
**Synthese und inhibitorische Eigenschaften
von
Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-
Derivaten**

**Studien zur spezifischen Inhibierung
prolinspezifischer Peptidasen**

DISSERTATION

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

**zur Erlangung des Grades
Doctor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Chem. Jörn Schmidt
geb. am 14. November 1966 in Holzminden**

1999

Referent: Prof. Dr. T. Scheper

Koreferentin: PD Dr. G. Kretzmer

Tag der Promotion: 1. Dezember 1998

Datum der Veröffentlichung: 22. März 1999

Abstract

The aim of the work was the selective inhibition of prolyl endopeptidase (PEP, E.C: 3.4.21.26) from *Flavobacterium meningosepticum* as well as of the exopeptidase dipeptidyl peptidase IV (DP IV, E.C: 3.4.14.5) from porcine kidney by substrate analogue inhibitors.

Peptidyl-pyridinium-methylketones were synthesised, characterised and finally developed to a new substance class of potent PEP- and DP IV inhibitors. The substrate analogue inhibitors act by means of a slow-binding mechanism, inhibiting PEP and DP IV, respectively. Studies on the inhibition of these proline specific peptidases were carried out, concentrating on their stability and effects in physiological systems.

While the N-terminal protected dipeptidyl pyridinium methylketones are stable in aqueous solution, the unprotected substrate analogues rapidly decompose with a half live of only a few minutes. The enzymatic structure activity analysis of these compounds resulted in an optimised stability and a distinct improvement of the inhibition of PEP and DP IV by peptidyl pyridinium methylketones.

¹³C-NMR-experiments showed successful results concerning enzyme-inhibitor interactions.

DP IV inhibitor was orally administered to rats and its physiological effects on blood glucose level were investigated to evaluate a physiological model with respect to DP IV inhibitors. Based on the above results, the structure of the peptidyl pyridinium methyl ketone inhibitors were modified to achieve further improvements with regards to stability and physiological viability.

Keywords: dipeptidyl-peptidase IV (DP IV, E.C: 3.4.14.5)
prolyl endopeptidase (PEP, E.C: 3.4.21.26)
peptidyl pyridinium methyl ketone

Kurzreferat

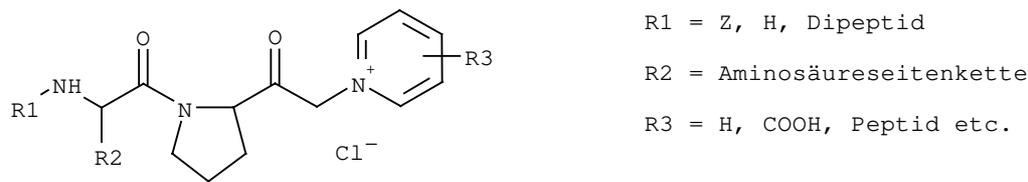


Abb. 1: Grundgerüst der Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Substanzklasse

Die vorliegende Arbeit behandelt die selektive Inhibierung der Prolylendopeptidase (PEP, E.C: 3.4.21.26) aus *Flavobacterium meningosepticum* und der Exopeptidase Dipeptidyl-peptidase IV (DP IV, E.C: 3.4.14.5) aus Schweineniere durch substratanaloge Inhibitoren. Mit den synthetisierten und untersuchten Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen (Abbildung 1) wurde eine Substanzklasse potenter PEP- und DP IV-Inhibitoren weiterentwickelt. Die substratanalogen Peptidyl-Pyridinium-Methylketone wirken nach einem slow-binding Mechanismus, inhibierend auf PEP bzw. DP IV. Studien zur Inhibierung der prolinspezifischen Peptidasen mit dem Schwerpunkt auf Stabilität und physiologischer Verfügbarkeit der bearbeiteten Inhibitor-Substanzklasse wurden durchgeführt.

Während die N-terminal geschützten Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone in wässriger Lösung stabil sind, zerfallen die analogen ungeschützten Verbindungen mit Halbwertszeiten im Minutenbereich. Die enzymologische Struktur-Wirkungsanalyse dieser Verbindungen führte zu einer Optimierung der Stabilität und zu einer deutlichen Verbesserung des inhibitorischen Verhaltens der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone gegenüber PEP und DP IV. ¹³C-NMR-Untersuchungen lassen Rückschlüsse auf die Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen zu.

In einem Tierexperiment mit Ratten wurden die physiologischen Effekte der oralen Gabe eines DP IV-Inhibitors auf den Blutzuckerspiegel untersucht, um ein physiologisches Modell zur Testung von DP IV-Inhibitoren zu erproben und aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen heraus gezielt neue Inhibitorstrukturen auf Basis der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone zu entwickeln.

Schlagerworte: Dipeptidyl-peptidase IV (DP IV, E.C: 3.4.14.5)
Prolylendopeptidase (PEP, E.C: 3.4.21.26)
Peptidyl-Pyridinium-Methylketone

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Enzyme	2
1.1.1. Prolinspezifische Peptidasen	2
1.1.2. Katalysemechanismus der post-Prolin-spaltenden Peptidasen Prolylendopeptidase und Dipeptidylpeptidase IV	4
1.1.3. Prolylendopeptidase	8
1.1.4. Dipeptidylpeptidase IV	11
1.2. Inhibitoren	15
1.2.1. Inhibitoren für Serinproteasen	15
1.2.2. Inhibitoren für Prolylendopeptidase und Dipeptidylpeptidase IV	17
2. Ergebnisse und Diskussion	23
2.1. Synthese der untersuchten PEP- und DP IV-Inhibitoren	23
2.1.1. Synthese von Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivaten	23
2.1.2. Darstellung der Peptidyl-Chlormethylketon-Komponente	24
2.1.3. Nucleophile Substitution am Chlormethylketon	25
2.1.4. C-terminale Verlängerung von Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen durch eine Glycinkette	27
2.1.5. Abspaltung der Z-Schutzgruppe an Peptidyl-Pyridinium- Methylketonen	28
2.1.6. Synthese eines N-terminal ungeschützten Tetrapeptidyl- Pyridinium-Methylketons	29
2.1.7. Darstellung eines cyclischen Peptidyl-Pyridinium-Methylketons	30
2.1.8. Darstellung von Isoleucylthiazolidid	31
2.2. Untersuchungen zur Inhibierung der Prolylendopeptidase	32
2.2.1. Stabilitätsuntersuchungen an N-(Z-Phe-Pro-CH ₂ -)Isonicotinsäure- methylester mittels MALDI-TOF-Massenpektrometrie	32
2.2.2. Kinetik der Prolylendopeptidase-Inhibierung durch Peptidyl- Pyridinium-Methylketone	39
- Auswertung der slow-binding Kinetik am Beispiel von Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketonen	39
- Untersuchungen zum Einfluß der positiven Ladung in Peptidyl- Pyridinium-Methylketonen auf die Inhibierung der PEP- katalysierten Hydrolyse	44
- Untersuchungen zum Einfluß des Substitutionsmusters am Pyridinring in Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen auf die Inhibierung der PEP-katalysierten Hydrolyse	46
- Auswirkungen der C-terminalen Verlängerung der Peptidyl- Pyridinium-Methylketon-Derivate durch eine Glycinkette unterschiedlicher Länge auf die kinetischen Eigenschaften	47
- Untersuchungen zur räumlichen Restriktion am Enzym mit Hilfe einer cyclischen Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Verbindung	53
- Inhibierende Eigenschaften der Pyridinium-Methylketone auf PEP aus Schweineniere und Rinderhirn im Vergleich zu PEP aus <i>Flavobacterium meningosepticum</i>	54

2.2.3. Untersuchung der Wechselwirkung zwischen PEP und Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie	56
2.3. H-Xaa-Pro-Pyridinium-Methylketon-Derivate als Inhibitoren der DP IV	66
2.3.1. Modell für die Optimierung und <i>in vivo</i> -Untersuchung von DP IV-Inhibitoren	66
- Inhibierung der DP IV-katalysierten Spaltung von GIP_{1-42} <i>in vitro</i>	68
- Inhibierung der DP IV <i>in vivo</i> als Folge der oralen Gabe von H-Ile-Thiazolidid	69
- Bestimmung der Insulinkonzentration im Blutplasma von Ratten nach oraler Glukosegabe und DP IV-Inhibitorgabe	73
- Bestimmung der Glukosekonzentration im Rattenblut nach oraler Glukosegabe und DP IV-Inhibitorgabe	74
2.3.2. Charakterisierung des nichtenzymatischen Zerfalls von H-Xaa-Pro-Pyridinium-Methylketon-Derivaten	76
2.3.3. Wechselwirkungen von Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen mit DP IV	87
3. Zusammenfassung und Schlußbetrachtung	94
4. Experimenteller Teil	100
4.1. Mathematische Grundlage des slow-binding Mechanismus	100
4.2. Enzymologische Methoden	108
4.3. Analysemethoden	112
4.4. Allgemeine Synthesevorschriften	119
4.5. Synthesebeschreibungen einzelner Verbindungen	122
5. Literaturverzeichnis	155
6. Danksagung	170

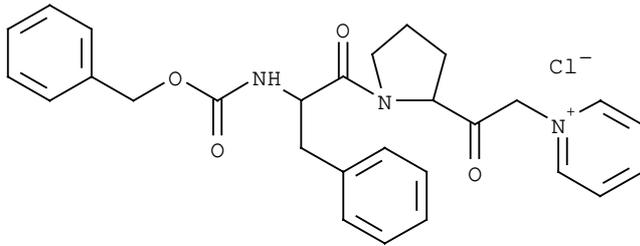
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abu	L- α -Aminobuttersäure
ACN	Acetonitril
Aze	L-Azetidincarbonsäure
Boc	t-Butyloxycarbonyl-
br	breites Signal
^t Bu	tertiär-Butyl-
c	Konzentration
CAIBE	Chlorameisensäureisobutylester
CMK	Chlormethylketon
CoA	Coenzym A
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dhp	L-Dehydroprolin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP IV	Dipeptidylpeptidase IV
d. Th.	der Theorie
E	Enzym
ϵ	Extinktionskoeffizient
EE	Essigsäureethylester
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
ES	Enzym-Substrat-Komplex
exp. Teil	Experimenteller Teil
ges.	gesättigt
Gly	Glycin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
i. Vak.	im Vakuum
Hyp	<i>trans</i> -4-Hydroxy-L-Prolin
k, k_{obs}	Geschwindigkeitskonstanten bei definierten Konzentrationen von Reaktanten
K_a	Michaelis-Menten-Konstante
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante enzymatischer Reaktionen
$k_{\text{on}}, k_{\text{off}}$	Geschwindigkeitskonstanten der Umwandlung von EI nach EI* bzw. EI* nach EI
K_i	Dissoziationskonstante des EI-Komplexes beschreibt die kompetitive Inhibierung der enzymkatalysierten Substrathydrolyse <i>vor</i> Bildung des stabileren Enzym-Inhibitor-Komplexes
K_i^*	Dissoziationskonstante des EI*-Komplexes beschreibt die kompetitive Inhibierung der enzymkatalysierten Substrathydrolyse <i>nach</i> Bildung des stabileren Enzym-Inhibitor-Komplexes
Kap.	Kapitel
Leu	Leucin
LM	Lösungsmittel
m	Multiplett
MG	Molekulargewicht

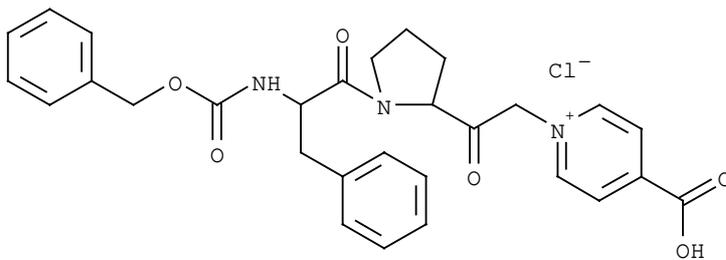
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Kernresonanzspektroskopie
Nu	Nucleophil
OMe	Methylester
Oxa	L-Oxazolidin-4-carbonsäure
P	Produkt
P ₁ , P ₂ , P ₁ '	Nomenklatur der Aminosäurepositionen in Peptidsubstraten nach Schlechter und Berger [309]
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEP	Prolylendopeptidase
Phe	Phenylalanin
Pip	L-Pipecolinsäure
pNA	4-Nitroanilin/4-Nitroanilid
Pro	Prolin
Pyr	Pyrrolidin/Pyrrolidid
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
RP	Reverse Phase
RT	Raumtemperatur
S	Substrat
s	Singulett
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
T	Temperatur
t	Triplett (NMR)
t	Zeit
Tab	Tabelle
tat	transaktivierendes Protein
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thia	Thiazolidin/Thiazolidid
Thz	L-Thiazolidin-4-carbonsäure
TOF	Time of flight
UV	Ultraviolettes Licht
v	Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Substrathydrolyse
v _i	Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Substrathydrolyse in Gegenwart eines Inhibitors
v _s	Gleichgewichtsgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Substrathydrolyse
Val	Valin
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Xaa	variable Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl-

Bezeichnung der Verbindungen

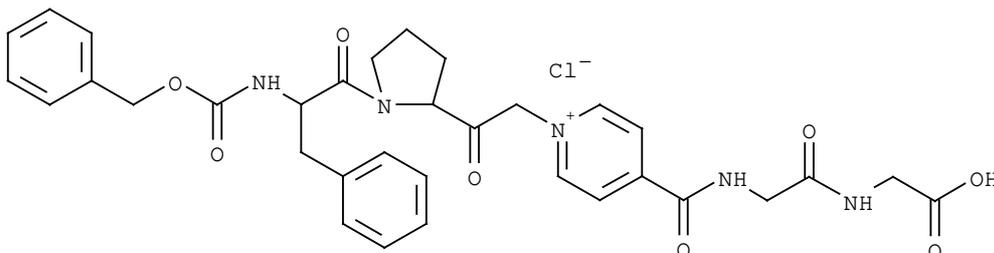
Abweichend von den IUPAC/IUB-Regeln zur Bezeichnung organischer Verbindungen wurden zum besseren Verständnis für die in dieser Arbeit beschriebenen Peptidyl-Pyridinium-Methylketone die folgenden Substanzbezeichnungen bzw. analogen Verbindungsamen verwendet.



Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon bzw. Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅)/Cl⁻

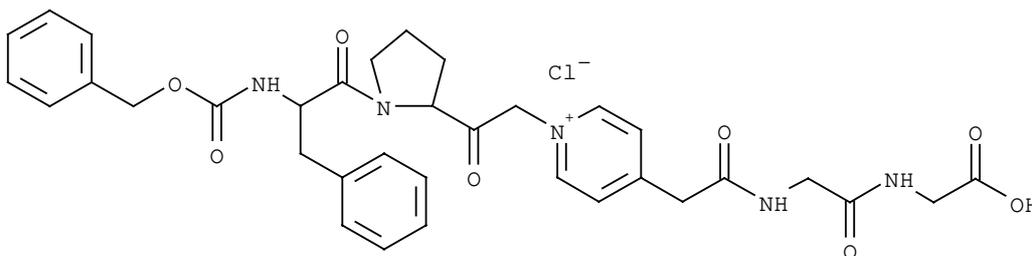


N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure bzw. Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-p-COOH/Cl⁻



N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₂-OH

bzw. Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-p-CO-Gly₂-OH/Cl⁻



N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylessigsäure-Gly₂-OH

bzw. Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-p-CH₂-CO-Gly₂-OH/Cl⁻

1. Einleitung

Enzyme spielen im Organismus als intra- bzw. extrazelluläre hochmolekulare Proteine, die als Biokatalysatoren die Umsetzungen des Stoffwechsels steuern, eine wichtige Rolle. In den letzten Jahrzehnten wurden molekulare und regulatorische Eigenschaften sowie Wirkmechanismen zahlreicher Enzyme aufgeklärt und führten zu einer systematischen Klassifizierung.

Enzyme lassen sich nach verschiedenen Kriterien, wie Molekülgröße und Struktur unterscheiden, aber insbesondere auch nach den chemischen Reaktionen, die sie katalysieren, einteilen. Bei den proteolytischen Enzymen unterscheidet man mechanistisch nach nichtkovalent katalysierenden Hydrolasen (Aspartat- und Metalloproteasen) und kovalent katalysierenden Hydrolasen (Serin- und Cysteinproteasen). Hinsichtlich ihrer Spezifität diskriminieren Proteasen nach den Aminosäuren, die die zu spaltende Peptidbindung bilden. Unter diesen finden sich hochselektive Enzyme, wie die prolin-spezifischen Peptidasen, die aufgrund ihrer hohen Spezifität oft in regulatorische Aufgaben im Organismus einbezogen sind. Aus dieser Gruppe spielen in dieser Arbeit ausschließlich Prolylendopeptidase und Dipeptidylpeptidase eine Rolle. Diese prolinspezifischen Peptidasen weisen bezüglich Katalysemechanismus, Molekülgröße, inhibitorischem Verhalten und Anordnung der katalytisch wirksamen Aminosäuren in der Primärsequenz große Homologie im gesamten Organismenreich und organspezifische Ähnlichkeiten auf. Durch diese Eigenschaften unterscheiden sie sich von anderen proteolytischen Enzymen.

Für Prolylendopeptidase und Dipeptidylpeptidase IV sind, vergleichsweise zu anderen Proteasen, keine spezifischen endogenen Inhibitoren als Regulationsverbindungen bekannt. Aus diesem Grund ist es von Interesse, Substanzen in die Hand zu bekommen, die spezifisch diese beiden Peptidasen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beeinflussen.

Ziel und Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, auf der Basis der bisherigen Kenntnis der Enzyme nach Strukturen zu suchen, die geeignet sind, zur Aufklärung der physiologischen Funktion von Prolylendopeptidase und Dipeptidylpeptidase IV beizutragen. Neue, spezifische und potente, substratanaloge Inhibitoren, auf der Basis von Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen, für PEP wurden daher entwickelt. Es ist zu vermuten, daß substratanaloge PEP-Inhibitoren, nach Demaskierung des N-Terminus durch Schutzgruppen oder durch Peptidylreste, ebenfalls spezifische DP IV-Inhibitoren sein können. Für dieses Zielenzym wurde die Verbindungsklasse der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone hinsichtlich der Stabilität in wässrigem Medium und für den Einsatz als potentielles Pharmakon optimiert.

1.1. Enzyme

1.1.1. Prolinspezifische Peptidasen

Die Aminosäure Prolin ist ein wichtiges Strukturelement von Proteinen und Peptiden. Viele regulatorische Peptide im Organismus (Neuropeptide, Peptidhormone etc.) weisen Prolin an wichtigen Positionen in ihren Sequenzen auf [1]. Als einzige natürliche Iminosäure beeinflusst sie entscheidend die Sekundär- und Tertiärstruktur von Peptiden [1] und bestimmt damit deren biologische Aktivität.

Proteasen sind auf vielfältige Weise in physiologische Prozesse involviert. Nicht alle Enzyme können aber die Prolin-Bindung zu anderen Aminosäuren spalten. Hierfür haben sich während der Evolution eine Reihe prolinspezifischer Peptidasen entwickelt (Abbildung 2).

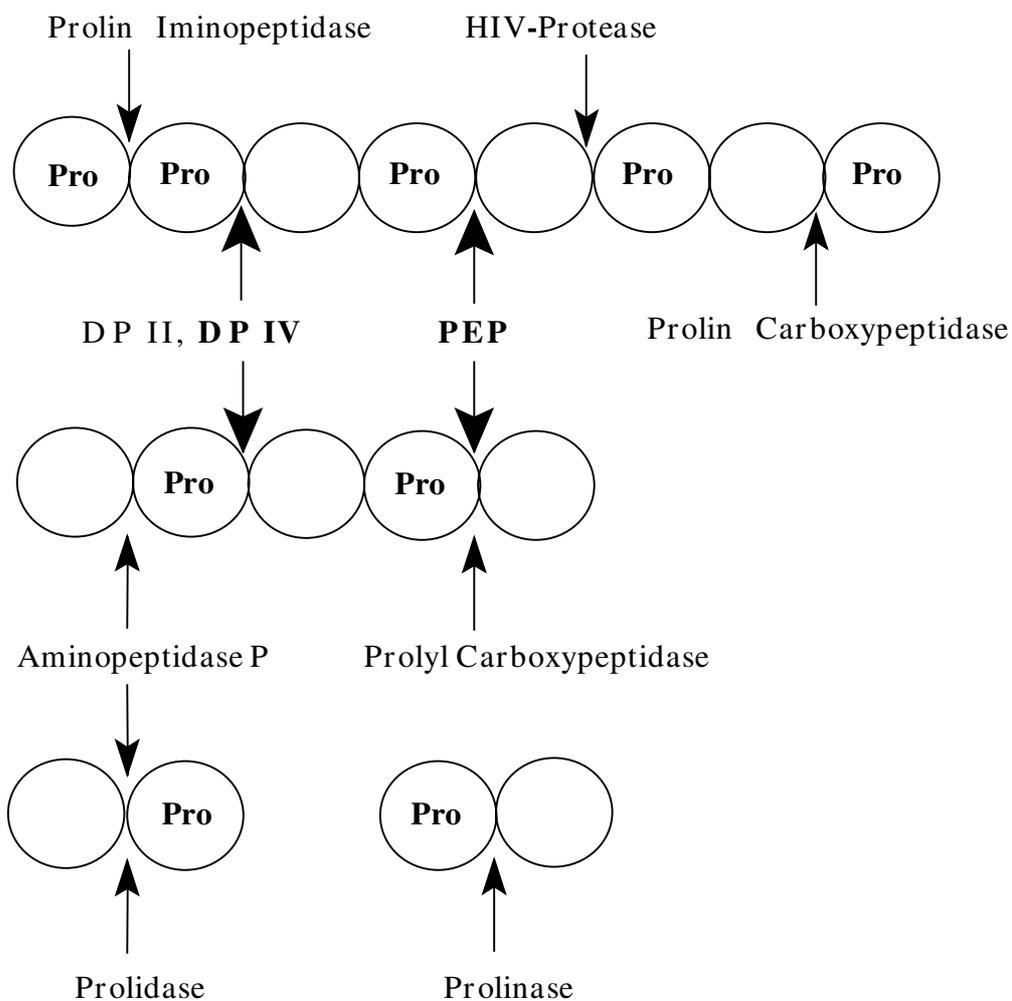


Abb. 2: Schema der Substratspezifität prolinspezifischer Peptidasen

Die Hydrolyse prolinhaltiger Peptide durch prolin-spezifische Enzyme kann zu Strukturveränderungen und damit zur Änderung von biologischen Funktionen führen. Die Wirkmechanismen derartiger Peptidasen sowie ihre molekularen und regulatorischen Eigenschaften werden bereits seit längerem untersucht. Der Einsatz von spezifischen, substratanalogen Inhibitoren trägt wesentlich zur Aufklärung von Funktion und Wirkungsweise dieser Proteasen bei [2 - 5]. Zu den Enzymen, die in der Lage sind, Prolinbindungen in Peptiden zu hydrolysieren, zählen unter anderem die Exopeptidase Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie die Prolylendopeptidase (PEP). An ihnen wurden die in dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren untersucht.

Die post-Prolin-spaltenden Peptidasen Prolylendopeptidase und Dipeptidylpeptidase IV sind zwei ubiquitär verbreitete Serinproteasen [22]. Sie hydrolysieren mit hoher Spezifität Bindungen auf der C-terminalen Seite des Prolins, Hydroxyprolins bzw. Alanins [1]. PEP und DP IV unterscheiden sich in Größe, Struktur und Katalysemechanismus deutlich von den pankreatischen Serinproteasen, die Bindungen, an denen Prolin beteiligt ist, nicht hydrolysieren können [6]. Beide Enzyme weisen ähnliche katalytische Konstanten bei der Hydrolyse analoger Substrate auf [7]. Sowohl PEP als auch DP IV werden durch Diethylpyrocarbonat irreversibel gehemmt [8]. Dies spricht neben dem als Nucleophil fungierenden Serin für die Beteiligung eines Histidinrestes am Katalysemechanismus.

Die Erkenntnisse der letzten Jahre deuten auf eine Funktion der prolin-spezifischen Peptidasen in zahlreichen Wirkmechanismen im Organismus hin. Neben ihrer proteolytischen Aktivität wurden weitere Funktionen beschrieben, durch die sie an der Regulation zellulärer Prozesse beteiligt sind [17].

1.1.2. Katalysemechanismus der post-Prolin-spaltenden Peptidasen PEP und DP IV

Der für die pankreatischen Serinproteasen beschriebene Katalysemechanismus ist mit Einschränkungen auf die primär post-Prolin (auch post-Alanin) [1] -spaltenden Peptidasen PEP und DP IV übertragbar. Es wird vermutet, daß das aktive Zentrum nicht, wie bei den Trypsin-ähnlichen Serinproteasen, in Form einer tiefen Tasche, sondern offen auf der Oberfläche des Enzyms angesiedelt ist, um dem Substrat genügend Raum für eine für den DP IV-Katalysemechanismus typische Konformationsänderung zu geben.

Aus den Ergebnissen kinetischer Untersuchungen der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse konnte die Bildung eines Acylenzyms als ein kovalenter Zwischenzustand postuliert [51] und später durch Untersuchungen an entsprechenden Intermediaten [141, 142] weiter belegt werden. Es wurde also ein für Serinproteasen typischer Katalyseverlauf unter Ausbildung eines relativ stabilen Acylenzyms und zwei weiteren, kurzlebigeren Zwischenprodukten angenommen.

