M. Ferrer, B. Strulovici, J. Kusunoki, M. R. Tota, T. Takagi, *ASSAY and Drug Development Technologies* **2008**, *6*, 361-374.
- [105] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [106] F. A. e. al, *"Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach"* Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- [107] K. Manfred M, *Analytical Biochemistry* **1992**, *200*, 244-248.

Danksagung

Ich danke meiner Projektleiterin Dr. Kalina Peneva für die große Diskussionsbereitschaft sowie für Ihre kreativen Ratschläge. Sie betreute diese Arbeit mit großem Interesse und Einsatz.

Weiterhin danke ich Anne Pfisterer und Thomas Schuster für die dauernd gute Atmosphäre in unserem Labor 0.411. Das stete Interesse an meiner Arbeit und die daraus entstandenen Diskussionen sorgten immer für frische Motivation. Für die Messungen zahlreicher MALDI-TOF-Massenspektren gilt Thomas ein besonderes Dankeschön.

Für die außerordentlich nette Atmosphäre im Büro 0.504 bedanke ich mich bei Robert Haschick, Robert Dorresteyn, Dominik Lohrbach, Thomas Schuster, Artem Skabeev, Joe Daejune und Irfan Saeed. Ihre Hilfe und Diskussionsbereitschaft hat immer für ein gutes Arbeitsklima gesorgt. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle die Gespräche mit Thomas Schuster und Dominik Lohrbach, die mir neben allen großartigen Unterhaltungen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Außerdem danke ich in besonderem Maße Oliver Dumele für die Unterstützung am Anfang meiner Arbeit und die Einführungen bei allen wichtigen Messgeräten des Instituts.

Zuletzt geht mein Dank an die gesamte Arbeitsgruppe von Prof. Müllen für die Mithilfe zur Erstellung dieser Arbeit, den wissenschaftlichen Austausch, die zahlreichen Mittagessen und alle gemeinsamen Freizeitaktivitäten die für ein hervorragendes Arbeitsklima sorgten.