Die Katalysereaktion der pankreatischen Serinproteasen verläuft über 2 tetraedrische Intermediate (Abbildung 3) [9]. Das Substrat wird in einem initialen, diffusionskontrollierten Schritt an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden. Hierbei bestimmt hauptsächlich die Seitenkette der P₁-Aminosäure die Spezifität. Im ersten Addukt greift die katalytisch agierende Hydroxylgruppe des Serins das Substrat-Carbonyl-C-Atom nucleophil an. Das sich bildende Oxanion des tetrahedralen Übergangszustandes wird durch Wasserstoffbrückenbindungen der benachbarten Seitenketten stabilisiert. Durch die räumliche und chemische Struktur des aktiven Zentrums wird die Orbitalgeometrie des tetraedrischen Adduktes ausgerichtet. Besonderen Einfluß auf den Zerfall des Intermediates hat die Geometrie der freien Elektronenpaare am Stickstoff- und Sauerstoffatom der zu spaltenden Bindung. Die C-N-Bindung wird gespalten, wenn jeweils ein Elektronenpaar der beiden beteiligten Sauerstoffatome antiperiplanar zur C-N-Bindung orientiert ist [10]. Hierzu rotiert der CHR-Rest am Stickstoff in die dafür vorgesehene Position. Beim Zerfall des Enzym-Substrat-Übergangszustandes erfolgt die Abspaltung der Aminkomponente unter Bildung des Acylenzyms. Die Deacylierung des Enzyms erfolgt durch Angriff eines Wassermoleküls, erneute Ausbildung eines tetrahedralen Zustandes und anschließenden Zerfall in freies Enzym und Peptidkomponente mit freiem C-Terminus. Weitere funktionelle Gruppen im aktiven Zentrum unterstützen diesen Mechanismus der Acylierung und Deacylierung des Enzyms. Die OH-Gruppe des katalytischen Serinrestes wird dabei durch eine H-Brückenbindung zum Imidazolrest des katalytischen Histidins aktiviert. In einem säurekatalytischen Schritt wird

dieses Proton auf die austretende Aminkomponente übertragen. Das Imidazolium selbst wird wiederum durch einen benachbarten Aspartatrest in einer Redoxreaktion stabilisiert. Bei den Amidsubstraten ist der Acylierungsschritt geschwindigkeitsbestimmend, während bei Substraten mit aktivierter Abgangsgruppe (Alkohol, *p*-Nitroanilin) die Deacylierung die Gesamtgeschwindigkeit bestimmt.

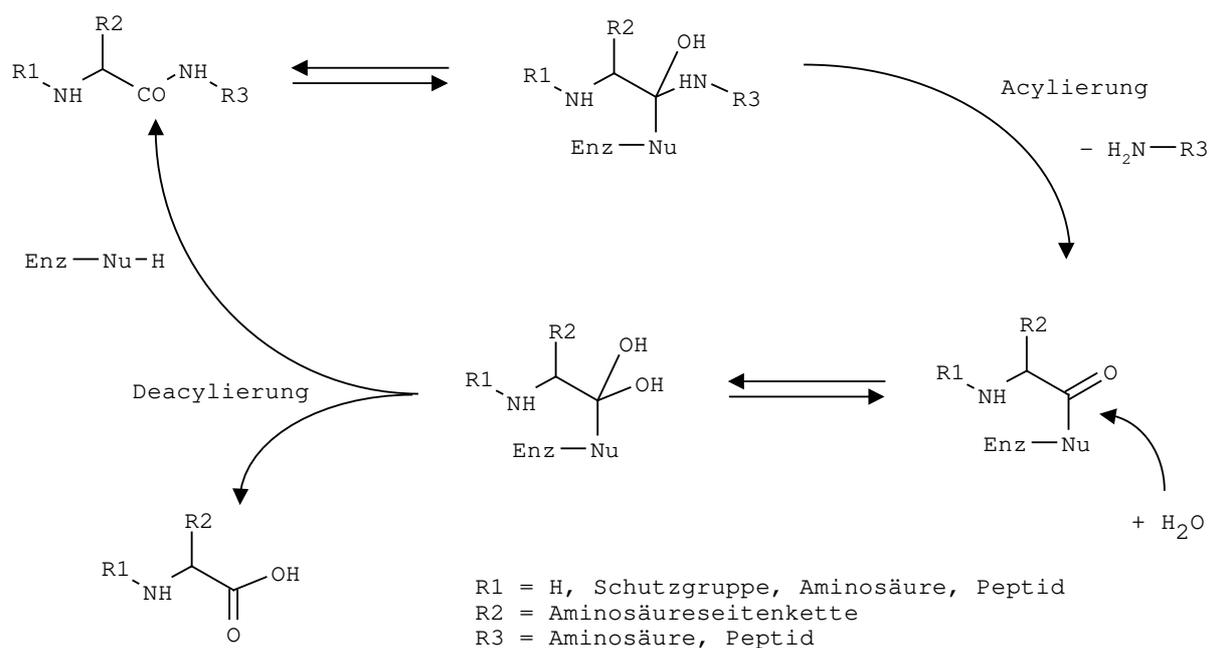


Abb. 3: Modell des Katalysemechanismus der pankreatischen Serinproteasen

Bezüglich des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes bei der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse ergeben sich Abweichungen zum Katalysemechanismus pankreatischer Serinproteasen [6]. Alaninsubstrate werden um ein bis zwei Größenordnungen langsamer gespalten als Prolinsubstrate. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion für Alanin-Substrate liegt im Bereich der Acylierung. Untersuchungen an Prolin-Substraten zeigen, daß im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion die Abgangsgruppe den Enzym-Substratkomplex bereits verlassen hat. Die pH-Abhängigkeit der DP IV-katalysierten Hydrolyse zeigte für Alanin- bzw. Prolin-Substrate signifikante Unterschiede. Für Alanin-Substrate wird dabei eine für pankreatische Serinproteasen typische

pH-Wert-Abhängigkeit der Hydrolyse von Amidsubstraten gefunden. Die Michaelis-Menten-Konstante K_a ist im Bereich von pH 5,0 bis pH 10 pH-Wert-unabhängig. Dagegen wurden für die pH-Wert-Abhängigkeit der DP IV-katalysierten Hydrolyse von Prolinsubstraten entgegengesetzte Verhältnisse gefunden. Die k_{cat} -Werte sind hier pH-Wert-unabhängig, während die Bindungskonstante K_a mit zunehmender Protonenkonzentration ungünstiger wird. Im Verlauf der DP IV-katalysierten Hydrolyse von Prolin-Substraten werden alle auf der Reaktionskoordinate vor dem Acylenzym liegenden Energiebarrieren schnell überwunden. Bei Alanin-Substraten liegt die größte Energiebarriere vor der Bildung des Acylenzyms. Die Deacylierung in der DP IV-katalysierten Hydrolyse ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei unterschiedlich substituierten Peptidylarylamiden der Prolinreihe (Prolin in P_1 -Position). Für Alanin-Substrate (Alanin in P_1 -Position) ist die Acylierung geschwindigkeitsbestimmend [7, 15]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist also nicht, wie bei pankreatischen Serinproteasen, von der Natur des austretenden Restes, sondern von der P_1 -Aminosäure abhängig.

Die PEP-katalysierte Hydrolyse von Alanin- und Prolin-Substraten verhält sich analog der DP IV-katalysierten Hydrolyse entsprechender Substratreihen. Mit den bisher beschriebenen Vorstellungen des Katalysemechanismus pankreatischer Proteasen, insbesondere der stereoelektronischen Kontrolle, lassen sich die beschriebenen kinetischen Phänomene nicht vollständig erklären.

Dies gibt Anlaß, den Katalysemechanismus für post-Prolin-spaltende Proteasen, wie von Demuth vorgeschlagen, zu beschreiben [141]:

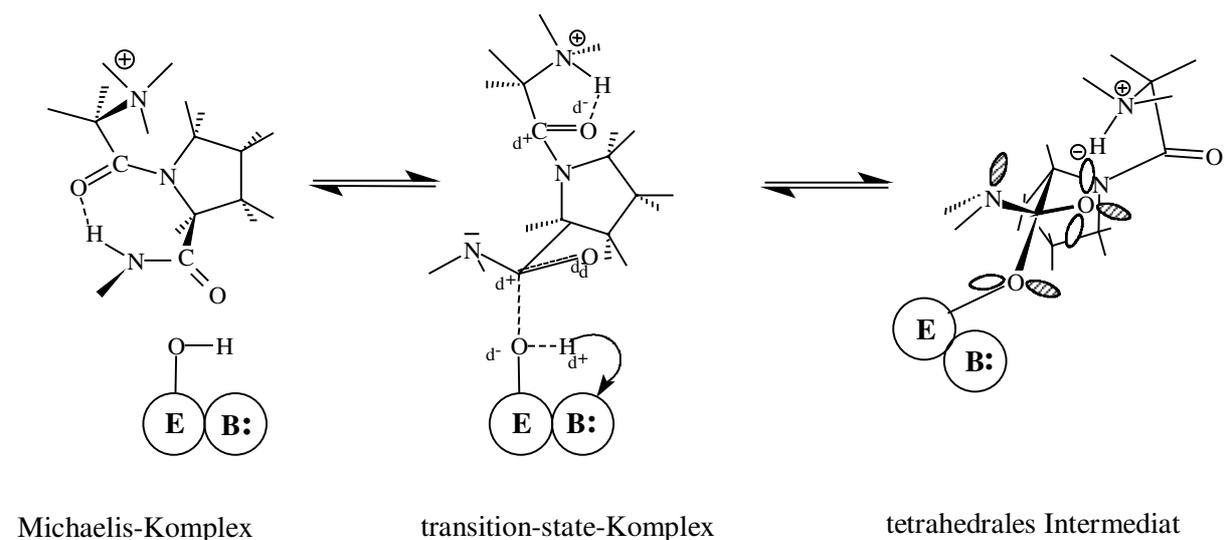


Abb. 4: Modell des Katalysemechanismus der konformationsunterstützten Hydrolyse prolinhaltiger Substrate durch DP IV bzw. PEP

1. Die Peptidbindung der Aminosäuren in P₁- und P₂-Position müssen für die Erkennung der Substrate in der *trans*-Konformation vorliegen [11 - 14]. Das Enzym bindet die Xaa-Pro-*trans*-Form des Substrates nichtkovalent. Das aktive Zentrum ist vorwiegend von hydrophoben Aminosäuren besetzt. Hierdurch ist eine Konformationsänderung des Enzym-Substratkomplexes thermodynamisch begünstigt.

2. Die OH-Gruppe des katalytischen Serinrestes greift die Carbonylgruppe des Prolins im Substrat nucleophil an. Es bildet sich der bereits bekannte tetrahedrale Übergangszustand (Abbildung 4). Die damit einhergehenden Konformationsänderungen (sp^2 -Hybrid wird zum sp^3 -Hybrid) im Substratmolekül begünstigen eine Rotation der Xaa-Pro-Bindung. Der sich vom Amidstickstoff des austretenden Restes abstoßende Carbonylsauerstoff der Xaa-Pro-Bindung hebt die intramolekulare Stabilisierung der *trans*-Konformation durch eine Wasserstoffbrücke auf.

3. Der Enzym-Substratkomplex nimmt die *cis*-Konformation ein. Der N-Terminus stabilisiert das geladene tetrahedrale Intermediat durch eine Wasserstoffbrückenbindung. Die Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung wird durch die bevorzugt eingenommene antiperiplanare Ausrichtung der freien Elektronenorbitale der Heteroatome des Hemiorthoamids gelöst.

4. Der Carbonylkohlenstoff geht nach Austritt der Abgangsgruppe wieder in den sp^2 -hybridisierten Zustand über. Der Xaa-Pro-Serylester nimmt teilweise wieder die *trans*-Konformation der Xaa-Pro-Bindung ein. Die relativ hydrophobe Umgebung im aktiven Zentrum des Enzyms und die fehlende Stabilisierung der *trans*-Konformation durch Wasserstoffbrückenbindungen erleichtern den basenkatalysierten Angriff eines Wassermoleküls unter Ausbildung eines tetraedralen Übergangszustandes entsprechend den Katalyseschritten 1 - 3, gefolgt von der Deacylierung unter Rückgewinnung des freien Enzyms und der zweiten Peptidkomponente.

Das *cis/trans*-Isomerengleichgewicht der Xaa-Pro-Bindung weist in den Produkten der Peptidhydrolyse einen deutlich höheren *cis*-Anteil gegenüber den eingesetzten Edukten auf [141].

1.1.3. Prolylendopeptidase

Die Prolylendopeptidase oder Prolyl oligopeptidase¹, gelegentlich auch als „post-proline-cleaving enzyme“ bezeichnet [14], ist eine post-Prolin-spaltende Endopeptidase mit einem Molekulargewicht von 62 - 77 kDa [1]. PEP ist ein monomeres Enzym. Erstmals isoliert wurde die PEP von Walter et al. [18]. Als Oxytocin abbauendes Enzym in humanem Uterus wurde PEP deshalb ursprünglich auch als Oxytocinase bezeichnet. Sie wurde aus verschiedenen Bakterien [19, 20], Pilzen [21, 299], Pflanzen [23] sowie einer Reihe von Säugetierorganen [3, 24 - 26] wie z. B. Hirn [28 - 30] und Plazenta [31] isoliert. PEP ist vorwiegend zytosolisch lokalisiert [32], wurde aber auch im synaptischen Spalt und in der Synapsenmembran nachgewiesen [1, 17, 33 - 35]. Kloniert und sequenziert wurde die PEP aus *Flavobacterium meningosepticum* [36 - 38], *Aeromonas hydrophyla* [39], Schweineiere [40] und aus humanen Lymphocyten [41].

Durch Polgar wurde die Prolylendopeptidase aus Schweinemuskel näher charakterisiert. Polgar konnte durch limitierte tryptische Spaltung der Lys¹⁹⁶-Ser¹⁹⁷-Bindung zeigen, daß die PEP aus einer katalytischen und einer nichtkatalytischen Domäne besteht. Die Domänen sind auch nach proteolytischer Spaltung über nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden. Diese limitierte Proteolyse führt zu einer Erhöhung der Aktivität der PEP [42 - 44].

Im haematopoetischen System ist die Prolylendopeptidase vor allem in Makrophagen vorhanden. 1989 wurde sie durch Aoyagi auch in T-Zellen nachgewiesen [45]. Durch Shirasawa sowie Vanhoof und Mitarbeiter konnte die PEP humaner T-Zellen 1994 kloniert und sequenziert werden [41, 46].

Prolinspezifische Endopeptidasen wurden auch in verschiedenen pathogenen Mikroorganismen (*Flavobacterium*, *Aeromonas*, Neisserien) nachgewiesen. Es wird vermutet, daß diese Enzymaktivitäten in die durch diese Erreger ausgelösten Pathomechanismen involviert sind [47, 48].

Die Prolylendopeptidase aus *Flavobacterium meningosepticum* wurde 1991 durch Yoshimoto als Protein durch tryptische Verdauung sequenziert [36]. Im Gegensatz zu den eukaryotischen Prolylendopeptidasen mit isoelektrischen Punkten um pH 5 besitzt diese PEP einen isoelektrischen Punkt von pH 9,5. Prolylendopeptidase aus *Flavobacterium meningosepticum*

¹ Der Begriff Oligopeptidase beschreibt die Eigenschaft, Oligopeptide (Kettenlänge 3 – 10 Aminosäuren) aus Proteinen abzuspalten. Zu berücksichtigen ist jedoch, daß PEP Peptide bis zu einer Länge von ca. 3000 Da (ca. 30 Aminosäuren) abspalten kann. Für diese Peptidlänge wird die Vorsilbe oligo nicht mehr verwendet. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit die eindeutigere Bezeichnung Prolylendopeptidase verwendet.

besitzt ca. 39 % Sequenzhomologie zur PEP aus humanen T-Zellen. Strukturell lassen sich hier 3 Bereiche unterscheiden. Dabei ist die Homologie im C-terminalen Bereich, in dem auch das aktive Zentrum lokalisiert ist, mit 52 % über 262 Aminosäuren am ausgeprägtesten, wohingegen sich die mittleren Bereiche stark unterscheiden (Homologie < 10 %).

Eine Röntgenkristallstruktur wurde für die PEP noch nicht bestimmt. Die PEP-Sequenz weist jedoch die typische Consensus-Sequenz Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly von Serinhydrolasen auf [40, 49]. Das Arrangement der katalytisch aktiven Aminosäuren Ser, Asp, His in der Primärsequenz weicht sowohl bei der PEP als auch bei der DP IV (vgl. 1.1.4., Seite 12) von der Anordnung in den Serinprotease-Familien der Subtilisine (Asp, His, Ser) und der Chymotrypsine (His, Asp, Ser) ab [3, 51, 300, 301].

PEP hydrolysiert Peptide und kleine Proteine bis zu einem Molekulargewicht von etwas mehr als 3000 Da [3, 53]. Diese Limitierung der Substratspezifität wird mit der evolutionären Verwandtschaft zwischen PEP und anderen Exopeptidasen erklärt [54].

Die Bindungsorte S_2 , S_1 und S_1' am Enzym haben eine Stereospezifität für L-Aminoacylreste [3, 7, 19]. Der S_2 -Bindungsort der PEP hat keinen großen Einfluß auf das Bindungsverhalten. Ein geschützter N-Terminus der Aminogruppe in der P_2 -Position ist für eine optimale Katalyse der Substratspaltung Bedingung. Im Gegensatz dazu werden aber Substrate mit einem freien C-Terminus in der P_1' -Position erkannt und umgesetzt [1].

Prolylendopeptidase spaltet nach Pro und Ala in der P_1 -Position auch nach N-Methylalanin, Sarkosin, Hyp, Gly, Abu oder Ser [57, 58]. Auch Aze, Pip, Dhp, Thz und Oxa dürfen in der P_1 -Position von PEP-Substraten vorkommen [57, 59]. Hydrophobe Aminoacylreste werden in der P_1' -Position gegenüber basischen und sauren Aminoacylresten bevorzugt.

Analog zu DP IV wird auch von PEP ein Prolylrest in der P_1' -Position nicht toleriert, d. h., die PEP ist zwar in der Lage, hinter Pro-Pro innerhalb einer Kette zu spalten, kann aber die Pro-Pro-Bindung selbst nicht hydrolysieren.

Die Prolylendopeptidase ist an der Spaltung und damit wahrscheinlich an der Regulation der Aktivität einer Reihe von Neuropeptiden [5, 61] und Peptidhormonen (Substanz P, Oxytocin, Vasopressin, Bradykinin, β -Endorphin, Casomorphin-5, Insulin- β -Kette, Thyreoliberin, Thyreotropin-Realising-Hormon u. a.) beteiligt [3, 24, 62 - 69, 97]. Im Gehirn wird dem Enzym eine Bedeutung bei der Regulation von Lernprozessen zugeschrieben [1, 70, 71]. Interessanterweise wird durch den Einsatz von PEP-Inhibitoren eine Verlängerung der Halbwertszeit von Neuropeptiden erreicht und dadurch die Gedächtnisleistung bei Ratten verbessert [72 - 74]. Eine Beteiligung von PEP an der Freisetzung des β -Amyloids, einem potentiellen Pathofaktor der Alzheimer-Krankheit, wird ebenfalls diskutiert [74 - 81]. Die

biochemische Grundlagenforschung konnte in den letzten 4 - 5 Jahren wichtige molekulare Zusammenhänge aufklären (Fehlspaltung des Transmembranproteins APP, Freisetzung des plaque-bildenden APP-Teilproteins β -A4). Die potentiellen Zielenzyme sind die β -A4 freisetzenden Proteasen β - und γ -Sekretase [60]. Es wird vermutet, daß PEP eine der γ -Sekretasen und verantwortlich für die Freisetzung des A4-Amyloid-Peptids bei der Alzheimer-Krankheit ist [55, 75]. An Tierexperimenten wurde nachgewiesen, daß die Inhibitoren dieses Enzyms hochwirksame Lernmodulatoren mit enormer gedächtnisfördernder Leistung (memory enhancer) sind. In zytologischen Untersuchungen und Gewebsexperimenten wurde die Suppression der β -A4-Freisetzung mit PEP-Inhibitoren nachgewiesen [83]. Neben den im Gehirn nachgewiesenen endogenen Peptidinhibitoren, die Prolylendopeptidase unspezifisch mit relativ schlechten K_i -Werten (mM) hemmen [84, 85], wurde eine nichtkompetitive Hemmung des Enzyms durch Acyl-CoA-Ester [86] sowie eine Bindung an die Acyl-CoA-Oxidase beschrieben [87]. Die unspezifische Bindung von Acyl-CoA-Ester an PEP deutet auf eine zweite Bindungsseite hin.

Durch Landgraf konnte eine enge Wechselwirkung der Prolylendopeptidase aus humaner Plazenta mit einem 56 kDa Fragment des humanen Serumalbumins sowie mit dem α_1 -Antitrypsin nachgewiesen werden [31].

Im Immunsystem wird eine Beteiligung der PEP an der zellvermittelten Immunantwort, an Autoimmunprozessen sowie bei entzündlichen Prozessen diskutiert [1, 88]. Es ist jedoch wenig über die Wirkung von PEP-spezifischen Inhibitoren auf Funktionen von Immunzellen bekannt.

Bei einigen psychischen Erkrankungen (Schizophrenie, Manie) wurden erhöhte oder (bei Depressionen) verminderte PEP-Aktivität im Plasma festgestellt [89]. Durch medikamentöse Behandlung der Erkrankungen wurde gezeigt, daß die PEP-Aktivität auf normale Werte gesunder Personen zurückgeht. Eine verminderte Konzentration einiger Neuropeptide, die potentielle PEP-Substrate sind, wurde bei Schizophreniepatienten festgestellt.

Diskutiert wird eine mögliche Bedeutung von PEP am Angiotensin-Metabolismus und damit an der Blutdruckregulation [61, 90].

Prolylendopeptidase ist ein Prototyp der Strukturklasse der serinabhängigen Prolylloleptidase-Familie, zu der auch die DP IV gehört.

1.1.4. Dipeptidylpeptidase IV

Die Dipeptidylpeptidase IV ist im Gegensatz zur cytosolischen PEP ein membranständiges Ektoenzym, das aus zwei glykosylierten, identischen Untereinheiten von je 110 kDa besteht. Es katalysiert die Abspaltung N-terminaler Dipeptide von Polypeptiden, wobei sich in P₁-Position der Substratstruktur Prolin oder Alanin befinden [1, 17]. Solche Sequenzen weisen eine Reihe von Peptidhormonen, Kininen, Neurotransmittern, Komponenten des Blutgerinnungssystems [33, 91 - 92], Toxine, Enzyme und viele Cytokine und Wachstumsfaktoren auf [4, 5, 7, 95 - 104].

Von Hopsu-Havu und Glenner wurde die DP IV erstmals aus Rattenleber [105] isoliert. In Bakterien (*F. meningosepticum* [106], *L.lactis spp. lactis* [107]), Pflanzen [108], Hefe [109], im Gift der Honigbiene [110] und anderen Organismen wurde ebenfalls DP IV nachgewiesen. Im Säugerorganismus wurde DP IV z. B. aus Niere [111], Leber [112], T-Lymphocyten [113] und Placenta [114] isoliert. Hohe DP IV-Aktivitäten konnten in menschlicher Niere, Leber, Dünndarm und Plazenta nachgewiesen werden [115]. DP IV aus *F. meningosepticum* [116], *L.lactis* [117], Maus [118], Ratte [119] und Mensch [120, 121] wurde kloniert und sequenziert.

Das Molekulargewicht beträgt, in Abhängigkeit von Organismus und Zelltyp, 110 - 115 kDa [112, 122]. Zwei identische Untereinheiten besitzen je ein unabhängiges aktives Zentrum [123]. Der N-terminale Teil beider Untereinheiten ist außenständig in eine Membran verankert. Die membrangebundene DP IV besitzt somit einen kurzen, 6 Aminosäuren umfassenden, intrazellulären Teil und eine 22 Aminosäure-lange Transmembranregion. Im extrazellulären Teil können drei Domänen unterschieden werden. Der N-terminale Bereich ist durch verschiedene Glycosylierungen gekennzeichnet. Aus den Untersuchungen von Reutter und Mitarbeitern ist bekannt, daß diese Glycosylierungen eine wesentliche Rolle beim korrekten Targeting des DP IV-Moleküls spielen [127]. Der mittlere Bereich besteht aus einer cysteinreichen Domäne. In der C-terminalen Domäne sind die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren lokalisiert.

Aus humanem Serum wurde auch eine lösliche DP IV, mit ähnlichen enzymatischen und immunologischen Eigenschaften, wie die der membrangebundenen Form, isoliert [124, 125]. Die lösliche DP IV liegt jedoch als Monomer vor und hat ein Molekulargewicht von 175 kDa. Eine Röntgenkristallstruktur gibt es bislang von DP IV nicht. Allerdings wurde kürzlich die Raumstruktur der Prolyliminopeptidase [126], einem Vertreter der Prolyloligopeptidase-Familie, aufgeklärt [304].

DP IV weist bezüglich des aktiven Nucleophils (Serin) die typische Consensus-Sequenz Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly von Serinproteasen, Esterasen und Lipasen auf [49, 129, 130]. Die DP IV unterscheidet sich, wie auch die PEP, von den klassischen Serinprotease-Familien der Subtilisine (Asp, His, Ser) und Chymotrypsine (His, Asp, Ser) durch die Anordnung der katalytisch aktiven Aminosäuren in der Primärsequenz [51, 131, 132] und ist daher mehr mit den Lipasen verwandt, die zur Strukturklasse der sogenannten α/β -Hydrolase-Familie gehören. Der DP IV wird eine Funktion beim Abbau prolinhaltiger Peptide sowie deren Transport durch die entsprechenden Epithelien zugeschrieben [133 - 135].

DP IV ist in der Lage, Substrate zu spalten, die in P_1 -Position außer Pro und Ala auch Dhp, Pip und Hyp aufweisen [7, 137]. An modifiziertem Growth-Hormone-Releasing-Factor wurde auch noch eine Spaltung nach den Aminosäuren Abu, Ser, Val, Gly und Leu, die anstelle von Pro in P_1 -Position eingebaut waren, beobachtet [138]. Dieses Ergebnis wurde an künstlichen, chromogenen Dipeptidyl-*p*NA-Substraten der Form H-Ala-Xaa-*p*NA durch DP IV aus Schweineniere für Abu und Gly in P_1 -Position bestätigt [57]. Der Aminoacylrest in P_1 -Position muß in der L-Konfiguration vorliegen. Basische und hydrophobe Aminoacylreste werden im S_2 -Bindungsort bevorzugt, alle anderen proteinogenen Aminoacylreste in der L-Konfiguration werden aber ebenfalls akzeptiert [7, 139]. Ist Alanin in P_1 -Position, werden auch D-Aminoacylreste in P_2 -Position toleriert [7]. In der P_1' -Position akzeptiert die DP IV alle proteinogenen oder modifizierten Aminoacylreste, außer Prolin oder einem N-alkylierten Aminoacylrest [6, 140, 141]. Ein protonierter α -Aminoterminus ist für die Substraterkennung notwendig [142]. Der N-terminale α -Aminoacylrest kann durch einen β -Allyl- oder γ -Aminobutyrylrest ersetzt werden. Ein ϵ -Aminohexanoylrest wird jedoch nicht mehr akzeptiert [7].

Durch Lojda und Mitarbeiter (1977) wurde DP IV erstmals als auf Immunzellen lokalisiert beschrieben [113]. Spätere Arbeiten zeigten, daß DP IV sowohl mit einem Aktivierungsmarker von T-Lymphocyten, dem CD 26, als auch mit dem Adenosindeaminase-Rezeptor identisch ist [136, 144]. 1992 wurde die humane DP IV durch Misumi und Mitarbeiter kloniert und sequenziert [121].

Im Immunsystem wird der DP IV eine regulatorische Funktion bei Aktivierung und Proliferation von T-Lymphocyten zugeschrieben [298, 302]. Mit Hilfe synthetischer Inhibitoren der DP IV, die hemmend auf verschiedene T-Zellfunktionen wirken (u. a. Proliferation, IL-2-Produktion), konnte gezeigt werden, daß der enzymatischen Aktivität der DP IV bei diesen Regulationsprozessen eine wichtige Rolle zukommt. In diesem Zusammenhang wird das Prozessieren immunologisch aktiver Peptide durch die DP IV

diskutiert [17, 147]. Konkrete Aussagen über immunologisch relevante, natürliche Substrate bzw. DP IV-spezifische Spaltprodukte konnten bisher jedoch nicht getroffen werden.

Monoklonale Antikörper gegen DP IV haben auf T-Zellen zumeist stimulatorische bzw. costimulatorische (in Kombination mit anti-CD 3) Wirkung. Es ist denkbar, daß durch die Antikörper Epitope stimuliert werden, an denen unter physiologischen Bedingungen bisher nicht näher charakterisierte Liganden binden. In welcher Weise derartige Signale, vermittelt über das DP IV-Molekül, weitergeleitet werden, ist ungeklärt. Torimoto und Mitarbeiter konnten allerdings eine Assoziation von DP IV- und CD 45-Tyrosinphosphatase nachweisen [148]. Mittrücker und Mitarbeiter zeigen, daß der zytoplasmatische Teil der T-Zell-Rezeptor- ζ -Kette an der Signalübertragung beteiligt ist. Für diese Antikörper-induzierte Signalvermittlung ist, wie die Untersuchungen von Fleischer und Mitarbeitern an verschiedenen DP IV-transfizierten Jurkat-Zelllinien belegen, die enzymatische Aktivität der DP IV nicht erforderlich [17].

Als natürliche extrazelluläre Effektoren von DP IV sind bisher Adenosindeaminase (ADA) [136, 144, 149], Kollagenstrukturen [17] sowie das HIV-1-*tat*-Protein bekannt [150]. Die Adenosindeaminase hat von den bisher bekannten Effektoren die höchste Affinität zur DP IV ($K_D = 10^{-8} - 10^{-10}$ M), jedoch hat diese Bindung keinen Einfluß auf die Aktivität beider Enzyme [149]. Die physiologische Funktion dieser Wechselwirkung ist unklar.

Der Bindung von DP IV an Kollagen und andere Proteine der extrazellulären Matrix wird eine Funktion bei Adhäsionsprozessen zugeschrieben [17, 151 - 153]. Durch die Arbeiten von Reutter konnte die Bindungsseite des Kollagens in einem 33 kDa großen Bruchstück der cysteinreichen Domäne der DP IV lokalisiert werden [128].

Vom HIV-1-*tat*-Protein weiß man, daß es die enzymatische Aktivität der DP IV nichtkompetitiv hemmt und die Antigen-induzierte Proliferation von T-Zellen inhibiert. Das HIV-1-*tat*-Protein bindet spezifisch an ein Epitop der DP IV, das auch durch den monoklonalen Antikörper Ta1 erkannt wird [150, 155 - 166].

Die Wechselwirkung von DP IV mit dem V3-Loop des HIV-gp120-Proteins und die damit verbundene Funktion als HIV-Corezeptor ist nach wie vor umstritten [150]. Jedoch konnten Hovanessian und Mitarbeiter zeigen, daß durch gp120 bevorzugt in CD 26⁺-T-Zellen Apoptose induziert wird.

Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1 - 42 (GIP₁₋₄₂) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7 - 36 (GLP-1₇₋₃₆) [103, 167 - 169], Hormone, die die Glukose-induzierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch *Incretine* genannt), sind Substrate der DP IV, da sie von den N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die

Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin *in vitro* und *in vivo* abspalten können.

Die Reduktion der DP IV-Enzymaktivität führt sowohl unter Laborbedingungen als auch in pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen dazu, den Abbau von GIP₁₋₄₂ und GLP-1₇₋₃₆ wirksam zu unterdrücken [104]. Diabetes mellitus Typ II, auch Altersdiabetes genannt, basiert auf einer verminderten Insulinsekretion bzw. Störungen in der Rezeptorfunktion, die u. a. in proteolytisch bedingten Konzentrationsanomalien der Incretine begründet sind [167 - 169]. Die Verabreichung von Effektoren der DP IV an einen Säugerorganismus verlangsamt den DP IV-katalysierten Abbau der endogenen insulinotropen Peptide GIP₁₋₄₂ und GLP-1₇₋₃₆. Damit wird die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone im Blut verzögert. Durch die herabgesetzte DP IV-Aktivität stehen die Peptidhormone länger und in erhöhter Konzentration zur Stimulierung der Insulinausschüttung an den B-Zellen der Langerhansschen Inseln zur Verfügung. Die Blutzuckerkonzentration kann somit durch Verabreichung eines DP IV-Inhibitors zusammen mit der Nahrungsaufnahme beeinflusst werden.

Damit ist Dipeptidylpeptidase IV ebenso wie Prolylendopeptidase interessantes Target für potente niedermolekulare Wirkstoffe, die als Kandidaten für eine Pharmakontwicklung betrachtet werden können.

1.2. Inhibitoren

1.2.1. Inhibitoren von Serinproteasen

Für Serinproteasen wurden in den letzten Jahren exemplarisch zahlreiche Inhibitorentwicklungen durchgeführt [170 - 172]. Erste Versuche, Inhibitoren für diese Proteasen zu kreieren, führten vor ca. 2 Jahrzehnten zu Überlegungen, die katalytisch aktiven Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms durch chemisch reaktive Verbindungen zu blockieren. Inhibitoren der Serinproteasen lassen sich nach ihrem Bindungsverhalten bzw. nach ihrer Art, mit den Zielenzymen chemisch zu interagieren, einstufen (Abbildung 5). Irreversible Inhibitoren gehen mit dem Enzym eine dauerhafte Bindung ein. Reversible Inhibitoren bilden für eine begrenzte Zeit mit dem Zielenzym einen Enzym-Inhibitor-Komplex, der wieder in die Bestandteile zerfällt. Da PEP und DP IV mechanistisch zur Klasse der Serinproteasen gehören, wird an dieser Stelle nur kurz auf Vertreter von Inhibitoren dieser Enzymklasse eingegangen.

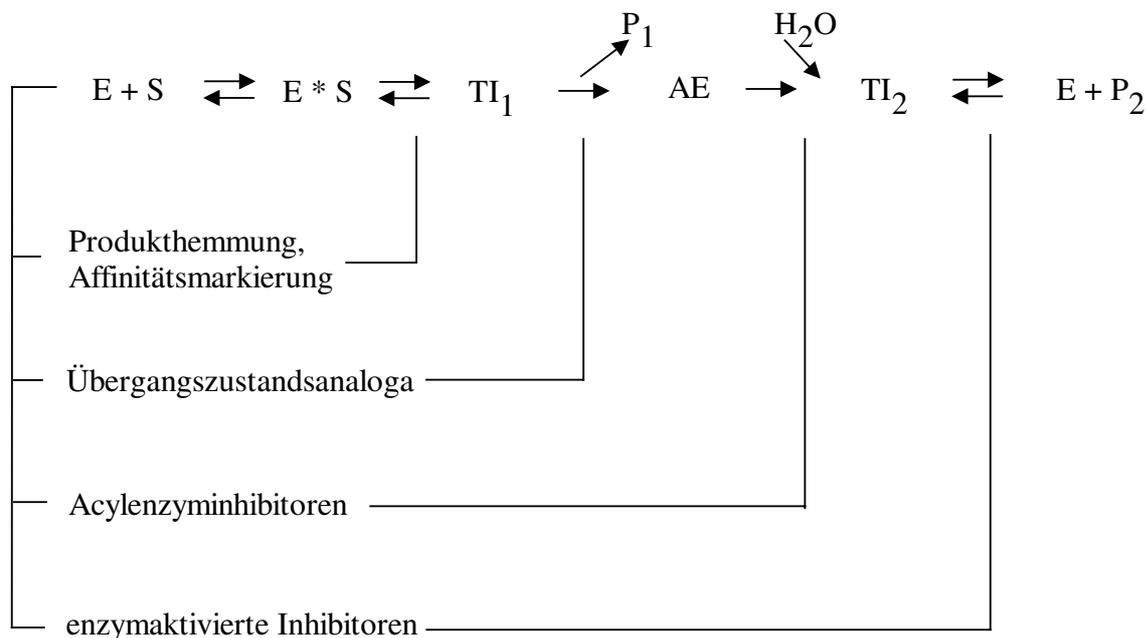


Abb. 5: Katalyseschema der Substrathydrolyse prolin-spezifischer Proteasen mit den Angriffspunkten der jeweiligen Inhibitortypen im Reaktionsverlauf

Zur Markierung und Charakterisierungen des Serinrestes im aktiven Zentrum werden phosphororganische Verbindungen, wie z. B. Diisopropylfluorophosphat, verwendet

[111, 142, 173 - 175, 304]. Histidinreste, die am Katalysemechanismus von Serinproteasen beteiligt sind, werden für gewöhnlich mit Diethylpyrocarbonat zur Charakterisierung dieser Enzyme markiert [8].

Als Beispiel irreversibler Inhibitoren der Serinproteasen können die als Affinitätsmarker verwendeten Halomethylketone genannt werden. Substratanaloge Chlormethylketonderivate inhibieren PEP und DP IV irreversibel [32, 178]. Die Beteiligung eines Histidinrestes am Katalysemechanismus konnte über dessen Alkylierung mittels Halomethylketonen nachgewiesen werden [142]. Die chemische Reaktivität, z. B. der Chlormethylgruppierung, führt jedoch außerhalb des Zielenzym zu unspezifischen Nebenreaktionen im Organismus [141]. N-terminal geschützte Chlormethylketone sind unter physiologischen Bedingungen stabile Verbindungen, dagegen zerfallen die entsprechenden N-terminal-ungeschützten DP IV-Inhibitoren mit Halbwertszeiten kleiner als 6 Minuten [178].

Spezifischer sind die sogenannten Selbstmordsubstrate, die erst nach Bindung am Enzym eine reaktive Gruppierung freisetzen. Dies führt zu einer irreversiblen Modifizierung des aktiven Zentrums durch Alkylierung des Zielenzym [181]. Anzuführen sind hier die Substanzklassen der N-Nitrosamine [182, 183] und Haloenollactone [184]. N-Peptidyl-O-acylhydroxylamine sind als gute Suizid-Inhibitoren von Cystein- und Serinproteasen bekannt [185 - 187, 305].

Hervorzuheben sind unter den reversiblen Serinprotease-Inhibitoren die transition-state-Inhibitoren und die Mechanismus-orientierten Acylenzyminhibitoren [293 - 295, 307]. Letztere wurden auf der Basis der bei der Katalyse durch Proteasen entstehenden Acylenzyme entwickelt [188, 189]. Die Verbindungen zeichnen sich durch eine schnelle Bildung des Acylenzym aus, sind jedoch in ihrem Deacylierungsschritt stark verlangsamt und wirken daher inhibitorisch [190, 191]. Die Grenze zu irreversiblen Inhibitoren ist hier fließend [192].

Zur Inhibitoriklasse der Übergangszustandsanaloge (transition-state) gehören die Peptidyltrifluormethylketone [193 - 196], die Peptidylaldehyde [197, 198] und die Peptidylboronsäuren [199, 200]. Auf der Basis dieser Verbindungen wurden auch übergangszustandsanaloge Inhibitoren der DP IV entwickelt [201, 202]. Die Verbindung L-Pro-L-boroPro ist mit einem K_i -Wert von 16 pM der stärkste bekannte Inhibitor der DP IV [162, 201, 303]. Peptidylboronsäuren sind unter physiologischen Bedingungen nicht stabil. Es kommt zur Cyclisierung und damit zur Inaktivierung der Inhibitoren [203, 204].

1.2.2. Inhibitoren der Prolylendopeptidase und Dipeptidylpeptidase IV

Bei der PEP- bzw. DP IV-katalysierten Hydrolyse von prolinhaltigen Peptiden wurde festgestellt, daß die dabei entstehenden Produkte inhibierend auf die spaltende Protease wirken [32]. Dipeptide haben Inhibierungskonstanten im Bereich von 5 - 100 μM , bezogen auf die DP IV-katalysierte Hydrolyse [1, 122, 177]. Xaa-Pro-Dipeptide sind neben dem HIV-1-*tat*-Protein [165] die einzigen bekannten endogenen Inhibitoren der DP IV. Hydrophobe Aminosäuren in N-terminaler Position erniedrigen die K_i -Werte der Dipeptide [177]. Z-Gly-Pro-OH hemmt PEP aus Lammniere mit einem K_i -Wert von 0,53 mM [205].

Generell führt der C-terminale Verlust der Carbonsäurefunktion an Dipeptiden der Form R-Xaa-Pro-OH zu potenten Inhibitoren (Abbildung 6).

Der Einsatz von Pyrrolidin führt zu einer Verbesserung der Inhibitorwirkung. N-Acylpyrrolidid hemmt die PEP [206 - 208]. Eine effektive Hemmung von DP IV durch N-terminal ungeschützte Aminosäure-Pyrrolidide wurde ebenfalls nachgewiesen [177, 209]. H-Ile-Pyrrolidid hemmt mit einem K_i -Wert von 243 nM die DP IV-katalysierte Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA.

Versuche, den Prolinring in diesen Dipeptiden zu modifizieren, führte Tsura [198] zu den Thiazolidid-Derivaten als PEP-Inhibitoren. Z-Thiopropylthiazolidid weist einen K_i -Wert von 0,36 nM gegenüber PEP aus Rinderhirn auf. Im Vergleich dazu wurde für Z-Thiopropylpyrrolidid nur ein K_i -Wert von 210 nM bestimmt [198, 208]. Für Ile-Thiazolidid wurde ein K_i -Wert von 126 nM für die reversible kompetitive Inhibierung der DP IV von Steinmetzer [212] ermittelt.

Die Einführung von reaktiven funktionellen Gruppen (Aldehyde, Nitrile etc.) erhöhte die Potenz der Inhibitoren gegenüber den Zielenzymen PEP bzw. DP IV erneut. Ursache für diese verbesserte Affinität zum Enzym ist die Ausbildung eines tetrahedralen Intermediates zwischen der C-terminal eingeführten funktionellen Gruppe und des Serinrestes der Zielenzyme PEP bzw. DP IV. Aminosäurepyrrolidin-2-nitrile inhibieren DP IV kompetitiv [210, 211]. Das Problem für eine therapeutische Anwendung ist die Giftigkeit dieser Verbindungsklasse.

Peptidaldehyde mit C-terminalem Thioprolinalrest [192] sind eine weitere Substanzklasse von reversiblen PEP-Inhibitoren. Z-Thiopropylthioprolinal inhibiert PEP aus Rinderhirn mit einem K_i -Wert von 0,01 nM [198]. Die Anlagerung des Prolinalrestes an der S_1 -Bindungsstelle der PEP erfolgt unter Ausbildung eines sehr stabilen Hemiacetals mit dem Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms [214].

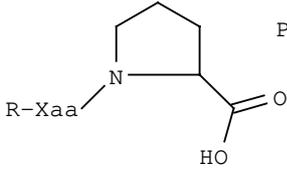
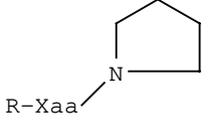
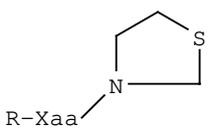
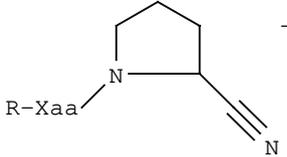
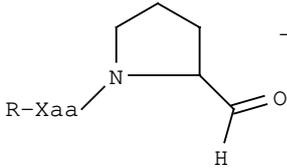
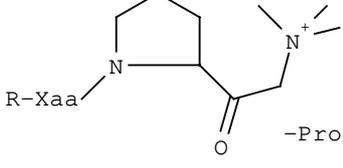
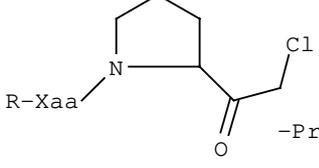
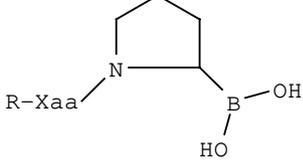
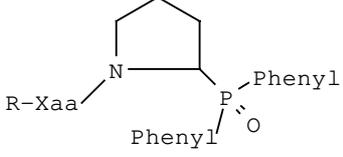
K_i -Werte für PEP R = Schutzgruppe		K_i -Werte für DP IV R = H
mM	 Peptidyl-Prolin	μM
μM	 -Pyrrolidid	nM
μM	 -Thiazolidid	nM
nM	 -2-Cyano-Pyrrolidid	nM
μM	 -Prolinal	instabil
nM	 -Prolyl-Ammonium-Methylketon	μM
μM	 -Prolyl-Chlor-Methylketon	μM
nM	 -Prolylboronsäure	pM
nM	 -Phosphonopyrrolidid	μM

Abb. 6: Schematische Darstellung der auf Basis von Pyrrolidin abgeleiteten DP IV- und PEP-Inhibitoren mit Konzentrationsbereichen für die jeweiligen Hemmkonstanten

Als nachteilig für die Substanzklasse der N-terminal geschützten Aminosäureproline hat sich herausgestellt, daß die Verbindungen in Lösung in einer ringförmigen Struktur vorliegen [214]. Die Aldehydfunktion interagiert dabei mit der Carbonylfunktion der Z-Schutzgruppe unter Zuhilfenahme des Wasserstoffatoms der angrenzenden Peptidbindung. Diese cyclisierten Peptidaldehyde hemmen die PEP nicht mehr. Einen ähnlichen Verlust der inhibierenden Eigenschaften gegenüber DP IV stellte Fischer bei den zu Dikotepiperazinen cyclisierten Dipeptiden fest [215]. Z-Pro-Prolinal bildet keine Ringstruktur [192] und inhibiert PEP aus Mäusehirn nach einem slow-binding Mechanismus (Abbildung 7) [216].

Bei der Inhibitorklasse der Azapeptide ist die α -Methingruppe der P₁-Aminosäure durch ein Stickstoffatom substituiert. Bei der Hydrolyse substratanaloger Azapeptidderivate durch Proteasen werden stabile Acylenzyme gebildet, die zum Teil erst nach Tagen unter physiologischen Bedingungen reaktivieren [217, 218]. Substratanaloge Azapeptide als Acylenzyminhibitoren bilden mit DP IV stabile Acylenzyme mit Reaktivierungszeiten zwischen Sekunden bis einigen Minuten [219, 220].

Shaw [221] und Green [222] inaktivierten PEP mittels spezifischer Peptidyl-Diazomethylketon-Derivate irreversibel. Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der Inhibierungsreaktion beträgt etwa $6000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und ist etwa 2 Größenordnungen größer als bei der Reaktion von PEP mit analogen Chlormethylketonen.

Dipeptidazide entfalten ihre inhibitorische Wirkung über die Bildung reaktiver Stickstoffintermediate [185, 223]. Solche Carbonylazide lagern unter Stickstoffverlust und Nitrenbildung zu Isocyanaten um [225]. Durch welche Zwischenstufe dieser Umlagerungsreaktion die irreversible DP IV-Inaktivierung erfolgt, ist unbekannt. In wässriger Lösung sind diese Inhibitoren instabil.

Wesentlich stabiler sind die N-Peptidyl-O-(p-Nitrobenzoyl)-Hydroxylamine [306]. Die Halbwertszeiten des nichtenzymatischen Zerfalls liegen bei über 6 Stunden (30 °C). O-Acylhydroxamsäuren können thermisch unter Bruch der N-O-Bindung und Austritt des anionischen Acylrestes zu Isocyanaten umlagern [226] bzw. kommt es dabei intermediär zur Nitrenbildung. Beide Intermediate führen in der Folge zu einer effektiven Inaktivierung der beteiligten Zielproteasen. Hydroxamsäuren als auch Azide wirken nicht nur inhibierend auf DP IV, sondern werden in erheblichem Umfang von diesem Enzym hydrolysiert [227, 228].

Peptidyl-Sulfoniummethylketonsalze wirken ebenfalls inhibierend auf Serinproteasen [229 - 231]. Vom Sulfoniumrest hängt es ab, ob es sich dabei um irreversible, klassisch kompetitive oder slow-binding Inhibierung handelt.

Waxselmann et al. [235] synthetisierten ein cyclopeptidisches Sulfoniumsalz der Struktur $c[(^6\text{H}_3\text{N}^+)\text{-Lys-Pro-Aba-(6-CH}_2\text{-S}^+\text{R}_2\text{)-Gly}_2] / 2 \text{ TFA}^-$, das die DP IV als Suizid-Substrat irreversibel mit $\text{IC}_{50}=0,7 \mu\text{M}$ hemmt. Mit dieser cyclischen Struktur sollte eine potentielle intramolekulare Cyclisierung des Inhibitors vermieden werden.

Aminoacylphosphonoprolindiphenylester sind spezifische irreversible DP IV-Inhibitoren mit hoher Stabilität, die aber synthetisch schwer zugänglich sind [233, 234]. Die Hemmkonstanten dieser Phosphono-peptide liegen im Bereich von $100 \mu\text{M}$.

Poststatin, ein lineares Peptid mit einer α -Keto- β -Amidgruppierung, aus *Streptomyces viridochromogenes MH534-30F3* und Eurystatin A und B, cyclische Peptide, die sich in einer Aminoacylseitenkette unterscheiden und ebenfalls eine α -Keto- β -Amidgruppierung aufweisen, aus *Streptomyces eurythermus R353-21*, sind natürlich vorkommende PEP-Inhibitoren [236 - 239]. Ihre Inhibierungskonstanten sind mit den Werten für die Hemmung durch Z-Val-Prolinal vergleichbar.

Endogene DP IV-spezifische Inhibitoren sind bisher nicht bekannt. Aus Schweine-Pankreas [240] und Rattenhirn [241] wurden endogene PEP-Inhibitoren mit Molekulargewichten um 7000 Da mit Hemmkonstanten von $10 \mu\text{M}$ bzw. $2,6 \mu\text{M}$, die damit im Bereich von typischen Bindungskonstanten der Substrate liegen, isoliert. Acyl-Coenzym-A-Derivate, die ebenfalls isoliert wurden, hemmen PEP aus Rattenleber allerdings nichtkompetitiv [86].

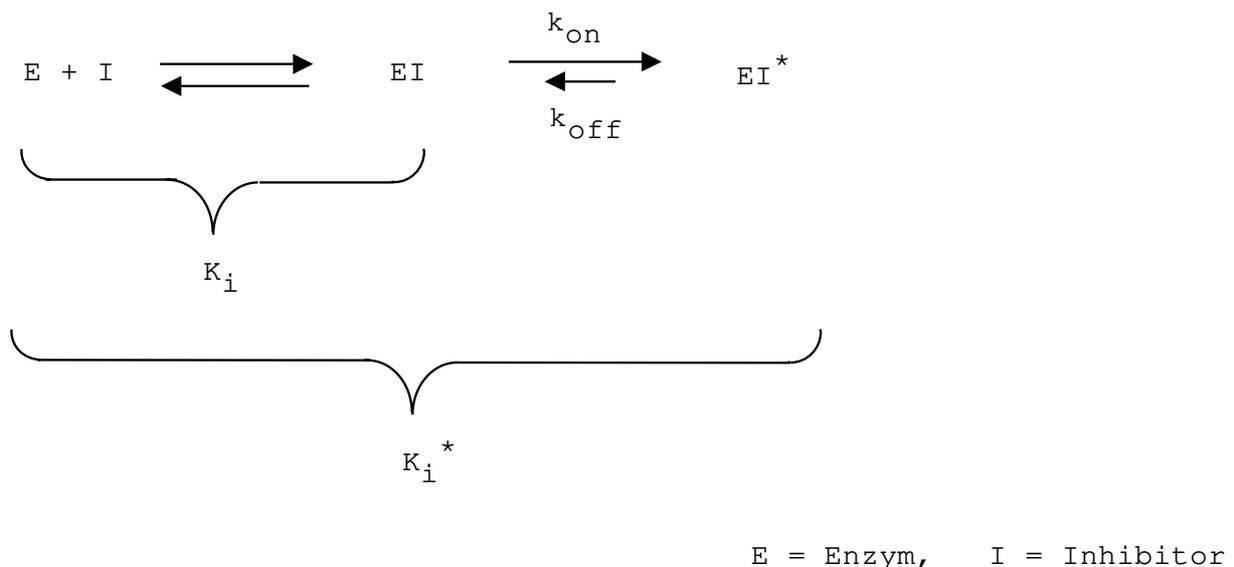


Abb. 7: Schematische Darstellung des slow-binding Mechanismus der Enzyminhibierung mit den entsprechenden kinetischen Parametern

Tab. 1: Inhibitoren für Prolylendopeptidase und Dipeptidylpeptidase IV

Verbindung	Inhibierung	Bemerkung	Enzym	Inhibierungs- konstante
Peptide und Dipeptide	reversibel, kompetitiv	unspezifisch	PEP	$K_i = \text{mM} - \mu\text{M}$
			DP IV	$K_i = \text{mM} - \mu\text{M}$
Peptidylchloromethylketone	irreversibel, kovalent	biologisch instabil	PEP	$k_{\text{inact}}/K_i = 50 - 90$ $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$
			DP IV	$k_{\text{inact}}/K_i = 20$ $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$
Peptidyl-Ammonium- Methylketone bzw. Peptidyl-Pyridinium- Methylketone	slow-binding, nichtkovalent	hohe Affinität, potenter Inhibitor	PEP	$k_{\text{on}}/K_i = 100.000$ $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$
			DP IV	$k_{\text{on}}/K_i = 2713$ $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$
Peptidaldehyde	reversibel, slow-binding	oxidations- empfindlich, Trimerisierung	PEP	$K_i = \mu\text{M} - \text{pM}$
N-peptidyl-O-acyl- hydroxylamine	irreversibel, Suizid- Inhibitoren	Umsetzung im wesentlichen als Substrat	PEP	$k_{\text{inact}}/K_i = 24$ $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$
			DP IV	$k_{\text{inact}}/K_i = 20$ $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$
Peptidylpyrrolidide	reversibel, kompetitiv	potent, stabil	PEP	$K_i = \mu\text{M}$
Aminoacylpyrrolidide			DP IV	$K_i = \text{nM} - \mu\text{M}$
Peptidylthiazolidide	reversibel, kompetitiv	potent, stabil	PEP	$K_i = \mu\text{M} - \text{nM}$
Aminoacylthiazolidide			DP IV	$K_i = \mu\text{M} - \text{nM}$
Peptidylboronsäuren	reversibel	giftig, instabil, Cyclisierung	PEP	$K_i = 4 - 60 \text{ nM}$
			DP IV	$K_i = 16 \text{ pM}$
Peptidylphosphonate	irreversibel	synthetisch schwer zugänglich	DP IV	$k_{\text{inact}}/K_i = 1500$ $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$
Azapeptide	Acylenzym- Inhibitor, reversibel	bei prolinspez. Enzymen uneffektiv	DP IV	$K_i = \text{mM} - \mu\text{M}$
Dipeptidazide	irreversibel	hydrolytisch instabil	DP IV	$k_{\text{inact}}/K_i = 600$ $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$
Peptidyl diazomethylketone	irreversibel	reagieren mit biogenen Aminen	PEP	$k_{\text{inact}}/K_i = 6000$ $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$
Peptidylsulfonium-Methylketone	irreversibel, kompetitiv, slow-binding	potenter Inhibitor, potentiell giftig	DP IV	nicht bestimmt

Als eine interessante Substanzklasse von PEP- bzw. DP IV-Inhibitoren haben sich die Ammonium- und Pyridinium-Methylketone herausgestellt. Der wesentliche Vorzug dieser Verbindungen besteht in der Substitution der Carbonamidgruppierung, die normalerweise durch eine Protease hydrolysiert wird, durch die Gruppierung $-\text{CO}-\text{CH}_2-$, die damit einen proteolytischen Angriff verhindert. Die prinzipielle Eignung von Ammonium- und Pyridinium-Methylketon-Derivaten als Inhibitoren der PEP und DP IV wurde von Steinmetzer [212, 232] gezeigt:

- Ammonium- und Pyridinium-Methylketone sind chemisch inert.
- Die Substanzklasse ist ungiftig.
- Die Inhibitorsequenz $-\text{Pro}-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}_3$ ist von DP IV bzw. PEP nicht spaltbar.
- Die Grundstruktur der Ammonium- bzw. Pyridinium-Methylketone läßt sich C-terminal verlängern.

Ammonium- und Pyridinium-Methylketone inhibieren die DP IV nach einem slow-binding Mechanismus (Abbildung 7) mit K_i -Werten im mikromolaren Bereich [232]. Ein wesentlicher Teil der hier vorliegenden Arbeit beschreibt Struktur-Wirkungsanalysen von homologen Serien dieser Verbindungen, die mit dem Ziel der Strukturoptimierung durchgeführt worden sind (Kapitel 2).

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1. Synthese der untersuchten PEP- und DP IV-Inhibitoren

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierten Inhibitoren der PEP und DP IV sind Vertreter der Strukturklasse der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone, z. B. N-terminal geschützt in der Form Z-Xaa-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄R)/Cl⁻ (Abbildung 8).

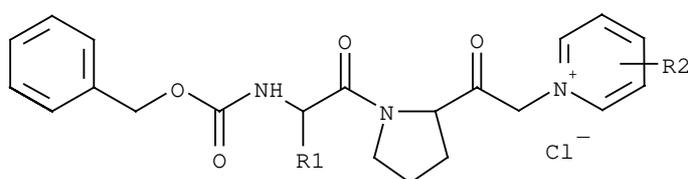


Abb. 8: Strukturformel der Z-Xaa-Pro-Pyridinium-Methylketon-Derivate, R1 = Aminosäureseitenkette, R2 = H, COOH, Peptid etc.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Modifikationen am Pyridinring vorzunehmen, die zu einer erhöhten Effizienz der Verbindungen als Inhibitoren für PEP und DP IV führen sollten. Variiert wurden die Position, Art und Länge des Substituenten am Pyridinring. Ebenfalls verändert wurden die Ringgröße und der Hydrierungsgrad im Ring. Durch ¹³C-Markierung der Prolin-Carbonylgruppe wurde beabsichtigt, mittels NMR-Untersuchungen, Hinweise für den Mechanismus der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung zu erhalten.

2.1.1. Synthese von Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivaten

Als Synthesebaustein und damit für die Erkennungssequenz wurde das Peptid Z-Phe-Pro gewählt, welches sich schon durch seine hydrophobe Struktur als affiner Bindungspartner der PEP anbot [177].

Die Synthese der Peptidyl-Ammonium- bzw. Peptidyl-Pyridinium-Methylketone und deren Einsatz als Proteaseinhibitoren wurde von Steinmetzer beschrieben [212, 232]. Gordon stellte peptidische Inhibitoren mit dem Strukturelement -CO-CH₂-N⁺(CH₃)₂-CH₂-CO- für das angiotensin converting enzyme (ACE) vor [291]. Eine Reihe von Arbeiten zur Synthese von

nichtpeptidischen quartären Ammoniumverbindungen aus Alkylhalogeniden, Halogenethern, -ketonen, -aldehyden und -carbonsäuren sind ebenfalls bekannt [243 - 245]. Einen Überblick zur Darstellung und Verwendung von Pyridiniumsalzen gibt Kröhnke [246]. Strukturähnliche Phosphonylammoniummethylketone wurden von Janda als HIV-Protease-Inhibitoren eingesetzt [247].

2.1.2. Darstellung der Peptidyl-Chlormethylketon-Komponente

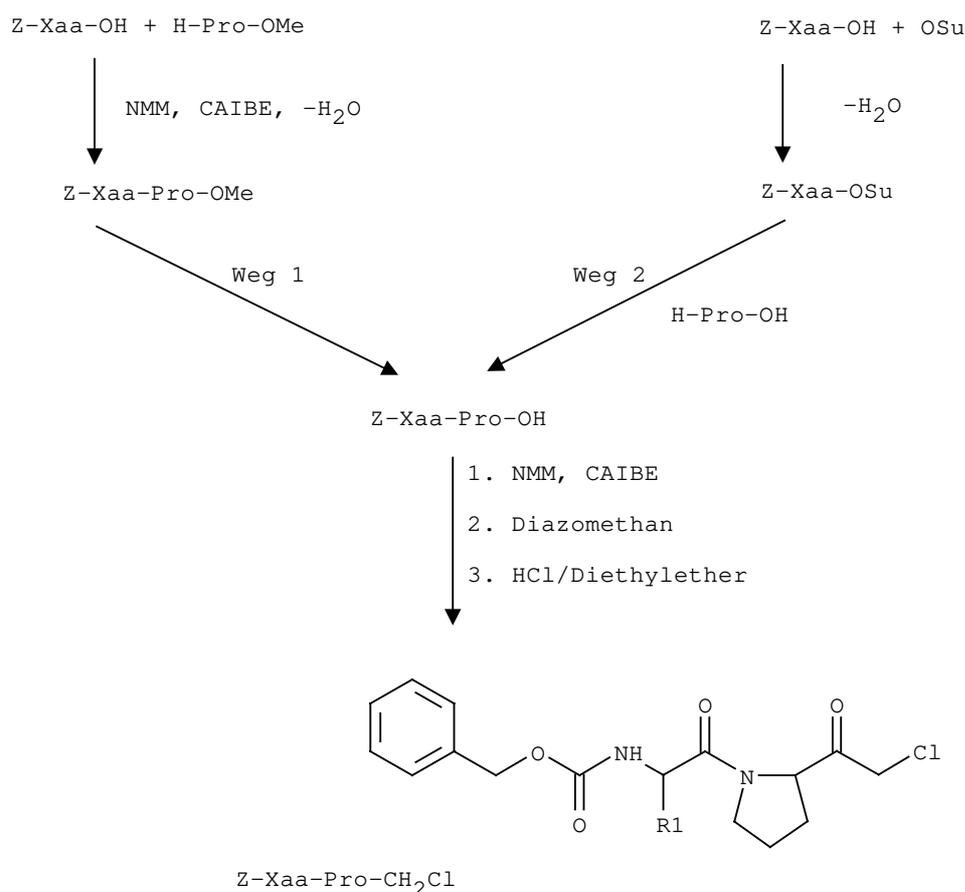


Abb. 9: Reaktionsschema der Synthese von Z-Xaa-Pro-Chlormethylketon-Derivaten, R1 = Aminosäureseitenkette

Ausgangsverbindung fast aller Strukturvariationen ist das Chlormethylketon der Struktur Z-Phe-Pro-CH₂Cl (Abbildung 9) [248]. Dieses Chlormethylketon wurde aus dem C-terminal freien Dipeptid-Derivat Z-Phe-Pro-OH und Chlorameisensäureisobutylester über das

Mischanhydrid [249] mittels Diazomethan [93, 245] und anschließender Aufarbeitung der Reaktionsmischung mit etherischer HCl-Lösung dargestellt. Als Nebenprodukt kann das entsprechende Hydroxymethylketon entstehen. Daher muß darauf geachtet werden, in jedem Fall wasserfrei zu arbeiten. Z-Phe-Pro-OH wurde auf zwei unterschiedlichen Synthesewegen hergestellt. Zum einen läßt sich Z-Phe-Pro-OH durch Verseifung aus Z-Phe-Pro-OMe darstellen [245, 250, 251]. Die Kupplung von Z-Phe-OH mit H-Pro-OMe über die Mischanhydridmethode führte zum erforderlichen Ester (Weg 1). Andererseits läßt sich Z-Phe-Pro-OH direkt aus dem Aktivester [250, 251] Z-Phe-OSu durch Reaktion mit dem ungeschützten Prolin synthetisieren (Weg 2). Auf diesem Reaktionsweg wurde die für die NMR-Untersuchung verwendete ¹³C-markierte Verbindung synthetisiert. Diese Reaktion sollte mit einem Überschuß an Prolin durchgeführt werden, um eine vollständige Umsetzung des Esters zu erzielen. Da durch Extraktion Z-Phe-OH nur schwer vom Produkt Z-Phe-Pro-OH zu trennen ist, wurde Weg 1 bevorzugt, um im weiteren Syntheseverlauf Fehlsequenzen zu vermeiden. Die Ausbeute beider Synthesewege wich nur geringfügig voneinander ab (siehe exp. Teil 5.5.). Z-Phe-Pro-OH wurde, wie bereits beschrieben, zum Chlormethylketon umgesetzt.

2.1.3. Nucleophile Substitution am Chlormethylketon

Das dargestellte Dipeptidylchlormethylketon kann durch nucleophile Substitution des Chloratoms zu den entsprechenden Ammonium- bzw. Pyridinium-Methylketonen umgesetzt werden (Abbildung 10). Als Nucleophil fungiert mit seinem freien Elektronenpaar dabei der Stickstoff des angreifenden Amins [245]. Dabei reagieren die Amine um so schneller, je nucleophiler sie sind. Sterisch anspruchsvolle Amine reagieren langsamer. Lösungsmittel mit hohem Dipolmoment bewirken einen wesentlich schnelleren Reaktionsverlauf. Wird eine Komponente im Überschuß eingesetzt, so begünstigt dieses die Ausbeute. Diese Faktoren wurden auch durch die unterschiedlichen Ausbeuten der einzelnen nucleophilen Substitutionsreaktionen bestätigt. Die bei der Synthesepanung zu beachtenden Schwierigkeiten sind im Detail nachfolgend erläutert.

Verbindungen wie Isonicotinsäure, Nicotinsäure, Picolinsäure, Pyridin, Piperidin und Pyrrolidin wurden im Überschuß gegenüber dem Chlormethylketon eingesetzt, wobei Pyridin, Piperidin und Pyrrolidin gleichzeitig als Lösungsmittel für die jeweilige Substitutionsreaktion dienten. Der Überschuß wurde nach beendeter Reaktion abdestilliert.

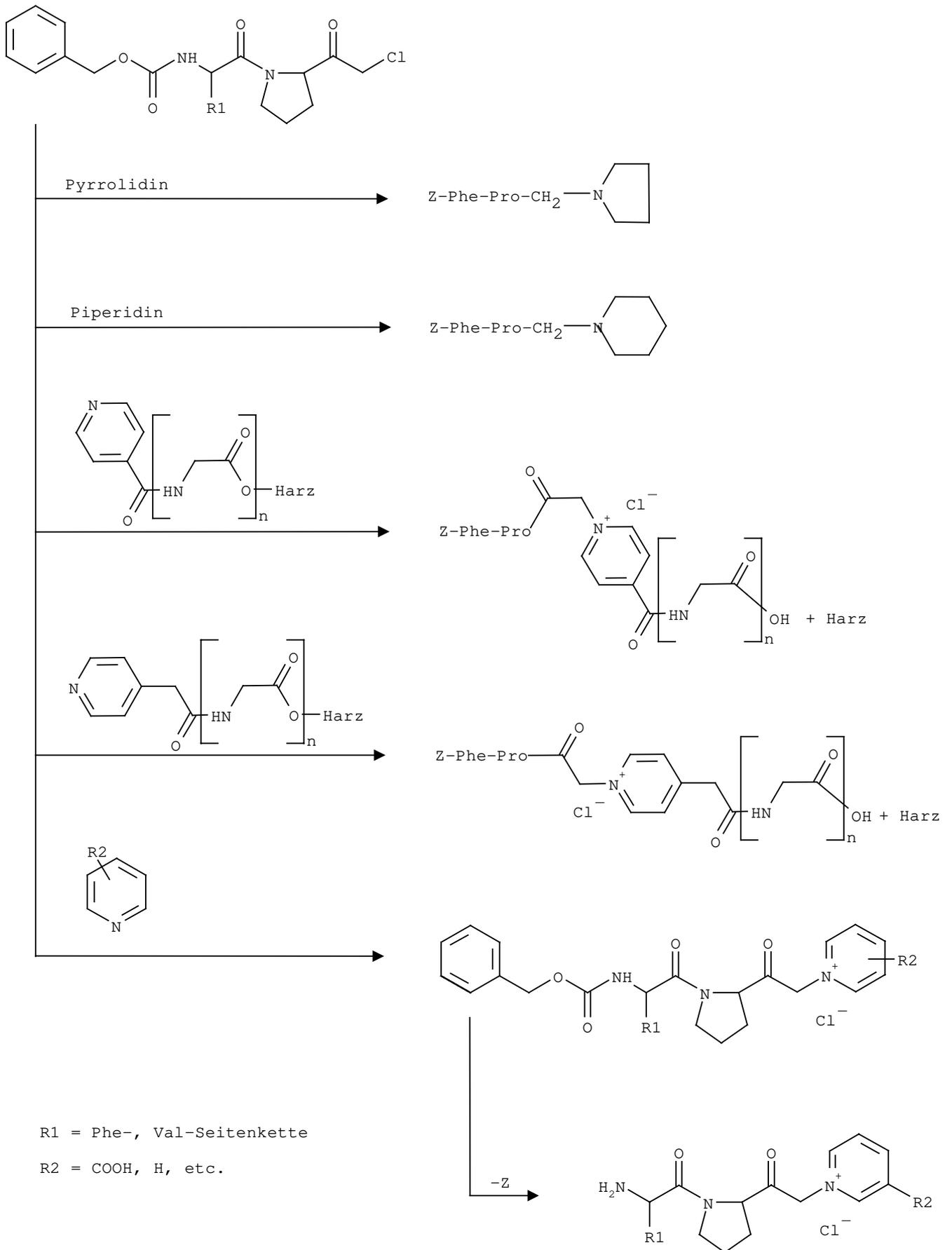


Abb. 10: Syntheschema für Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivate und analoge Verbindungen

Die Stellungsisomere Isonicotinsäure, Nicotinsäure und Picolinsäure sind dagegen Feststoffe, welche die Wahl der Reaktionsbedingungen erschwerend, nur in Dimethylsulfoxid nennenswerte Löslichkeit aufweisen [252]. Die Reaktion wurde folglich in DMSO durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde anschließend abdestilliert. Das Produkt löste sich in herkömmlichen polaren Lösungsmitteln wie Aceton oder Ethanol. Die Edukte Isonicotinsäure, Nicotinsäure und Picolinsäure hingegen nicht, weshalb diese Verbindungen durch Filtration abgetrennt wurden. Die sterische Hinderung des nucleophilen Angriffs, bedingt durch den Carbonsäuresubstituenten der Picolinsäure in direkter Nachbarschaft zum Stickstoffatom, wirkte sich auf die Ausbeute in der Substitutionsreaktion aus. Diese Verbindung wurde nur in 12 % Ausbeute isoliert.

Pyrrrol reagierte bei diesen Bedingungen nicht als Nucleophil mit dem Chlormethylketon, da zwei Elektronen vom Stickstoff zur Bildung des aromatischen π -Elektronensextetts beigesteuert wurden. Trägt der Pyridinring zu viele elektronenziehende Substituenten, nimmt ebenfalls die Nucleophilie am Stickstoff ab. So reagierte Pyridin-3,5-dicarbonsäure und 2-Chlor-3,5-dinitropyridin nur noch in geringer Ausbeute (< 2 %) mit dem Chlormethylketon. Darin zeigt sich, daß eine Zunahme von elektronenziehenden Substituenten am Pyridinring die Substitutionsreaktion hemmt. Elektronenzug sollte zwar für die inhibierende Wirkung der entstehenden Verbindung auf die Aktivität von PEP und DP IV von Vorteil sein, findet jedoch im abnehmenden nucleophilen Charakter des Pyridinringes synthetische Grenzen.

Eine von King beschriebene Methode zur Alkylierung nichtquartärer Ammoniumverbindungen [253] wurde auf die Synthese der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone angewandt. Demnach sollte der acide Wasserstoff einer nichtquartären Ammoniumgruppe grundsätzlich mit Hilfe aliphatischer Diazoverbindungen gegen Alkylreste austauschbar sein. Die Reaktion von Isonicotinsäure mit Z-Phe-Pro-CHN₂ führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt.

2.1.4. C-terminale Verlängerung von Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen durch eine Glycinkette

Eine weitere Entwicklung der Variation des C-Terminus an N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure bzw. N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylelessigsäure stellte die C-terminale Verlängerung durch eine Glycinkette dar. Hier wurde die Festphasensynthese mit der oben genannten Synthese in Lösung (Abbildung 10) kombiniert. Glycinketten unterschiedlicher Länge (n = 1 – 10) wurden nach der Fmoc-Strategie an Wang- oder Sasrin-Harz mit Fmoc-

Gly-OH, TBTU und Diisopropylethylamin aufgebaut. Der Einsatz von Fmoc-Gly-Gly-OH, um die Anzahl der Syntheseschritte zu minimieren und damit die Syntheszeit zu verkürzen, führte nicht zum gewünschten Erfolg. Letzter Baustein der Festphasensynthese am N-Terminus war entweder Pyridylelessigsäure oder Isonicotinsäure bzw. Nicotinsäure. Im letzten Syntheseschritt war darauf zu achten, daß zwecks Löslichkeit die Base mit der Säurekomponente und nicht mit TBTU gemischt wird, um anschließend dem Harz im Reaktionskolben des Halbautomaten zugegeben zu werden. Die so an Harz synthetisierte Glycinkette mit endständigem N-terminalen freiem Pyridinring wurde, weiterhin an das Harz gebunden, in DMF suspendiert und mit einem Überschuß an Chlormethylketon versetzt. Dieses Gemisch wurde einige Tage bei Raumtemperatur gerührt. Zugabe einer katalytischen Menge von Natriumiodid steigerte die Ausbeute. Hier wird *in situ* das Iodmethylketon gebildet. Iodmethylketone werden leichter nucleophil angegriffen, da das Iodid eine bessere Abgangsgruppe als Chlorid darstellt. Das Produkt wurde am Harz gründlich mit DMF, DCM und Ether gewaschen. Die Harzabspaltung erfolgte mit einer 10 %igen TFA-Lösung in DCM. Die Abspaltungszeit betrug 10 - 20 Minuten. Höhere TFA-Konzentrationen spalten teilweise das Produkt zwischen Prolin und dem Pyridinring.

Der Aufbau der Sequenz N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₂-OH vom N-Terminus aus scheiterte. Weder Isonicotinsäure noch N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure reagierten mittels Mischanhydridmethode mit H-Gly-Gly-OMe.

2.1.5. Abspaltung der Z-Schutzgruppe an Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen

Im Unterschied zu PEP-Substraten und Inhibitoren ist für DP IV-Substrate und Inhibitoren ein freier N-Terminus Voraussetzung für die Erkennung der Strukturen durch das Enzym und, bei Substraten, zusätzlich für die anschließende enzymatische Hydrolyse [1]. Um die Substanzklasse der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone für eine Verwendung als DP IV-Inhibitor zugänglich zu machen, wurde die Z-Schutzgruppe mit einer HBr/Eisessig-Lösung abgespalten. Die Reaktionszeit betrug maximal 5 Minuten. Bei längerer Reaktionszeit war ebenfalls eine Spaltung der Verbindung zu beobachten. Da die N-terminal ungeschützten Verbindungen der Form H-Xaa-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄R)/Cl⁻ im wässrigen Medium instabil sind und intra- bzw. intermolekular reagieren, mußte unbedingt wasserfrei gearbeitet werden.

Durch die Variation der P₂-Aminosäure in N-terminal ungeschützten Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketonen wurde versucht, eine intramolekulare Cyclisierung in wässriger Lösung zu verzögern und somit die Stabilität der Verbindungen zu steigern.

2.1.6. Synthese eines N-terminal ungeschützten Tetrapeptidyl-Pyridinium-Methylketons

Um die intramolekulare Cyclisierungsreaktion, die bei Substanz-Verdünnungen um 10^{-3} M und kleiner die am häufigsten auftretende Nebenreaktion war, zu verhindern, wurde der eigentlich aktive Inhibitor durch die N-terminale Kondensation eines weiteren Dipeptids, das als DP IV-Erkennungssequenz dienen kann, modifiziert bzw. maskiert. Es wurde eine Struktur mit der Sequenz H-Gly-Pro-Xaa-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅)/Cl⁻ entwickelt (Abbildung 11). An diesem Molekül setzt DP IV durch Abspaltung von H-Gly-Pro-OH den eigentlich wirksamen Inhibitor H-Xaa-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅)/Cl⁻ selbst frei.

Als Ausgangsverbindung für die bereits beschriebene Chlormethylketonsynthese wurde Z-Gly-Pro-Xaa-Pro-OH am Wang-Harz durch Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie aufgebaut. Nach der Harzabspaltung wurde das daraus dargestellte Chlormethylketon, wie beschrieben, zum Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivat der Form Z-Gly-Pro-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄R)/Cl⁻ umgesetzt. Abschließend wurde die Z-Schutzgruppe mit einer HBr/Eisessig-Lösung abgespalten.

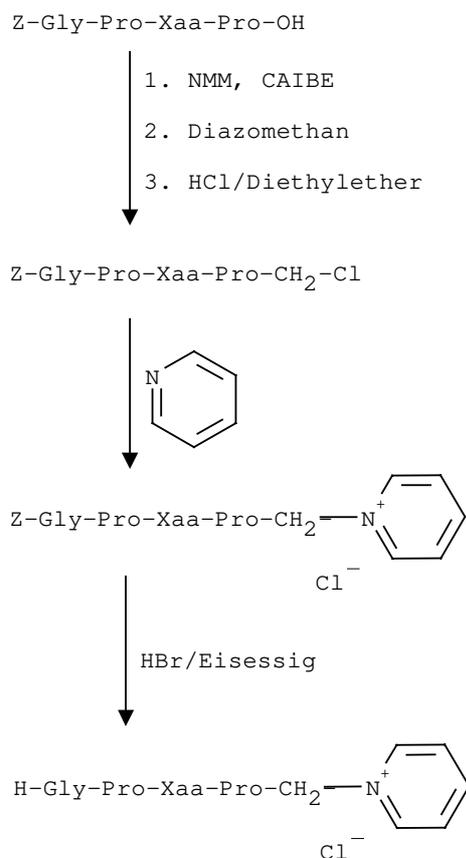


Abb. 11: Syntheschema für stabile DP IV-Inhibitoren auf der Basis von Tetrapeptidyl-Pyridinium-Methylketonen

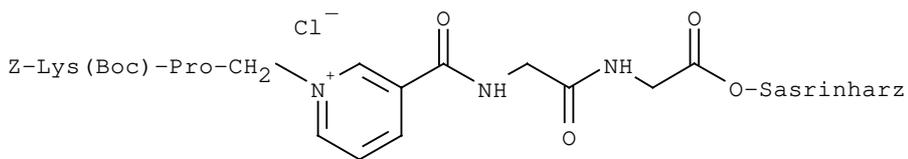
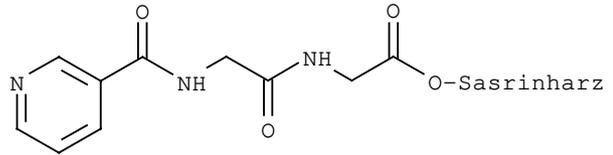
2.1.7. Darstellung eines cyclischen Peptidyl-Pyridinium-Methylketons

Z-Lys(Boc)-Pro-OH

1. NMM, CAIBE
2. Diazomethan
3. HCl/Diethylether

Z-Lys(Boc)-Pro-CH₂-Cl

Festphasensynthese:



1. TFA/DCM
2. Dicyclohexylcarbodiimid

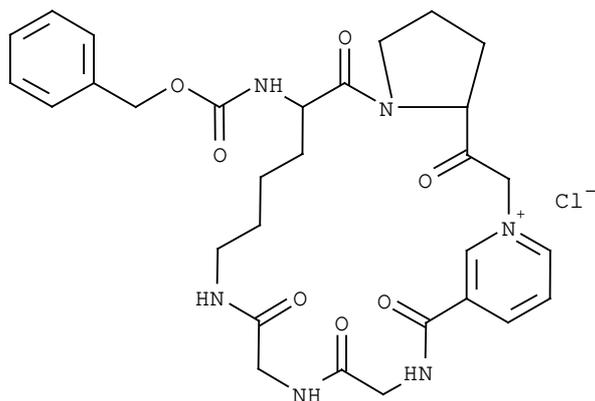


Abb. 12: Syntheschema des cyclischen Peptidyl-Pyridinium-Methylketons
 γ -cyclo(N-(Z-Lys-Pro-CH₂-)Nicotinsäure-Gly₂)/Cl⁻

Um Aussagen über die räumliche Ausdehnung des aktiven Zentrums des Zielenzym (PEP) zu treffen, wurde eine cyclische Verbindung (Abbildung 12), in Analogie zu der von Wakselman [235] vorgestellten Verbindung $c[-(\alpha\text{HN}^+)\text{-Lys-Pro-Aba}(6\text{-CH}_2\text{-S}^+\text{R}_2)\text{-Gly}_n\text{-}]/2\text{TFA}^-$, synthetisiert. Hierbei sollte geprüft werden, ob intramolekulare Verknüpfungen und Verbrückungen die räumlichen Anforderungen der Bindung an das Zielenzym stören. Es wurde $\gamma\text{cyclo}(\text{N}-(\text{Z-Lys-Pro-CH}_2\text{-})\text{Nicotinsäure-Gly}_2)/\text{Cl}^-$ als Modellverbindung ausgewählt. Die Verbindung wurde aus $\text{Z-Lys}(\text{Boc})\text{-Pro-CH}_2\text{Cl}$ und Nicotinsäure-Gly-Gly-Harz aufgebaut (Weg 2, Abbildung 9). Bei der sauren Abspaltung vom Sasrinharz (20 % TFA in DCM) wurde die Boc-Schutzgruppe ebenfalls mit abgespalten. Die Cyclisierung von $\text{N}-(\text{Z-Lys-Pro-CH}_2\text{-})\text{Nicotinsäure-Gly}_2\text{-OH}/\text{Cl}^-$ zwischen C-Terminus und der Lys-Seitenkette wurde mit DCC durchgeführt [254]. Das Cyclisierungsprodukt wurde hinsichtlich seiner Wirksamkeit als PEP-Inhibitor untersucht.

2.1.8. Darstellung von Isoleucylthiazolidid (Abbildung 13)

Boc-Ile-OH wurde nach der Mischanhydridmethode mit NMM und CAIBE aktiviert und mit Thiazolidin [56] umgesetzt. Boc-Ile-Thia wurde zur Abspaltung der Schutzgruppe 4 Stunden einer TFA-Lösung ausgesetzt. Die Gesamtausbeute über 2 Stufen betrug 79 % der Theorie.

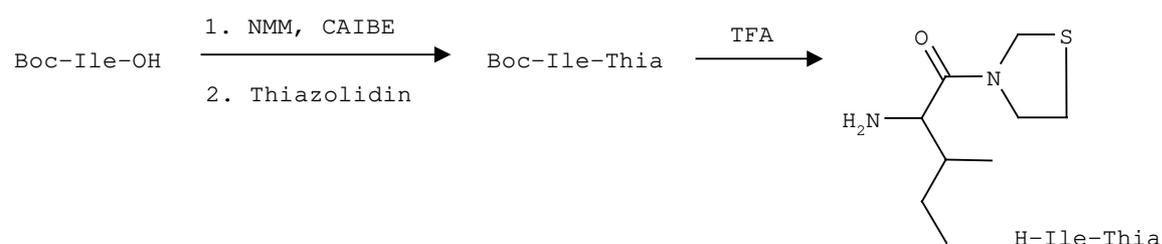


Abb. 13: Reaktionsschema der Synthese von Isoleucylthiazolidid

2.2. Untersuchungen zur Inhibierung der Prolylendopeptidase

2.2.1. Stabilitätsuntersuchungen an N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die von uns auf der Basis der Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivate dargestellten PEP-Inhibitoren sollen als potentielle Diagnostika zunächst in Tierversuchen analysiert werden. Um Aussagen zur Stabilität der Verbindungen und zur Relevanz der zu erwartenden Effekte in Lösung machen zu können, wurde die hydrolytische Stabilität in gepufferter Lösung untersucht.

Die auf PEP aus *Flavobacterium meningosepticum* als slow-binding Inhibitor wirkende Verbindung N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester zersetzt sich nichtenzymatisch in wässriger Pufferlösung (pH = 7,6). Es entstehen ebenfalls inhibierend auf die PEP-katalysierte Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-pNA wirkende Verbindungen.

Da sich chromatographische bzw. UV-spektrometrische Methoden zur Quantifizierung der Reaktion nicht eignen, wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie ein kinetisches Analysenverfahren entwickelt.

Im Jahre 1988 stellten Karas und Hillenkamp eine für die Massenspektrometrie neue Ionisierungsmethode vor [256 - 262]: die Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) zur Analyse von organischen Molekülen bis zu einer Molekülmasse von 10⁵ Da. In Kombination mit einem Time-of-Flight-(TOF)-Massenspektrometer ist die Ionisierungsmethode ausgezeichnet zur Charakterisierung von Peptiden, Proteinen, Oligosacchariden und Oligonucleotiden geeignet und zeigt eine relativ hohe Toleranz gegenüber Pufferlösungen und Verunreinigungen [261].

Der nichtenzymatische Zerfall von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure wird mittels MALDI-TOF-MS qualitativ [256] und quantitativ [265-284] verfolgt. Inkubiert man die Verbindung in HEPES-Pufferlösung (pH = 7,6) und verfolgt die Reaktion, so zeigt Abbildung 14 die in zeitlicher Abfolge aufgenommenen MALDI-TOF-Massenspektren der nichtenzymatischen Hydrolyse von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester (A) zu N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure (B) und die anschließende Decarboxylierung zur Pyridinium-Methylketon-Verbindung (C). Bei der Charakterisierung von Substanzen mittels MALDI-TOF-MS-Technik werden normalerweise keine Fragmentierungen der Verbindungen beobachtet. Die drei Signale im MS-Spektrum sind daher eindeutig einzelnen Verbindungen zuzuordnen.

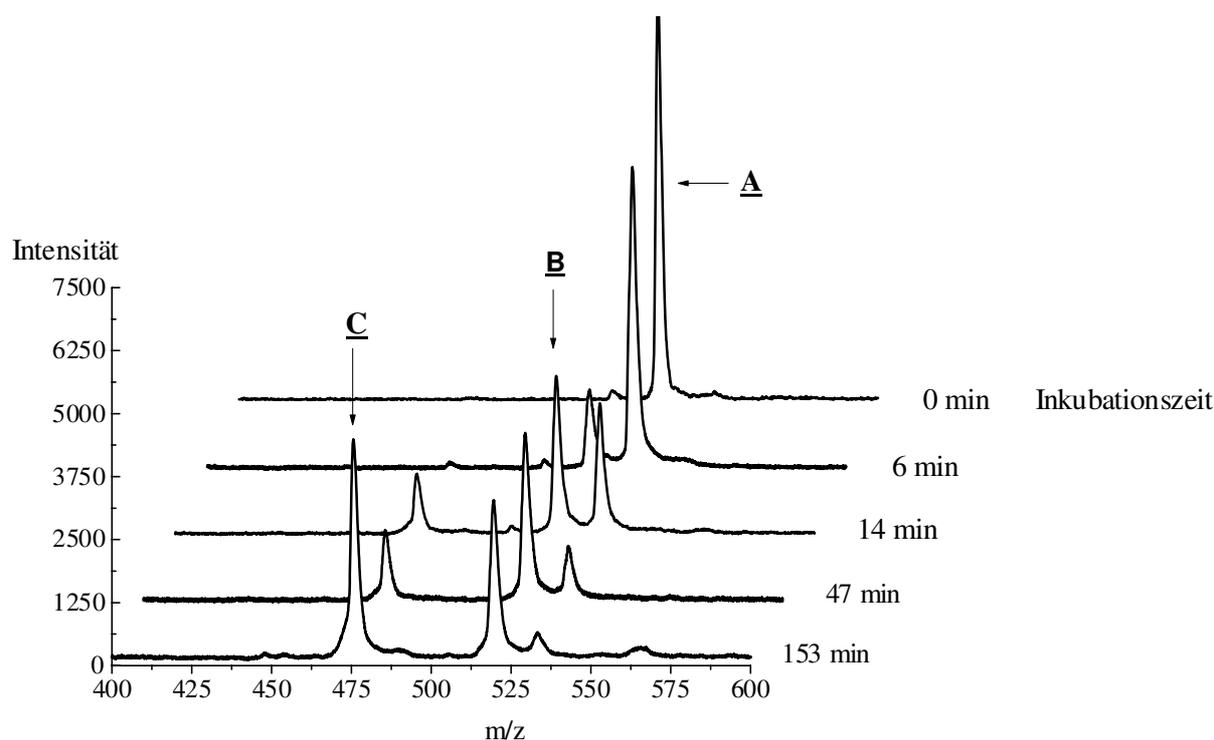


Abb. 14: MALDI-TOF-Massenspektren des nichtenzymatischen Zerfalls von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester (A) in HEPES-Pufferlösung (pH = 7,6) bei 30 °C über N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure (B) in Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (C)

Um die als Zwischenprodukt entstehende Säure und das Endprodukt charakterisieren zu können, wurden beide Substanzen isoliert und mittels Kernresonanzspektroskopie analysiert. Die Referenzsubstanzen Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon und N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure wurden entsprechend dem bereits beschriebenen Darstellungsweg synthetisiert (Kapitel 2.1.3.). Die chemischen Verschiebungen der Signale im NMR-Spektrum des isolierten Zwischen- und Endproduktes stimmten mit den Analysendaten der synthetisierten Verbindungen überein. Der mittels MALDI-TOF-MS qualitativ detektierte nichtenzymatische Zerfall des N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylesters wurde so, durch Isolierung der Zerfallsprodukte und Charakterisierung mittels NMR und dem Vergleich mit den synthetisierten Referenzverbindungen, eindeutig belegt. Abbildung 15 zeigt den Ablauf der Folgereaktion des nichtenzymatischen Zerfalls.

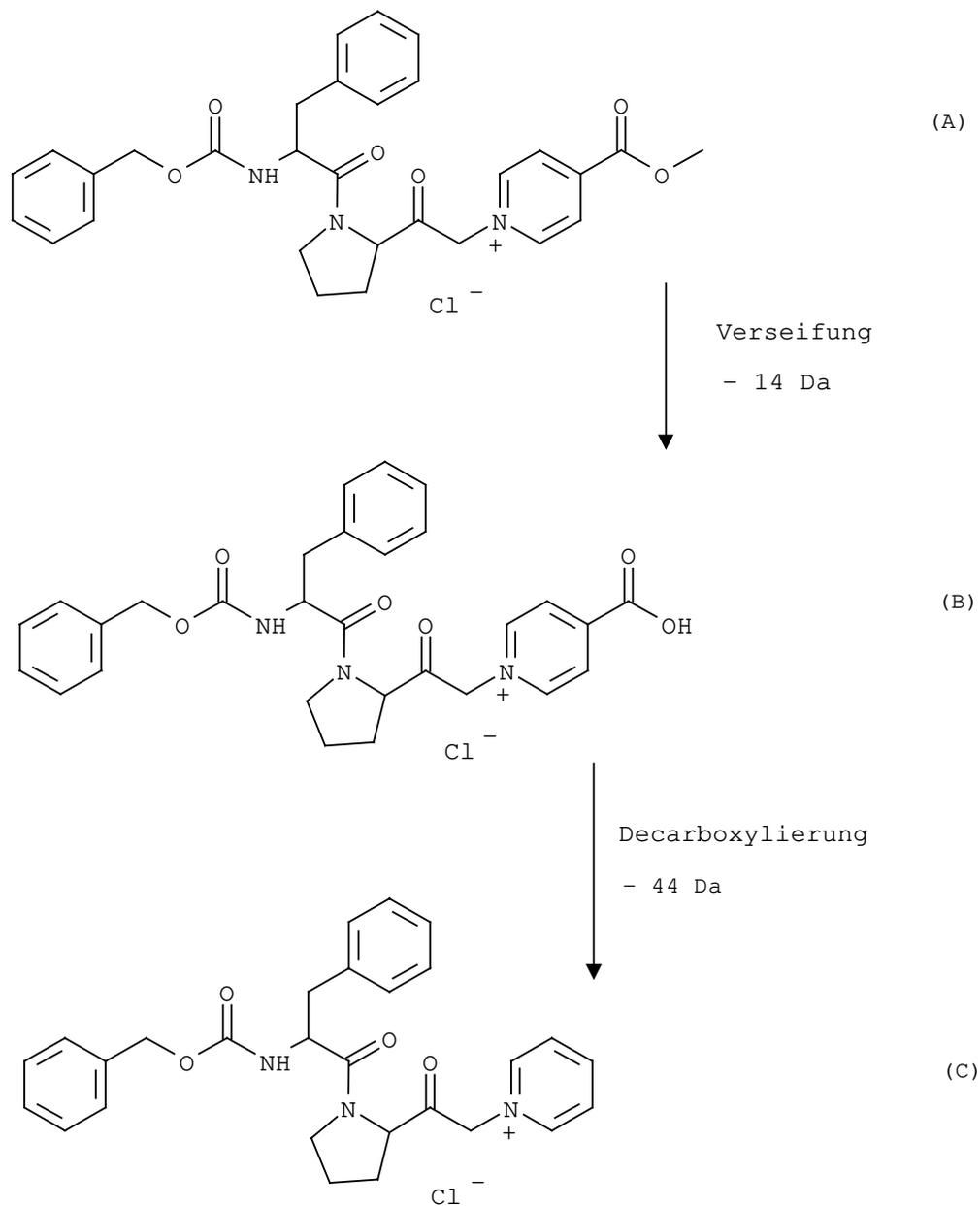


Abb. 15: Schema des nichtenzymatischen Zerfalls von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester (A) in HEPES-Pufferlösung (pH = 7,6) bei 30 °C über N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure (B) in Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (C)

Zur weiteren Aufklärung der physiologischen und kinetischen Auswirkung dieser Zerfallsreaktion wird die inhibierende Wirkung von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester (A), N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure (B) und Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (C) auf die PEP-katalysierte Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA untersucht. Durch Variation der Inhibitorkonzentration bei verschiedenen

Substratkonzentrationen wurde die Kinetik nach einem slow-binding Mechanismus (Kapitel 4.1.) berechnet [285 - 288]. Verfolgt man den Verlauf der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA bei 390 nm in Gegenwart von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester), so zeigt sich der in Abbildung 16 dargestellte Verlauf. Bei niedrigen Substrat- und Inhibitorkonzentrationen ist nach 100 min eine Zunahme der Enzymaktivität bzw. ein Nachlassen der Inhibierung zu erkennen (Bereich IV, Abbildung 16).

Absorbtion

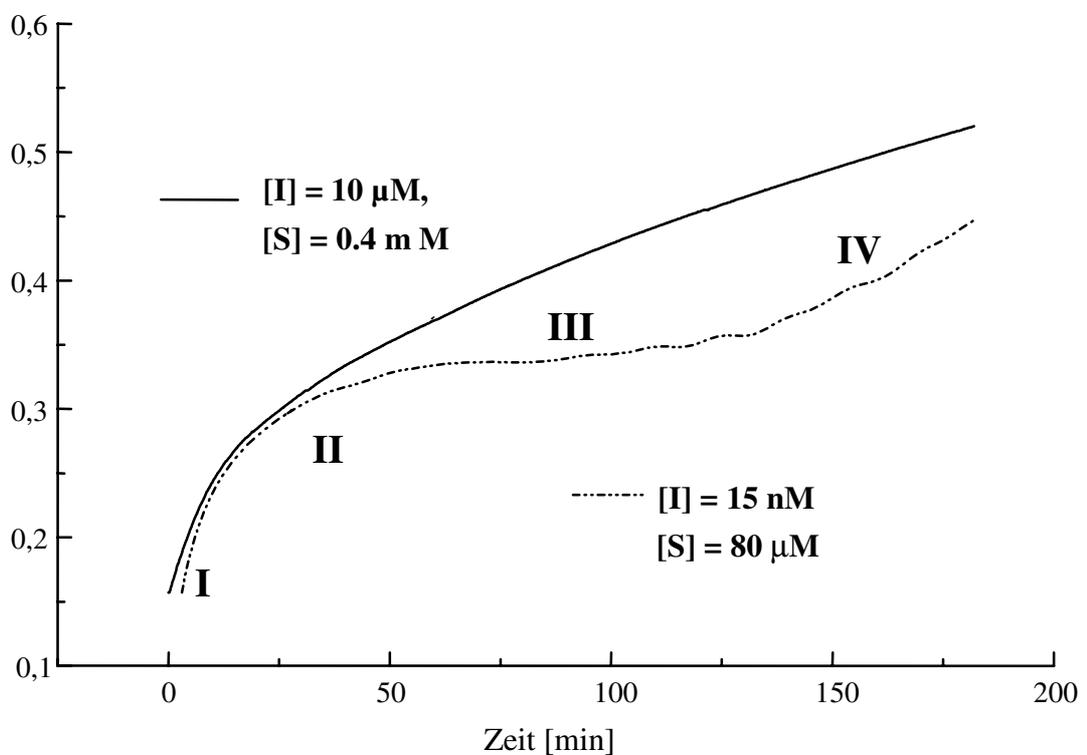


Abb. 16: Progresskurve der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA in Gegenwart von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester verschiedener Konzentration. I: Bildung des EI-Komplexes, II: Umlagerung des EI-Komplexes in den EI*-Komplex, III: steady-state-Gleichgewicht, IV: Zerfall des Inhibitors, Zunahme der Enzymaktivität

Die Tabelle 2 faßt die Ergebnisse der kinetischen Auswertung zusammen. Alle drei untersuchten Verbindungen zeigen eine inhibierende Wirkung auf die PEP-katalysierte Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA. Der nichtenzymatische Abbau der Inhibitoren muß bei der Betrachtung der Konstanten berücksichtigt werden.

Tab. 2: Kinetische Konstanten der PEP aus *Flavobacterium meningosepticum* katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA in Gegenwart von Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivaten

Nr	Inhibitor	K_i (M)	K_i^* (M)	k_{on} (s^{-1})
A	N-(Z-Phe-Pro-CH ₂ -)Isonicotinsäuremethylester	4,8E-8	1,8E-8	3,0E-3
B	N-(Z-Phe-Pro-CH ₂ -)Isonicotinsäure	2,0E-7	6,7E-8	1,7E-3
C	Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon	8,4E-7	1,1E-7	1,4E-3

Die Verseifung des Esters (A) bei einem pH-Wert von 7,6 mit anschließender Decarboxylierung der Verbindung (B) zum ebenfalls noch inhibierenden Pyridinium-Methylketon-Derivat (C) läuft im Enzymassay aus Substrat, Inhibitor, Enzym und Puffer parallel zur am UV-Spektrometer verfolgten Substrathydrolyse ab. Die beiden entstehenden Verbindungen (B und C) inhibieren das Enzym in seiner Funktion, das *p*NA-Substrat zu hydrolysieren, in einem geringeren Ausmaß als die Ausgangsverbindung (A). Daher steigt die Enzymaktivität im beobachteten Zeitraum trotz inhibierender Wirkung der Zerfallsprodukte (B und C) auf die PEP-katalysierte Hydrolyse bei Verwendung niedriger Inhibitorkonzentrationen an. Der Substratumsatz nimmt mit fortschreitender Zeit zu.

Zur Quantifizierung des Zerfalls von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester wurde eine Methode entwickelt, die sich der MALDI-TOF-MS-Technik bedient (Kapitel 4.3.) [256 - 284]. Von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester (A), N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure (B) und Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (C) wurde jeweils eine Reihe verschiedener Konzentrationen hergestellt. Jede Lösung wurde mit einer äquivalenten Menge Matrix gemischt und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die detektierte Peakhöhe, der Konzentration des Analyten gegenübergestellt, weist in einem definierten Bereich ein lineares Verhalten auf (Kapitel 4.3.). In der nun folgenden Auswertung der MS-Spektren des Zerfalls von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester (A) in seine Folgeprodukte werden diese Eichkurven zur Bestimmung des linearen Konzentrationsbereiches herangezogen. Um eine Aussage über die Halbwertszeit des nichtenzymatischen Zerfalls des Esters zu bekommen, wurde die Reaktion über mehrere Stunden verfolgt.

Das Interesse galt der pseudo-erster-Ordnungs-Zerfallskonstante. In Abbildung 17 sind die relativen Peakhöhen der MS-Signale von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester (A), N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure (B) und Pyridinium-Methylketon-Verbindung (C) über die Zeit dargestellt.

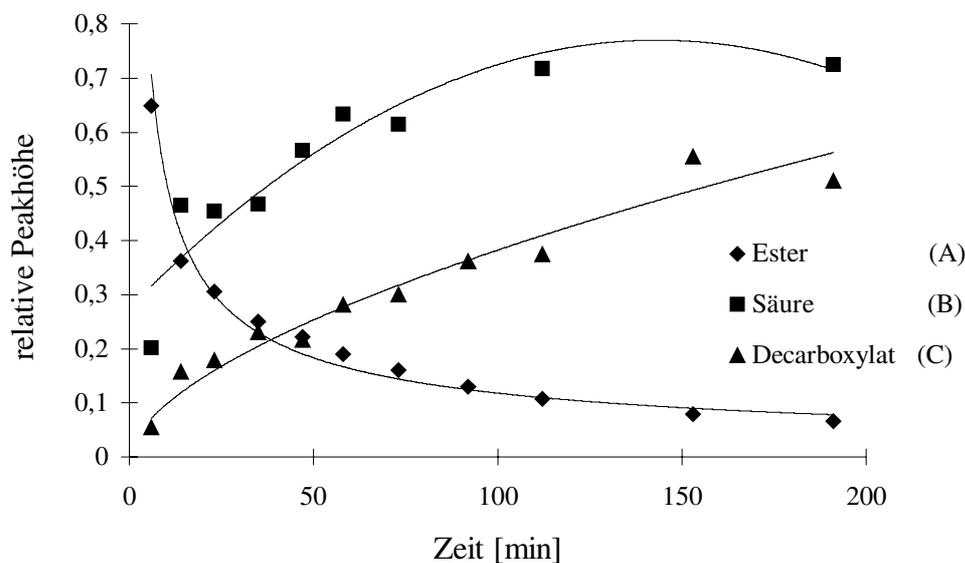


Abb. 17: Auftragung der massenspektrometrisch bestimmten rel. Peakhöhen von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester (A), N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure (B) und Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (C) im Inkubationsansatz des Esters in HEPES-Pufferlösung (pH = 7,6) über 200 min verfolgt

Unter den gleichen Meßbedingungen wie zur Bestimmung des Linearitätsbereiches (Peakhöhe/Konzentration des Analyten) sind die Intensitätsänderungen der MS-Signale der drei Verbindungen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Pufferlösung (pH = 7,6) aufgetragen. Der Verlauf der Peakhöhen- bzw. Konzentrationskurve über die Zeit entspricht einer Folgereaktion von A über B nach C.

Es entsteht die stabile Verbindung Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (C). Die absolute Peakhöhe wurde hier durch die Summe der Peakhöhen von Ester (A), Säure (B) und Decarboxylat (C) dividiert. Es ergibt sich die relative Peakhöhe. Aus den Meßpunkten der Kurve A (Abnahme der Peakintensität der Ausgangsverbindung) in Abbildung 17 errechnete sich für die Hydrolyse von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester (A) ein k_{obs} von $0,0185 (\pm 0,0009) \text{ min}^{-1}$ nach einer Reaktion pseudo-erster-Ordnung.

Es wurde eine Halbwertszeit von 38 min für die nichtenzymatische Esterhydrolyse mittels der beschriebenen MS-Methode bestimmt.

Der Grund, weshalb die relative Peakhöhe des Decarboxylates (C) nach 150 min wieder absinkt, ist nicht auf einen weiteren Abbau der Pyridinium-Methylketon-Verbindung (C), sondern auf das Überschreiten des linearen Konzentrationsbereiches zurückzuführen. Hier ist, aufgrund der hohen Analytkonzentration, die Linearität zwischen Signalintensität und Konzentration nicht mehr gewährleistet. Dies wird an der Abhängigkeit zwischen Konzentration und Peakhöhe dieser Verbindung in den Abbildungen 61 bis 63 (Seite 115 u. 116, Kapitel 4.3.) verdeutlicht. Die Linearität ist bei Konzentrationen größer $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l nicht mehr gewährleistet.

Um die entwickelte MS-Quantifizierungsmethode zu bestätigen, wurde der Enzymassay für die Bestimmung der Inhibierungskinetik herangezogen. Die Halbwertszeit von 38 min für die nichtenzymatische Esterhydrolyse, mittels MS bestimmt, wurde durch die enzymkinetischen Messungen mittels UV-Spektrometer bestätigt. Die Analyse der Meßpunkte der nichtenzymatischen Bildung von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure (B) und Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (C), aus dem Zerfall von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester (A) deutlich zu sehen in der Abweichung der Meßpunkte im Kurvenbereich IV (Abbildung 16, Seite 35), ergab eine pseudo-erste-Ordnungs-Konstante von $k_{\text{obs}} = 0,018 (\pm 0,0019) \text{ min}^{-1}$, unabhängig von der InhibitorKonzentration zwischen 1,0 μM und 10 nM und unabhängig von der Substratkonzentration zwischen 0,4 mM und 80 μM . Dieser Wert entspricht einer Halbwertszeit von 38,8 min für den nichtenzymatischen Zerfall, was sehr gut mit der mittels MS bestimmten Halbwertszeit für den nichtenzymatischen Zerfall des Esters (A) übereinstimmt.

Physiologisch hat der nichtenzymatische Zerfall des Inhibitors (A) kaum Bedeutung. Die Zerfallsprodukte gehören ebenfalls der Substanzklasse der Pyridinium-Methylketon-Derivate an und wirken somit alle auf die PEP-katalysierte Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-pNA inhibierend. Die kinetischen Konstanten der Verbindungen (A, B, C) weisen Unterschiede von maximal 1,5 Größenordnungen voneinander auf.

Basierend auf diesen Ergebnissen und der damit entwickelten Methodik kann die MALDI-TOF-Massenspektrometrie für kinetische Untersuchungen eingesetzt werden [310]. Da MALDI-TOF-MS relativ tolerant gegenüber Puffer, Salzen und sonstigen Verunreinigungen ist, weist sich diese Methode besonders für die Analyse in biologischen Medien wie Serum aus und ist geeignet, alle Metaboliten nebeneinander auf der Basis m/z anzuzeigen und in einzelnen Fällen gleichzeitig zu quantifizieren.

2.2.2. Kinetik der Prolylendopeptidase-Inhibierung durch Peptidyl-Pyridinium-Methylketone

Zahlreiche Verbindungsklassen wurden als Inhibitoren für Prolylendopeptidase entwickelt (Kapitel 1.2.2.). Eine dieser Substanzklassen, die Ammonium- bzw. Pyridinium-Methylketone, haben besonders gute inhibitorische Eigenschaften auf die PEP-katalysierte Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA [212, 232]. In Gegenwart von Z-Pro-Pro-CH₂-N⁺(CH₃)₃/Cl⁻ wurde ein K_i -Wert von 710 nM für die PEP aus *Flavobacterium meningosepticum* katalysierte Hydrolyse eines Substrates angegeben [232]. Als aromatisches Analogon zu den Ammoniummethylketonen wurde für Z-Pro-Pro-Pyridinium-Methylketon eine erhöhte Affinität ($K_i = 9,3$ nM) für die PEP bestimmt [232]. Die Bindung der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone an das Enzym blockiert dabei das aktive Zentrum reversibel.

Untersuchungen von Nagamatsu an Acyl-Coenzym-A-Ester [86] und Ergebnisse aus der Inhibierung von Trombin [290] sowie Studien von Mannaerts bezüglich der Interaktion von PEP und Acyl-CoA-Oxidase [87] lassen vermuten, daß PEP neben dem aktiven Zentrum noch mindestens eine weitere Liganden-Bindungsstelle aufweist.

Um die Möglichkeit zu erschließen, Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und dem S'-Bereich des Enzyms zur Affinitätssteigerung zu nutzen und möglicherweise Kontakt zu weiteren Ligandenseiten zu erhalten, wurden verschiedene Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivate, insbesondere mit C-terminaler Modifikation, synthetisiert und die folgenden enzymkinetischen Messungen durchgeführt.

Auswertung der slow-binding Kinetik am Beispiel von Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketonen

Inkubiert man das chromophore Substrat (H-Gly-Pro-Pro-*p*NA) mit substratanalogem Peptidyl-Pyridinium-Methylketon in Puffer und startet die Hydrolyse durch Zugabe des Enzyms (PEP), so zeigen die spektralphotometrisch erhaltenen Zeit-Umsatz-Kurven einen charakteristischen Verlauf (Abbildungen 18 u. 19). Nach einer zeitabhängigen Inhibierung zu Beginn der Reaktion wird im weiteren Verlauf unter steady-state-Bedingungen eine konstante Restaktivität erreicht. Unter der Voraussetzung, daß der Inhibitor während der gesamten Meßzeit in Lösung stabil ist, und daß die Verbindung während der Wechselwirkung mit dem Enzym nicht durch Abspaltung von Gruppierungen chemisch verändert wird, ist ein slow-binding Mechanismus die einzig mögliche Erklärung für dieses kinetische Verhalten.

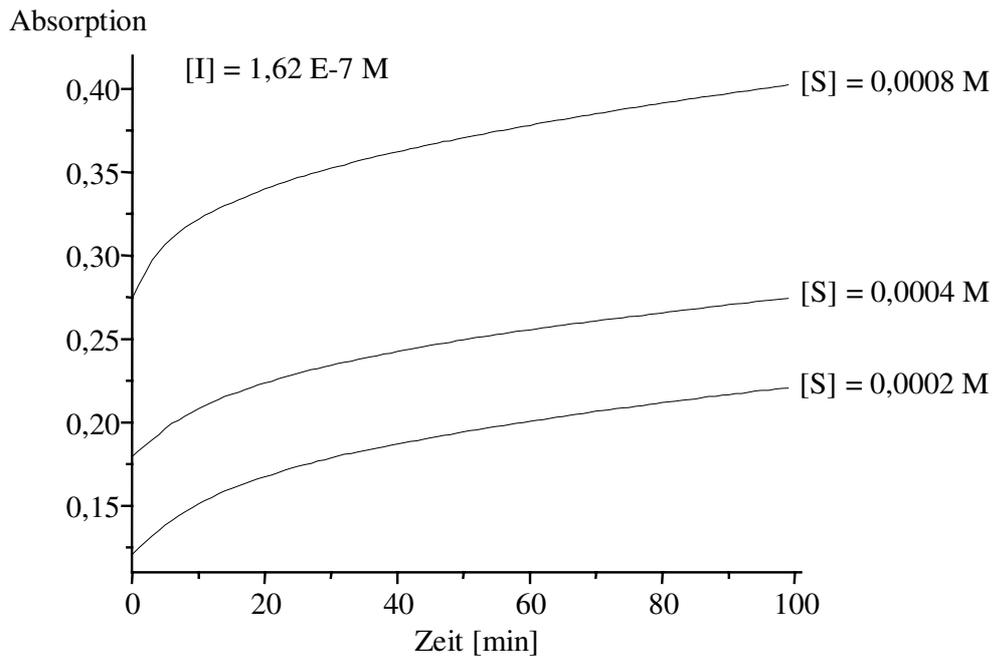


Abb. 18: Progresskurven der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA ($8 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$ u. $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l) in Gegenwart von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₂-OH ($1,62 \cdot 10^{-7}$ mol/l) in HEPES-Puffer (pH = 7,6)

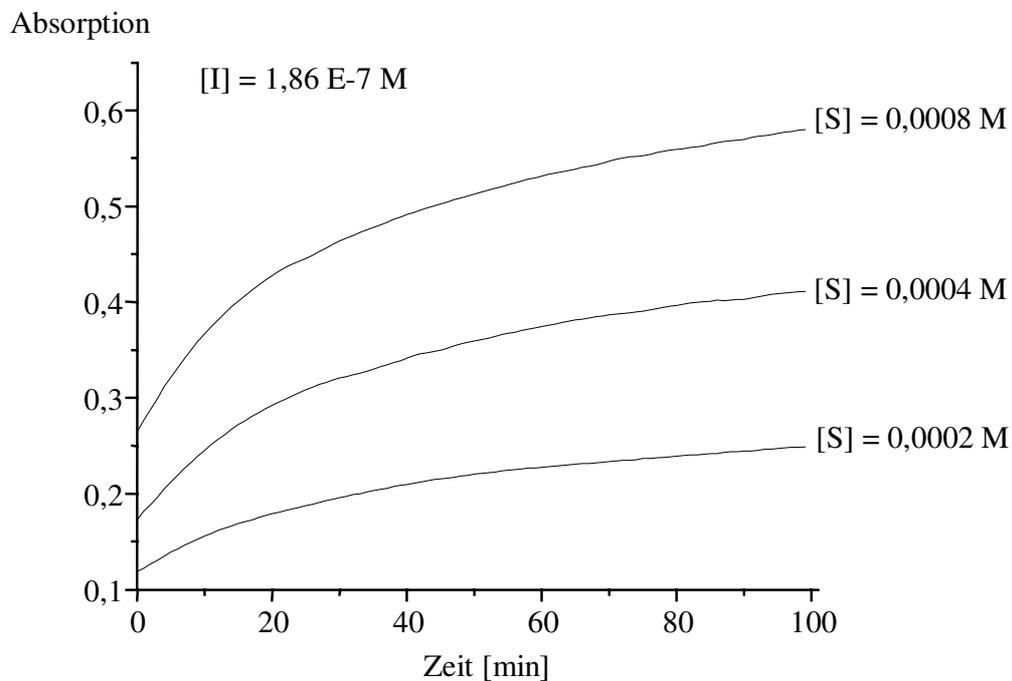


Abb.19: Progresskurven der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA ($8 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$ u. $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l) in Gegenwart von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylessigsäure-Gly₂-OH ($1,86 \cdot 10^{-7}$ mol/l) in HEPES-Puffer (pH = 7,6)

Das Gleichgewicht zwischen Enzym, Inhibitor und Enzym-Inhibitor-Komplex stellt sich langsam ein [285, 286].

Startet man im Rahmen der Untersuchungen die enzymkatalysierte Substrathydrolyse durch Zugabe des Enzyms, dann ist der Reaktionsverlauf durch eine hohe Anfangsgeschwindigkeit gegenüber der Gleichgewichtsgeschwindigkeit gekennzeichnet. Unter steady-state-Bedingungen wird ein konstanter Substratumsatz erreicht. Die Abbildungen 18 und 19 zeigen die Progresskurven der Reaktion von PEP mit einem chromogenen Substrat unterschiedlicher Konzentration in Gegenwart eines slow-binding Inhibitors.

Das reversible Verhalten der Inhibitoren wurde durch Verdünnung (mit Pufferlösung/Wasser 1 : 1,55 Vol.-Teile) eines Standard-Meßansatzes aus Pufferlösung, Inhibitor, Substrat und Enzym auf das doppelte Volumen und erneuter Bestimmung der Initialgeschwindigkeit belegt (Kapitel 4.2.). Wie es für reversibel an das Enzym bindende Inhibitoren zu erwarten ist, betrug die Initialgeschwindigkeit mehr als 50 % der Geschwindigkeit in einem unverdünnten Ansatz.

Durch Auswertung der Progresskurven (Abbildung 18 und 19) nach Gleichung 3 (Kapitel 4.1.) erhält man für jede Progresskurve die Initialgeschwindigkeit v_0 , die Gleichgewichtsgeschwindigkeit v_s sowie die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} für die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen EI-Komplex und EI^* -Komplex bei einer bestimmten Substrat- und Inhibitorkonzentration.

Anhand der Gleichungen 10 und 11 erhält man durch Einsetzen von I , S , v_0 bzw. v_s eine nichtlineare Abhängigkeit der initialen bzw. der steady-state-Geschwindigkeit von der Inhibitorkonzentration. Durch Auftragung von v_0 bzw. v_s gegen I kann die Dissoziationskonstante für den EI-Komplex K_i und die steady-state Gleichgewichtskonstante K_i^* für den EI^* -Komplex bestimmt werden. Mittels eines Regressionsprogramms lassen sich die kinetischen Konstanten berechnen.

Da dem Gleichgewicht zwischen Enzym und Inhibitor durch die parallel ablaufende Substrathydrolyse Enzym entzogen wird, entspricht die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} nicht der tatsächlichen für das Gleichgewicht zwischen Enzym und Inhibitor vorliegenden Geschwindigkeitskonstanten k_{app} . Um diesen durch die Meßmethode bedingten Fehler zu korrigieren, wird der tatsächliche Wert ermittelt. Trägt man k_{obs} gegen die Substratkonzentration bei konstanter Inhibitorkonzentration auf, so ergibt sich aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden k_{app} (Abbildung 20 und 21). Die Substratkonzentration geht an diesem Punkt gegen Null.

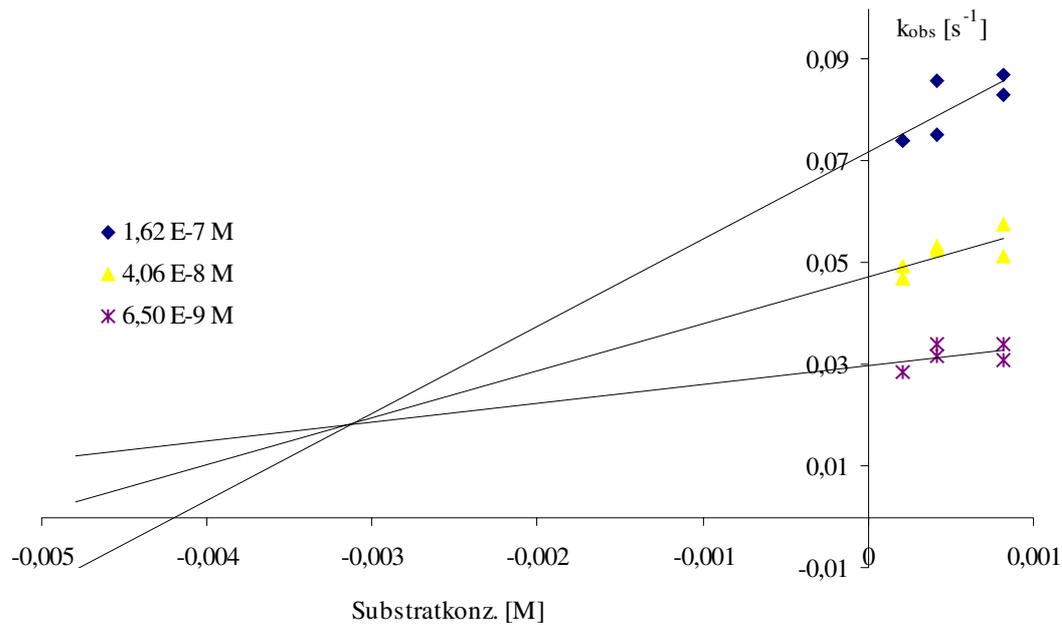


Abb. 20: Dixon-Plot der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*N ($8 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$ u. $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l) in Gegenwart von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₂-OH ($1,62 \cdot 10^{-7}$ mol/l) in HEPES-Puffer (pH = 7,6)

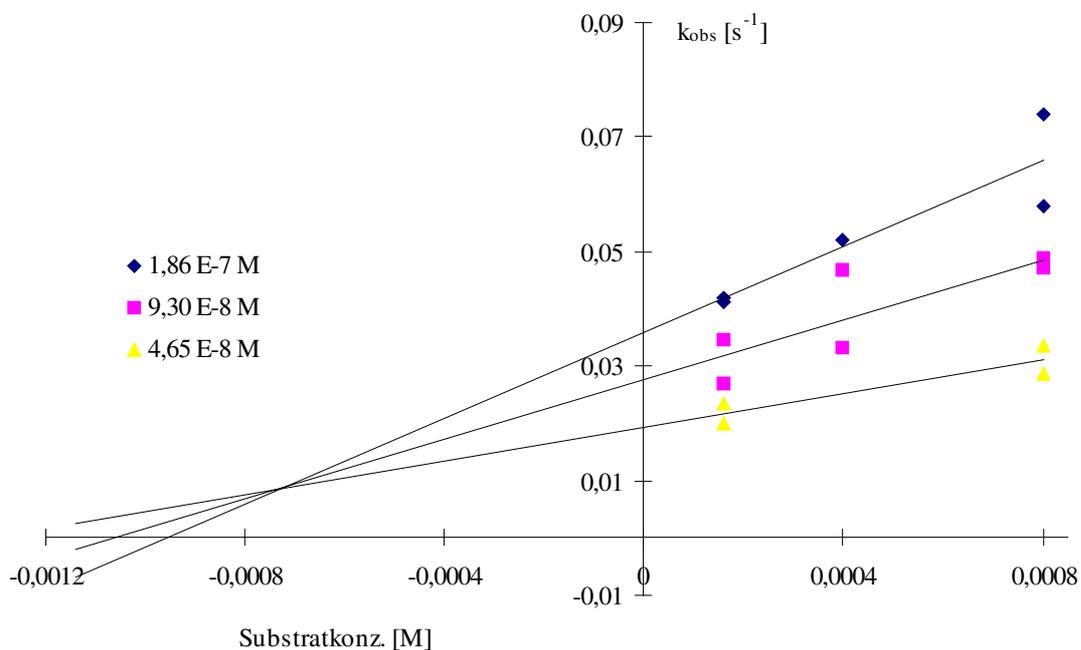


Abb. 21: Dixon-Plot der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA ($8 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$ u. $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l) in Gegenwart von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylessigsäure-Gly₂-OH ($1,86 \cdot 10^{-7}$ mol/l) in HEPES-Puffer (pH = 7,6)

Die so für jede Inhibitorkonzentration ermittelte tatsächliche Geschwindigkeitskonstante k_{app} wird in der weiteren Auswertung zur Bestimmung von k_{on} verwendet. k_{on} ist die pseudoerster-Ordnungsgeschwindigkeitskonstante für die Umwandlung des Enzym-Inhibitor-Komplexes von EI nach EI*.

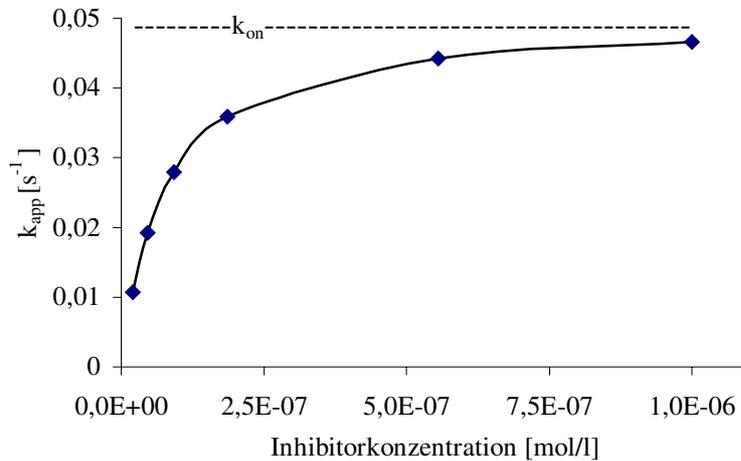


Abb. 22: Auftragung von k_{app} gegen die Inhibitorkonzentration von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylelessigsäure-Gly₂-OH der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA

Trägt man die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k_{app} gegen die Inhibitorkonzentration auf, so ergibt sich entsprechend einer slow-binding Inhibierung (Kapitel 4.1.) eine für Mechanismus B typische hyperbole Abhängigkeit (Abbildung 22).

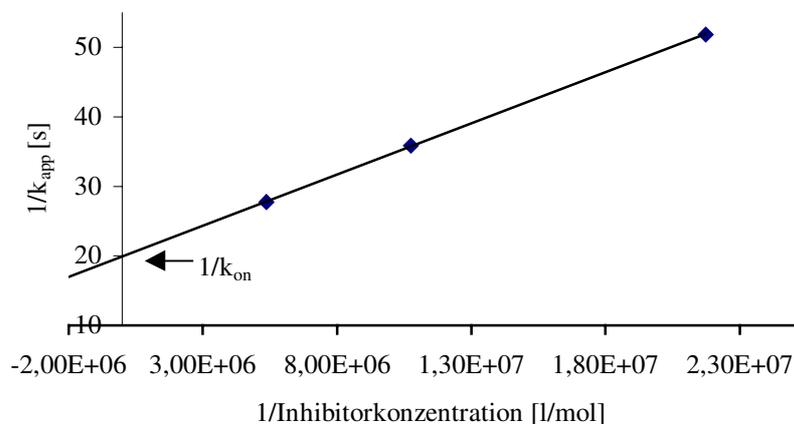


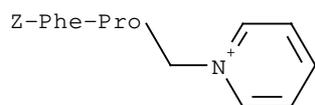
Abb. 23: Auftragung von $1/k_{app}$ gegen $1/I$ von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylelessigsäure-Gly₂-OH als Inhibitor der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA zur Ermittlung der maximalen Inaktivierungsgeschwindigkeit k_{on}

Die Kurve nähert sich dabei einer Asymptote, die parallel zur x-Achse verläuft und in k_{on} die y-Achse schneidet. In linearisierter Form ist die Auswertung ebenfalls möglich (Abbildung 23). Trägt man $1/k_{app}$ gegen $1/I$ auf, so entspricht $1/k_{on}$ dem y-Achsenabschnitt.

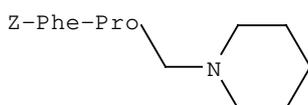
Alle untersuchten stabilen Pyridinium-Methylketone (Abbildungen 24, 25, 28 - 30) hemmen die PEP nach Mechanismus B (Kapitel 4), wie durch den hyperbolen Verlauf der Kurve in der Auftragung von k_{app} als Funktion der InhibitorKonzentration gezeigt werden kann. Die kinetischen Konstanten der Inhibierung der PEP-katalysierten Hydrolyse durch verschiedene Pyridinium-Methylketone sind in den Tabellen 3 - 8 aufgeführt. Die Auswertung der kinetischen Daten, die bei der spektralphotometrischen Ermittlung als Zeit-Absorptions-Wertepaare angefallen sind, wurde entsprechend der Auftragung in Abbildung 18 - 23 durchgeführt, so daß die Berechnung mittels einer linearen Regression durchgeführt werden kann.

Untersuchungen zum Einfluß der positiven Ladung in Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen auf die Inhibierung der PEP-katalysierten Hydrolyse

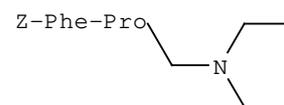
Um Informationen hinsichtlich der Wirkung der positiven Ladung am Stickstoff-Atom in Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen auf die Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung zu erhalten, wurden zwei am Ring ungeladene heterocyclische Inhibitoren gleicher Aminosäuresequenz synthetisiert [292]. Dies sind N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyrrolidin und N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Piperidin (Abbildung 24).



Pyridin-Derivat



Piperidin-Derivat



Pyrrolidin-Derivat

Abb. 24: Strukturformeln von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridin, -Piperidin und -Pyrrolidin

Ursache für die erhöhte Affinität der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone gegenüber PEP kann der durch die Ladung des Stickstoffs induzierte erhöhte δ^+ -Charakter des Kohlenstoffs in der Prolin-Carbonylgruppe sein. Es wird vermutet, daß durch die höhere Elektrophilie des Inhibitors am Prolin-Carbonylkohlenstoffatom der nucleophile Angriff des Serinrestes vom

Enzym an der Prolin-Carbonylgruppe im Inhibitor und damit die Affinität von PEP zum Inhibitor unterstützt wird.

Die kinetische Charakterisierung der drei Verbindungen konnte diese Erwartungen nicht bestätigen (Tabelle 3). Alle drei Verbindungen zeigen im diffusionskontrollierten Andocken (K_i -Wert) eine fast identische Affinität zum Enzym. Die geringen Unterschiede sind wahrscheinlich auf die sterischen Ansprüche der verschiedenen Konformationen der Heterocyclen zurückzuführen. Im steady-state-Gleichgewichtszustand weisen die Vergleichssubstanzen ohne eine Ladung am Ring, wie N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyrrolidin und N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Piperidin, eine ebenso große Affinität zum Zielenzym auf, wie das geladene Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon. Die Umwandlungsgeschwindigkeit (k_{on} -Wert) von EI-Komplex in den EI^{*}-Komplex ist bei den ungeladenen Verbindungen deutlich schneller als beim Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon. Entgegen den Erwartungen zeigt sich hier (k_{on} -Wert) ein deutlich inverses Verhalten. Das Ergebnis ist ein Hinweis darauf, daß die Ladung im Peptidyl-Pyridinium-Methylketon keine Rolle bei der Interaktion zwischen Enzym und Inhibitor spielt. Hier stellt sich nun die Frage, ob die Substanzklasse der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone überhaupt, wie bei den Peptidylprolin-Aldehyden, -Nitrilen bzw. aus der PEP-katalysierten Substratspaltung bekannt, eine kovalente Bindung zwischen Inhibitor und Enzym in einem tetrahedralen Übergangszustand ausbildet. Dieses Ergebnis gab Anlaß zu weiteren Experimenten. In einer NMR-Untersuchung wurde versucht, einen möglichen intermediären Übergangszustand zwischen dem katalytischen Serinrest der PEP und der Ketogruppe von Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon nachzuweisen (Kapitel 2.2.3., Seite 56).

Tab. 3: Kinetische Parameter der PEP-(*Flavobacterium meningosepticum*) katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-pNA in Gegenwart von Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketon oder analoger Verbindungen

Z-Phe-Pro-CH₂-R R=	K_i (nM)	K_i[*] (nM)	k_{on} (s ⁻¹)	k_{on}/K_i (M ⁻¹ s ⁻¹)
-Pyridin	840 (±130)	110 (±18)	1,4E-3 (±2,6E-4)	1667 (±4,0E2)
-Pyrrolidin	1600 (±480)	110 (±34)	9,2E-2 (±1,1E-2)	57500 (±1,9E4)
-Piperidin	2100 (±35)	230 (±1,3)	3,4E-2 (±3,4E-3)	16190 (±1,6E3)

Untersuchungen zum Einfluß des Substitutionsmusters am Pyridinring in Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivaten auf die Inhibierung der PEP-katalysierten Hydrolyse

Es war zu prüfen, ob eine verbesserte Elektrophilie bzw. die Partialladung am Prolin-Carbonylkohlenstoff des Inhibitors Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon durch elektronenziehende Substituenten am Pyridinium-Ring eine höhere Affinität zwischen Inhibitor und Enzym im diffusionskontrollierten Andocken oder im steady-state Gleichgewicht bewirken. Dazu wurden Nicotinsäure (3-Pyridincarbonsäure), Picolinsäure (2-Pyridincarbonsäure) und Isonicotinsäure (4-Pyridincarbonsäure) bzw. Pyridylelessigsäure als Synthesebausteine für analoge Inhibitoren auf Basis der Pyridinium-Methylketone ausgewählt. Gleichzeitig wurde durch die Auswahl dieser Verbindungen der sterische Einfluß der Position des Carbonsäure-Substituenten am Ring untersucht.

Im Gegensatz zur Carbonylfunktion des Methylesters übt die Carbonylfunktion der Säure als Substituent keinen so starken -I-Effekt auf den Ring aus. Vermutlich ist das die Ursache für die Verbesserung des K_i -Wertes von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethyl ester gegenüber N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure.

Tab. 4: Kinetische Parameter der PEP-(*Flavobacterium meningosepticum*) katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-pNA in Gegenwart von Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon-Derivaten

Z-Phe-Pro-CH₂-R R =	K_i (nM)	K_i[*] (nM)	k_{on} (s ⁻¹)	k_{on}/K_i (M ⁻¹ s ⁻¹)
-pyridin	840 (±130)	110 (±18)	1,4E-3 (±2,6E-4)	1667 (±4,0E2)
-pyridin- <i>o</i> -COOH	8300 (±630)	4500 (±890)	5,3E-2 (±1,7E-3)	6386 (±5,3E2)
-pyridin- <i>m</i> -COOH	150 (±32)	18 (±5,7)	4,3E-2 (±6,3E-4)	286667 (±6,1E4)
-pyridin- <i>p</i> -COOH	200 (±30)	67 (±410)	1,7E-3 (±3,0E-4)	8500 (±2,0E3)
-pyridin- <i>p</i> -COOCH ₃	48 (±0,7)	18 (±2,9)	3,0E-3 (±5,3E-4)	62500 (±1,4E4)
Z-Val-Pro-CH₂-R R =	K_i (nM)	K_i[*] (nM)	k_{on} (s ⁻¹)	k_{on}/K_i (M ⁻¹ s ⁻¹)
-pyridin	320 (±25)	11 (±3)	8,4E-2 (±3,9E-3)	261677 (±2,4E4)
-pyridin- <i>m</i> -COOH	490 (±110)	14 (±10)	k _{on} konnte nicht berechnet werden	

Die Position des Substituenten am Pyridinring in Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen hat einen signifikanten Einfluß auf den K_i -Wert der Inhibierung (Tab. 4). Ein Substituent in *ortho*-Position behindert den nucleophilen Angriff des Enzyms an den Inhibitor mehr als ein Substituent am Pyridinring des Inhibitors in *meta*- und *para*-Stellung. Beim Picolinsäure-Derivat könnte die Interaktion mit dem Enzym sterisch gehindert und damit z. B. für einen nucleophilen Angriff des Serinrestes an das Prolin-Carbonylkohlenstoffatom weniger gut zugänglich sein. Die in der Tabelle 4 aufgeführten kinetischen Parameter der Inhibierung der PEP-katalysierten Hydrolyse veranschaulichen dieses Ergebnis. Die K_i - und K_i^* -Werte der *meta*- und *para*-substituierten Verbindungen liegen ein bis zwei Größenordnungen unter den Werten für die *ortho*-substituierte Verbindung und belegen die bessere Affinität zum Enzym. Der k_{on} -Wert ist bei den *ortho*- und *meta*-substituierten Verbindungen um eine Größenordnung besser gegenüber den in *para*-Stellung substituierten Verbindungen. Die *meta*-Position wurde in diesem Vergleich als die beste Substitutionsstelle für eine elektronegative Gruppierung ermittelt.

Auswirkungen der C-terminalen Verlängerung der Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivate durch eine Glycinkette unterschiedlicher Länge auf die kinetischen Eigenschaften

Bei der Syntheseplanung der nun folgenden Verbindungen haben zwei unterschiedliche Beobachtungen eine Rolle gespielt. Zum einen wurde im Fall des N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylesters ein Zerfall in HEPES-Pufferlösung (pH = 7,6) beobachtet (Kapitel 2.2.1.). Zum anderen wird aufgrund der bereits in der Literatur beschriebenen Anhaltspunkte vermutet [86, 87, 290], daß PEP neben dem aktiven Zentrum eine zweite Bindungsstelle aufweist.

Mit einer Peptidkette unterschiedlicher Länge als Substituent am Pyridinring soll eine erhöhte Affinität des Inhibitors gegenüber dem Enzym durch eine zusätzliche Interaktion der Peptidkette mit dem Enzym, evtl. an der postulierten zweiten Bindungsstelle, erreicht werden. Als einfachste Strukturvariante (keine Seitenkette und damit keine zusätzliche funktionelle Gruppe, keine Stereoisomere) wurde Glycin als Peptidbaustein ausgewählt. Gleichzeitig ist beabsichtigt, eine erhöhte Stabilität des Inhibitors in wässrigem Medium zu erzielen.

N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure wurde an der Carbonsäurefunktion durch Glycinketten unterschiedlicher Kettenlänge C-terminal verlängert (Abbildung 25).

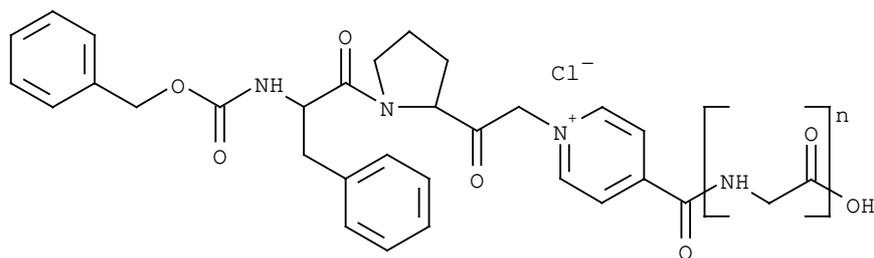


Abb. 25: Strukturformel von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly_n-OH

Die Abhängigkeit der inhibitorischen Konstanten von der Kettenlänge ist in Tabelle 5 dargestellt.

Nachteilig wirkte sich der elektronenziehende Substituent am Pyridin auf die nucleophilen Eigenschaften des Stickstoffs und damit in der Substitutionsreaktion mit dem Chlormethylketon aus. Die Ausbeuten im Substitutionsschritt sind bei Verwendung des mit einer elektronenziehenden funktionellen Gruppe substituierten Pyridins gegenüber dem unsubstituierten Pyridin als Synthesebaustein geringer. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde zum Vergleich auch eine Serie mit Pyridylelessigsäure als Synthesebaustein synthetisiert (Abbildung 26).

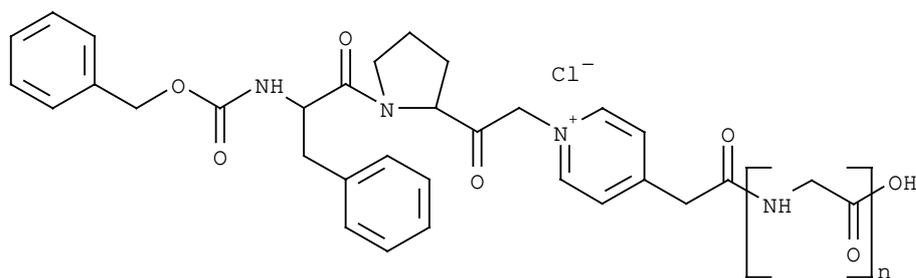


Abb. 26: Strukturformel von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylelessigsäure-Gly_n-OH

In diesen Verbindungen ist die Carbonsäuregruppe durch eine CH₂-Gruppe vom Pyridinring getrennt. Die Methylengruppe zwischen Ring und Carbonsäurefunktion fungiert in der Pyridylelessigsäure als Barriere für den induktiven und mesomeren Effekt, den die Carbonylfunktion auf den Ring ausübt. Durch den geringeren Elektronenzug des Substituenten in der Pyridylelessigsäure gegenüber dem Elektronenzug der Carbonylfunktion in Isonicotinsäure ist der Stickstoff in Pyridylelessigsäure nucleophiler als in Isonicotinsäure. Die Substitution in der Festphasensynthese von Pyridylelessigsäure-Gly_n-Harz an Peptidylchloromethylketone ist einfacher als die analoge Synthese der N-(Z-Phe-Pro-CH₂)Isonicotinsäure-Gly_n-OH-Verbindungen. Eine nucleophile Substitutionsreaktion führt bei Verwendung von Pyridylelessigsäure als Synthesebaustein zu einer höheren Ausbeute.

Tab. 5: Kinetische Parameter der PEP-(*Flavobacterium meningosepticum*) katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-pNA in Gegenwart von Z-Phe-Pro-Isonicotinsäuremethylketon-Derivaten

Z-Phe-Pro-CH₂-R R =	K_i (nM)	K_i[*] (nM)	k_{on} (s ⁻¹)	k_{on}/K_i (M ⁻¹ s ⁻¹)
-pyridin- <i>p</i> -COOH	200 (±30)	67 (±410)	1,7E-3 (±3,0E-4)	8500 (±2,0E3)
-pyridin- <i>p</i> -CO-Gly-OH	190 (±51)	1,0 (±0,0073)	1,2E-1 (±1,6E-2)	631579 (±1,9E5)
-pyridin- <i>p</i> -CO-Gly ₂ -OH	240 (±76)	1,6 (±0,0021)	5,0E-2 (±1,3E-2)	208333 (±8,5E4)
-pyridin- <i>p</i> -CO-Gly ₃ -OH	540 (±92)	1,3 (±0,16)	1,1E-1 (±5,6E-3)	203704 (±1,1E4)
-pyridin- <i>p</i> -CO-Gly ₄ -OH	54 (±10)	0,6 (±0,21)	2,0E-2 (±9,8E-4)	370370 (±7,1E4)
-pyridin- <i>p</i> -CO-Gly ₅ -OH	150 (±28)	32 (±21)	9,9E-2 (±3,7E-3)	660000 (±1,3E3)
-pyridin- <i>p</i> -CO-Gly ₆ -OH	37 (±0,9)	11 (±5,3)	1,5E-1 (±8,9E-3)	4054054 (±1,0E6)
-pyridin- <i>p</i> -CO-Gly ₁₀ -OH	92 (±15)	2,0 (±0,0093)	4,8E-2 (±1,2E-3)	521739 (±8,6E4)

Die Hemmkonstanten sind in der Größenordnung mit denen der Isonicotinsäure-Derivate vergleichbar, wobei die Pyridylelessigsäure-Derivate bei gleicher Kettenlänge in der Regel die etwas schlechtere Affinität zum Zielenzym, also höhere K_i-Werte aufweisen (Tabelle 6).

Eine Glycinkettenlänge von 4 Einheiten bei den N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Derivaten zeigt im K_i- und K_i^{*}-Wert eine signifikante Verbesserung der Affinität von Inhibitor zum Enzym (Abbildung 27, Seite 51). Eine Glycin-Kettenlänge von 6 ergibt noch

einen verbesserten K_i -Wert. Im K_i^* -Wert heben sich noch die Verbindungen mit einer Peptidkette der Glycinanzahl 1 - 3 durch einen niedrigeren Wert hervor.

Setzt man die bereits erwähnte N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylelessigsäure-Verbindung als Synthesebaustein ein, verlängert diese Verbindung mit einer Peptidkette unterschiedlicher Anzahl an Glycineinheiten und untersucht die inhibierende Wirkung dieser Verbindungen in der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA, so ergibt sich ein ähnliches Ergebnis wie bereits für die C-terminal mit einer Glycinkette verlängerten Isonicotinsäuremethylketon-Derivate. Hier wird im Vergleich der kinetischen Konstanten auch wieder deutlich, daß eine Verbindung mit einer Kette von 4 Glycin-Einheiten eine Verbesserung der Affinität zwischen Inhibitormolekül und Enzym bewirkt (Abbildung 28). Der k_{on} -Wert und damit die Umwandlungsgeschwindigkeit von EI- in den EI*-Komplex ist im Vergleich zu den übrigen Verbindungen geringer. Zusätzlich zeigt sich bei einer Kettenlänge von 2 Glycin-Einheiten am Inhibitor ein deutlich niedrigerer K_i^* -Wert, also eine erhöhte Affinität von Inhibitor zum Enzym.

Tab. 6: Kinetische Parameter der PEP-(*Flavobacterium meningosepticum*) katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA in Gegenwart von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylelessigsäure-Derivaten

Z-Phe-Pro-CH ₂ -pyridin-	K_i (nM)	K_i^* (nM)	k_{on} (s ⁻¹)	k_{on}/K_i (M ⁻¹ s ⁻¹)
- <i>p</i> -CH ₂ -CO-Gly ₁ -OH	1300 (±190)	44 (±0,25)	5,3E-2 (±4,4E-2)	40769 (±6,0E3)
- <i>p</i> -CH ₂ -CO-Gly ₂ -OH	730 (±220)	0,18 (±0,0037)	5,0E-2 (±4,4E-4)	68493 (±2,1E4)
- <i>p</i> -CH ₂ -CO-Gly ₃ -OH	890 (±160)	260 (±150)	4,8E-2 (±6,0E-4)	53933 (±9,7E3)
- <i>p</i> -CH ₂ -CO-Gly ₄ -OH	100 (±12)	2,3 (±0,0042)	1,6E-2 (±2,3E-3)	160000 (±1,9E4)
- <i>p</i> -CH ₂ -CO-Gly ₆ -OH	170 (±22)	19 (±0,16)	5,8E-2 (±4,3E-3)	341176 (±5,1E4)
- <i>p</i> -CH ₂ -CO-Gly ₈ -OH	160 (±18)	1,0 (±2,6)	3,6E-2 (±3,1E-3)	225000 (±3,2E4)
- <i>p</i> -CH ₂ -CO-Gly ₁₀ -OH	170 (±0,2)	7,1 (±6,5)	2,1E-2 (±1,3E-3)	123529 (±7,8E3)

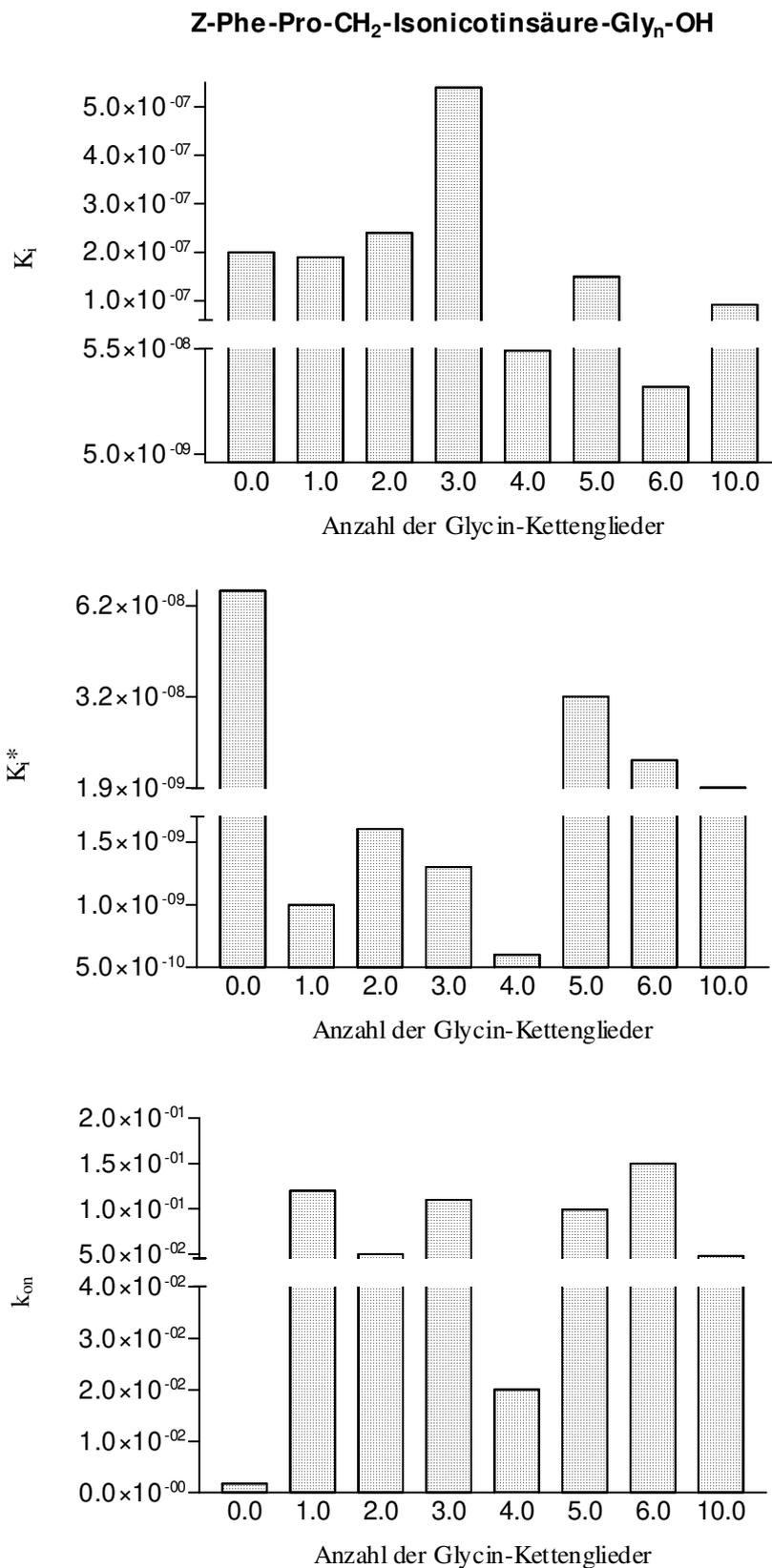


Abb. 27: Vergleich der kinetischen Parameter der slow-binding Inhibierung der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-pNA in Abhängigkeit von der Glycin-Kettenlänge in N-(Z-Phe-Pro-CH₂)Isonicotinsäure-Gly_n-Derivaten

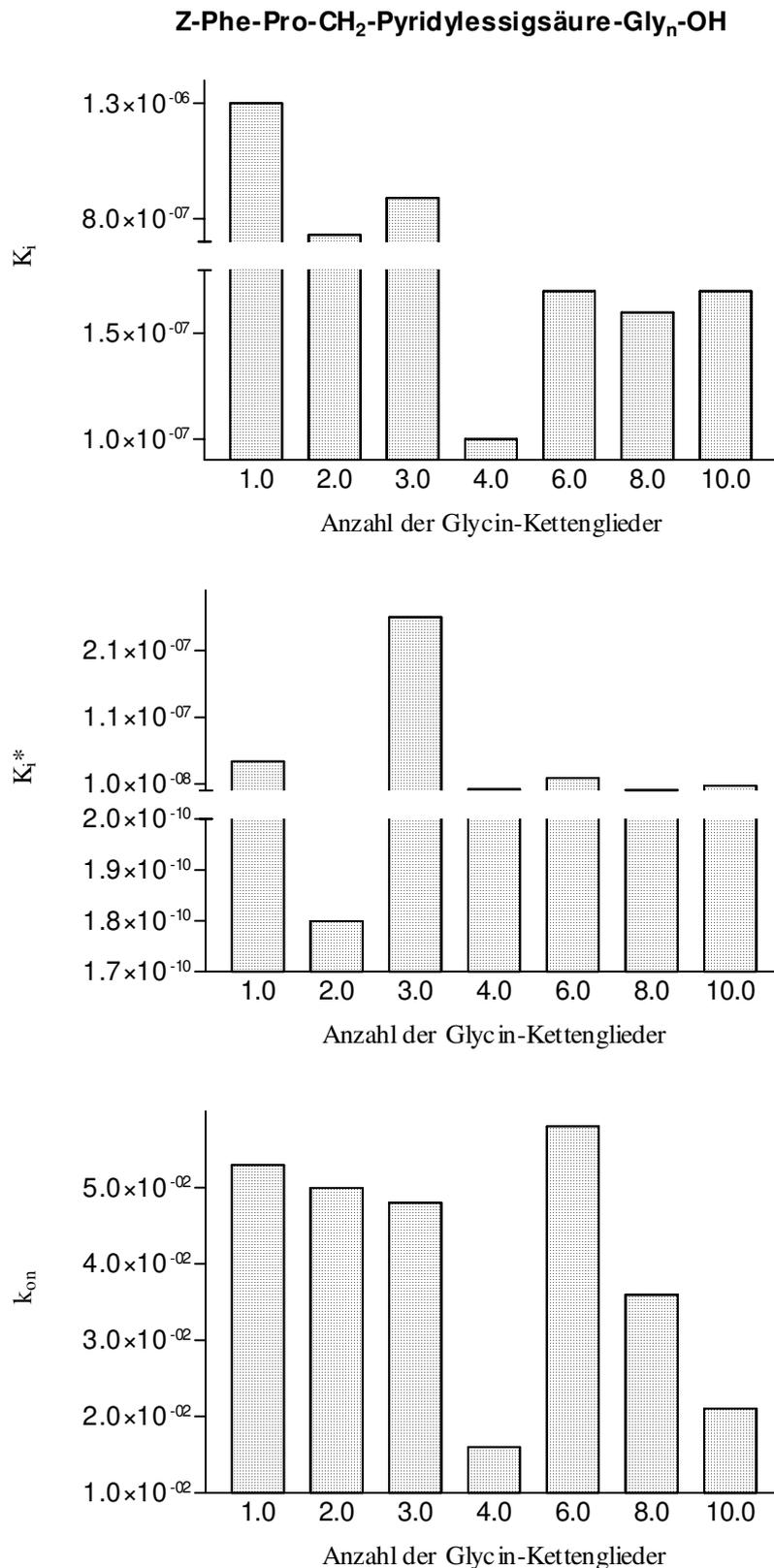


Abb. 28: Vergleich der kinetischen Parameter der slow-binding Inhibierung der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA in Abhängigkeit von der Glycin-Kettenlänge in N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridyllessigsäure-Gly_n-Derivaten

Die kinetische Untersuchung von Inhibitoren der PEP auf der Basis von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure bzw. N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylelessigsäure, die C-terminal um eine Peptidkette, bestehend aus Glycineinheiten unterschiedlicher Anzahl, ergänzt sind, hat folgendes ergeben: Alle in Tabelle 5 und 6 aufgeführten C-terminal verlängerten Verbindungen sind bei 10 °C über mindestens 24 h in Wasser stabil. Die Verlängerung der Pyridinium-Methylketone durch eine Glycinkette hat zu einer Stabilitätsverbesserung im wässrigen Medium geführt.

Die verbesserten kinetischen Parameter von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure bzw. -Pyridylelessigsäure mit einer Glycinkette aus 4 Aminosäuren als C-terminale Verlängerung belegen eine Verbesserung der Affinität der Verbindung zum Zielenzym und lassen auf eine zusätzliche Interaktion zwischen der Glycinkette des Inhibitors und dem Enzym schließen. Ob dies bereits eine Wechselwirkung zu einer sekundären Bindungsstelle darstellt, bleibt offen. Die konformative Anpassung des Inhibitors an die Enzymstruktur ist wahrscheinlich bei diesen beiden Substanzen (N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₄-OH und N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylelessigsäure-Gly₄-OH) in optimaler Weise gewährleistet.

Untersuchungen zur räumlichen Restriktion am Enzym mit Hilfe einer cyclischen Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Verbindung

Rückschlüsse auf die räumlichen Ausmaße des aktiven Zentrums lassen die kinetischen Parameter einer cyclischen Verbindung zu. Es wurde γ -cyclo(N-(Z-Lys-Pro-CH₂-)Nicotinsäure-Gly₂)/Cl⁻ synthetisiert und im Assay der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-pNA eingesetzt (Tabelle 7). Da die K_i-Werte nicht nennenswert von den Werten der linearen Verbindungen abweichen, wird vermutet, daß das aktive Zentrum nicht eine tiefe Tasche im Enzym ausbildet, sondern daß Bindungsepitop für Substrat bzw. Inhibitor frei auf der Oberfläche des Enzyms zugänglich ist und keinerlei räumliche Restriktion besteht.

Tab. 7: Kinetische Parameter der PEP-(*Flavobacterium meningosepticum*) katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-pNA in Gegenwart von γ -cyclo(N-(Z-Lys-Pro-CH₂-)Nicotinsäure-Gly₂-)

γ -cyclo(N-(Z-Lys-Pro-CH ₂ -)Nicotinsäure-Gly ₂ -)	K _i (nM)	K _i * (nM)	k _{on} (s ⁻¹)	k _{on} /K _i (M ⁻¹ s ⁻¹)
	15 (±0,39)	1,1 (±0,32)	1,7E-1 (±4,0E-2)	11333333 (±2,7E6)

Inhibierende Eigenschaften der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone auf PEP aus Schweineniere und Rinderhirn im Vergleich zu PEP aus *Flavobacterium meningosepticum*

Um zu prüfen, ob die Inhibitoren eine ähnliche Effizienz wie bei der für Peptidyl-Pyridinium-Methylketon charakteristischen slow-binding Inhibierung der PEP-(*Flavobacterium meningosepticum*) katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA auch bei Verwendung von aus anderen Zellgeweben isolierter PEP erzielen, wurden folgende kinetische Untersuchungen durchgeführt:

Exemplarisch wurden zwei Inhibitoren, N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₂-OH bzw. N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₆-OH, in der Enzym-katalysierten Hydrolyse mit PEP aus Schweinenierenrinde und löslicher PEP aus Rinderhirn eingesetzt. Der charakteristische zeitliche Verlauf der *p*NA-Freisetzung durch PEP in Gegenwart von Inhibitor bestätigt das bereits beschriebene slow-binding Verhalten. In Tabelle 8 sind die ermittelten kinetischen Parameter dieser aus verschiedenen Geweben isolierten PEP-katalysierten Reaktion in Gegenwart von Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen zusammengefaßt.

Tab. 8: Kinetische Parameter der PEP-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-*p*NA in Gegenwart von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₂-OH bzw. N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₆-OH. Die eingesetzte PEP wurde aus *Flavobacterium meningosepticum* expremiert oder aus Schweinenieren bzw. Rinderhirn isoliert

Inhibitor	kinetische Parameter	PEP aus Schweinenieren	PEP aus <i>Flavobacterium meningosepticum</i> -	lösliche PEP aus Rinderhirn
N-(Z-Phe-Pro-CH ₂ -)Isonicotinsäure-Gly ₂ -OH	K _i (M)	1,1E-7 (±9,3E-8)	2,4E-7 (±7,6E-8)	
	K _i [*] (M)	5,3E-10 (±6,3E12)	1,6E-9 (±2,1E-12)	
	k _{on} (s ⁻¹)	6,4E-2 (±1,2E-2)	5,0E-2 (±1,3E-2)	
	k _{on} /K _i (M ⁻¹ s ⁻¹)	581818 (±5,0E5)	208333 (±8,5E4)	
N-(Z-Phe-Pro-CH ₂ -)Isonicotinsäure-Gly ₆ -OH	K _i (M)	4,5E-8 (±1,6E-10)	3,7E-8 (±9,0E-9)	6,8E-8 (±7,6E-9)
	K _i [*] (M)	1,3E-9 (±5,9E-10)	1,1E-8 (±5,3E-9)	1,2E-8 (±5,6E-9)
	k _{on} (s ⁻¹)	6,1E-2 (±6,2E-3)	1,5E-1 (±8,9E-3)	3,5E-2 (±6,9E-3)
	k _{on} /K _i (M ⁻¹ s ⁻¹)	1355556 (±1,4E5)	4054054 (±1,0E6)	520588 (±1,2E5)

Während die initiale Affinität (K_i -Wert) beim diffusionskontrollierten Andocken von N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₂-OH bzw. N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₆-OH gegenüber den drei Enzymen (Prolylendopeptidasen aus *Flavobacterium meningosepticum*, Schwein und Rind) ähnlich ist, unterscheidet sich die Affinität im steady-state-Gleichgewicht (K_i^*) und in der Umwandlungsgeschwindigkeit (k_{on}) des EI-Komplexes in den EI^{*}-Komplex. Der Inhibitor N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₆-OH weist gegenüber PEP (*Rinderhirn*) und PEP (*Schweineniere*) einen um eine Größenordnung kleineren k_{on} -Wert, also eine langsamere Umwandlungsgeschwindigkeit, als gegenüber PEP (*Flavobacterium meningosepticum*) auf. Dieses differente Verhalten in der Konformationsänderung des Enzym-Inhibitor-Komplexes ist auf die unterschiedliche Proteinstruktur und damit verbundene Unterschiede der Bindungsseite der drei Enzyme zurückzuführen. Es ist weiterhin zu beobachten, daß PEP aus Schweineniere gegenüber PEP aus *Flavobacterium meningosepticum* um eine Größenordnung effizienter durch die beiden ausgewählten Inhibitoren (N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₂-OH bzw. N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure-Gly₆-OH) gehemmt wird. Ein ähnlich starker Affinitätsunterschied von PEP aus Schweinehirn und PEP *Flavobacterium meningosepticum* wurde bereits beim Vergleich der Inhibierung mittels (ω -N-(O-Acyl)-hydroxyamid)-aminodicarbonsäure-pyrrolidid beschrieben [27].

2.2.3. Untersuchung der Wechselwirkung zwischen PEP und Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie

NMR-Spektroskopie ist für die Untersuchung von Katalysemechanismen von Enzymen ein etabliertes Instrumentarium. Auch die Wechselwirkung von Inhibitoren mit Enzymen wurde mittels NMR bereits unter verschiedenen Aspekten beleuchtet. Rich konnte so die irreversible Inhibierung der Cysteinprotease Papain durch Alkylierung der Cys²⁵-Aminosäure mittels Epoxysuccinylpeptid nachweisen [143]. Scott hat die irreversible Inhibierung von Trypsin durch Z-Lys-Chlormethylketon untersucht [145]. Es konnte die Ausbildung einer kovalenten Bindung des katalytisch aktiven Histidinrestes zum Methylenkohlenstoffatom des Inhibitors und die Ausbildung eines tetrahedralen Übergangszustandes durch nucleophilen Angriff der OH-Gruppe von Ser¹⁹⁵ im Enzym an das Carbonylkohlenstoffatom des Inhibitors nachgewiesen werden. Die Rolle des Histidinrestes in einer α -lytischen Protease bei der Bindung von Peptidylboronsäure wurde von Bachovchin mittels ^{15}N -NMR charakterisiert [224]. Mit Hilfe von Boronsäurederivaten wurde die Bildung eines kovalenten Intermediates zwischen dem Heteroatom Bor und dem katalytisch aktiven Serin des Enzyms im Übergangszustand gezeigt [154].

Es ist bekannt, daß Serinproteasen mit carbonylaktiven Verbindungen (Aldehyde, Nitrile etc.) tetrahedrale Intermediate ausbilden [6] und diese Reaktionen kinetisch nach einem sogenannten slow-binding Mechanismus ablaufen. Der sogenannte langsame Teilschritt der Reaktion geht dabei mit der Ausbildung der kovalenten Bindung (Bildung des tetrahedralen Intermediates) einher. Da auch aktivierte Ketoverbindungen Halbacetale bilden können, war von Interesse, in einem Modellsystem zu untersuchen, ob auch das für die Substanzklasse der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone beobachtete slow-binding Verhalten bei Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor auf einen möglichen Übergang von einem sp^2 -hybridisierten Zustand des Prolin-Carbonylkohlenstoffatoms in ein sp^3 -Hybrid zurückgeführt werden kann. Uns interessierte, ob diese Kinetik mit bestimmten Umstrukturierungen des Enzym-Inhibitor-Komplexes einhergeht, was mittels ^{13}C -NMR detektiert werden sollte. Die signifikanten Merkmale des Katalysemechanismus der prolinspezifischen Protease PEP sind in folgenden Punkten zusammengefaßt:

1. Nur die *trans*-Konformation bezüglich der Xaa-Pro-Bindung wird vom Enzym erkannt [11].
2. Im Enzym-Inhibitor-Komplex kommt es wahrscheinlich zu einer *trans-cis*-Isomerisierung der Xaa-Pro-Bindung des Substrates.

3. Zwischen Enzym und Substrat wird im Übergangszustand ein tetrahedrales Intermediat gebildet [6].
4. Bei der Hydrolyse prolinhaltiger Substrate ist der Deacylierungsschritt geschwindigkeitsbestimmend.

In Kapitel 2.2.2. wurde bereits näher das slow-binding Verhalten der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone erläutert. Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon hat sich dabei als ein potenter PEP-Inhibitor erwiesen und wurde deshalb für die NMR-Untersuchungen als Modellsubstanz herangezogen. Die Inhibierungskonstante K_i für die Bildung des initialen Enzym-Inhibitor-Komplexes liegt bei $8,4 \cdot 10^{-7}$ ($\pm 1,3 \cdot 10^{-7}$) M. Die Konstante K_i^* im steady-state-Gleichgewicht beträgt $1,1 \cdot 10^{-7}$ ($\pm 1,8 \cdot 10^{-8}$) M. Der mit Halbwertszeiten im Minutenbereich ablaufende Übergang vom EI-Komplex in den EI^* -Komplex verläuft mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} von $1,4 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 2,6 \cdot 10^{-4}$) s^{-1} . Diese Geschwindigkeitskonstante könnte, in Analogie zur Bildung eines Halbacetals zwischen Serinprotease und Aldehyden, die Ausbildung des tetrahedralen Intermediates zwischen PEP und Peptidyl-Pyridinium-Methylketon beschreiben und damit mit der Knüpfung einer kovalenten Bindung verbunden sein.

Um die mögliche Umwandlung des sp^2 -hybridisierten Prolin-Carbonylkohlenstoffatoms der Inhibitorverbindung in ein sp^3 -Hybrid (tetrahedrales Intermediat) mittels ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie besser detektieren zu können, wurde eine Verbindung mit ^{13}C -markierter Prolin-Carbonylgruppe synthetisiert. Die Strukturformel der in den folgenden Versuchen verwendeten Substanz ist in Abbildung 29 dargestellt.

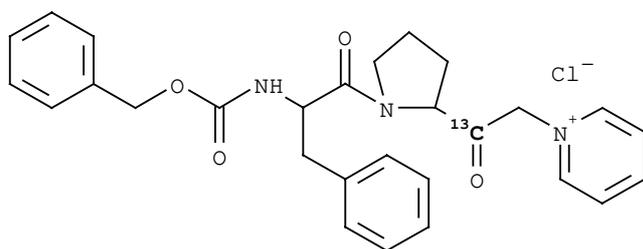


Abb. 29: Strukturformel von ^{13}C -markiertem Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon

Für das Anlagern des Enzyms an den Inhibitor gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Einfachste Interaktionen sind nichtkovalente, über van-der-Waals-Kräfte zustandekommende Bindungen. Eine stärkere Wechselwirkung kann durch eine Interaktion zwischen ionischen

Strukturen erfolgen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Ausbildung einer kovalenten Bindung. Hier kann beispielsweise die im aktiven Zentrum des Enzyms positionierte Aminosäure Serin mit ihrer OH-Gruppe die Carbonylgruppe des Prolins im Inhibitormolekül nucleophil angreifen und einen tetrahedralen Übergangszustand ausbilden. Ein solcher Übergangszustand, in dessen Folge sich ein Acylenzymkomplex ausbildet (Kapitel 1.1.2.), ist bereits für die Substrathydrolyse beschrieben worden. Die Funktionsweise übergangszustandsanaloger Inhibitoren basiert auf der Ausbildung eines tetrahedralen Übergangszustandes und führt folglich zur Bildung stabiler Enzym-Inhibitor-Komplexe, wie z. B. Halbacetale, die sich zwischen Serinproteasen und Aldehyden bilden können [255].

Die Frage stellt sich nun, ob sich eine analoge kovalente Bindung auch bei der Interaktion zwischen Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon und PEP aus *Flavobacterium meningosepticum* ausbildet.

Zur Ermittlung von Referenzspektren wurde die Inhibitor-Verbindung zunächst separat in verschiedenen Lösungsmitteln ^{13}C -NMR-spektroskopisch analysiert (Abbildungen 30 u. 31).

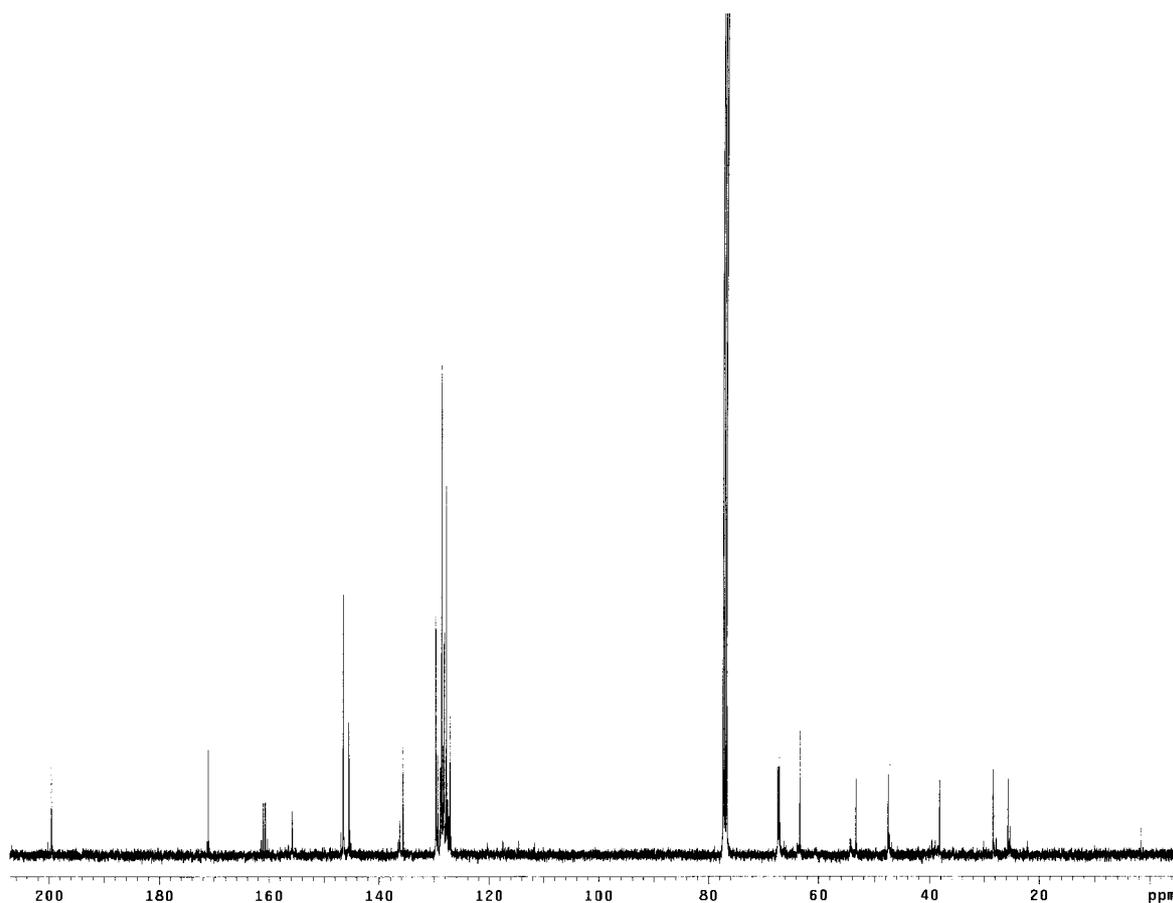


Abb. 30: ^{13}C -NMR-Spektrum (7828 Scans) von Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon in CDCl_3 (40 mM)

Das Signal des Hauptisomeren für die Prolin-Carbonylgruppe liegt bei 201,9 ppm, 199,5 ppm bzw. 203,7 ppm bei Verwendung von DMSO-d₆, CDCl₃ bzw. H₂O/D₂O (9 : 1 Vol.-Teile). Verwendet man H₂O/D₂O (9 : 1 Vol.-Teile) als Lösungsmittel für die NMR-Messung von Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (4 mM), so beobachtet man ein zusätzliches Signal bei 98,7 ppm (Abbildung 31).

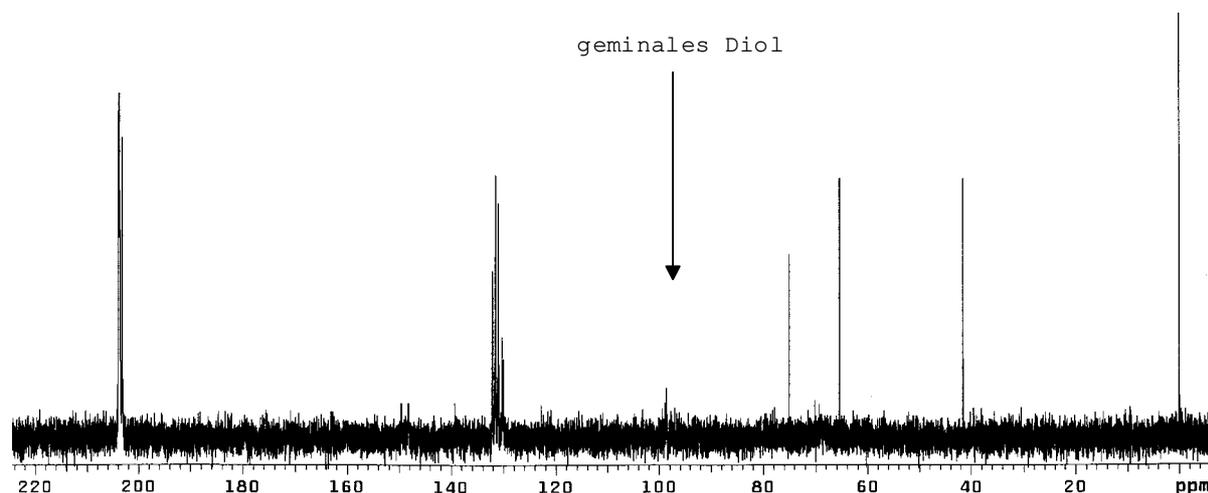


Abb.31: ¹³C-NMR-Spektrum (28704 Scans) von markiertem Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (4mM) in H₂O/D₂O (9 : 1 Vol.-Teile)

Bei Verwendung von DMSO-d₆ und CDCl₃ als Lösungsmittel konnte im Bereich um 100 ppm kein Signal der Inhibitorsubstanz beobachtet werden (Abbildung 30).

Im ¹³C-NMR-Spektrum der unmarkierten Verbindung (Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon, 240 mM) in H₂O/D₂O (9 : 1 Vol.-Teile) erscheint ebenfalls ein Signal für das geminale Diol bei 98,7 ppm (Abbildung 32). Es ist bekannt, daß geminale Diole bei ca. 100 ppm eine ¹³C-Resonanz zeigen. Bildet sich aus der Ketogruppe von Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon ein geminales Diol (Hydrat), so verschiebt sich die Resonanzfrequenz zu höherem Feld [242]. Demzufolge ist das neben dem Carbonylsignal bei 203,7 ppm zusätzlich detektierte Signal bei 98,7 ppm der hydratisierten Form des markierten Prolin-Carbonyl-Kohlenstoffatoms des Inhibitors Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon zuzuordnen.

Bei Charakterisierung von ¹³C-markiertem Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon in CD₃OD mittels ¹³C-NMR erscheint neben dem Signal für das Prolin-Carbonylkohlenstoffatom bei 200,5 ppm ein weiteres Signal bei 99,1 ppm für das markierte ¹³C-Atom. Die Verschiebung des Resonanzsignals zu höherem Feld spricht in diesem Fall für die Ausildung eines Halbacetals zwischen Inhibitor und dem Lösungsmittel Methanol [242].

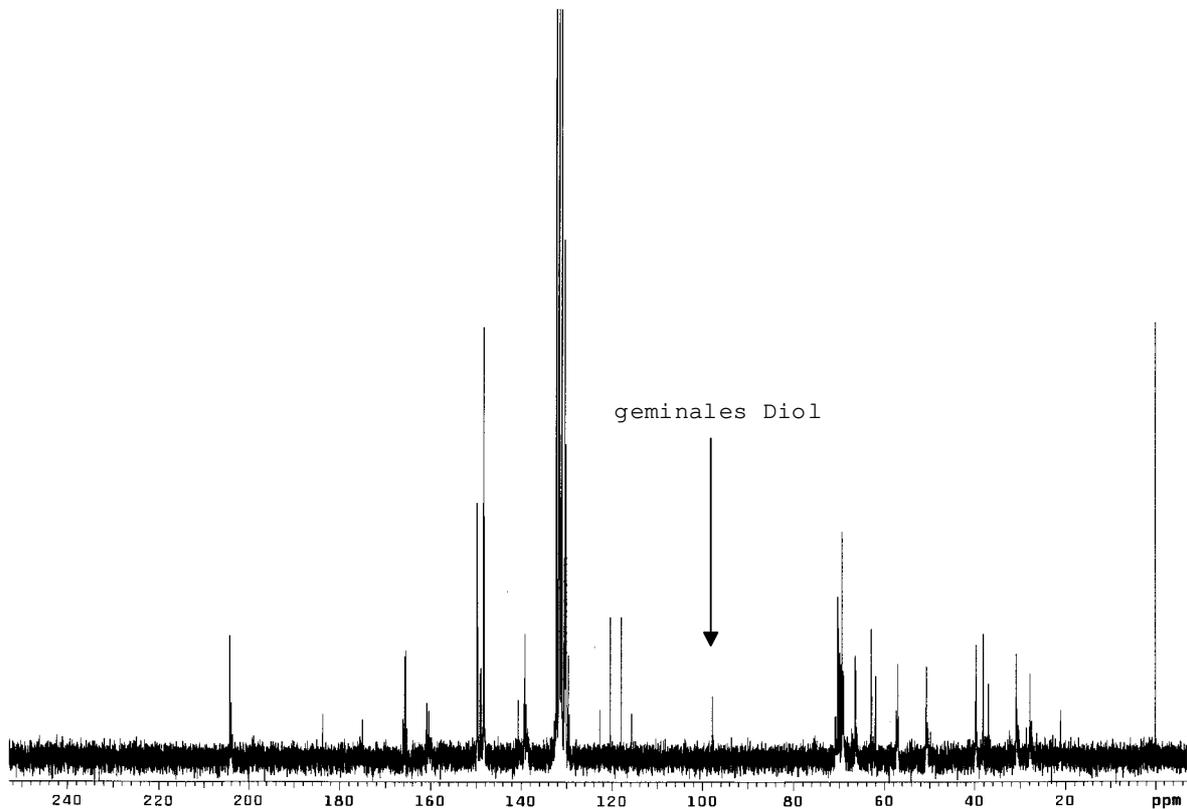


Abb. 32: ^{13}C -NMR-Spektrum (30.000 Scans) von unmarkiertem Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (24 mM) in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9 : 1 Vol.-Teile)

Um nun zu prüfen, ob sich ein analoges Halbacetal durch nucleophilen Angriff des Serinrestes im Enzym an der Carbonylgruppe des Inhibitors im Enzym-Inhibitor-Komplex ausbildet, wurden die folgenden NMR-Messungen durchgeführt:

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon und PEP wurde zunächst ein ^{13}C -Spektrum des Enzyms (0,3 mg/ml Protein, 21 U/mg) im Verlauf von drei Tagen in einer Lösung von Tris-Puffer in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9 : 1 Vol.-Teile) akkumuliert. Es wurde festgestellt, daß das Enzym in dem uns interessierenden Bereich der chemischen Verschiebung bei der gegebenen Konzentration selbst keine Signale erzeugt. Versetzt man nun diese Enzymmenge (4 μM im Ansatz) mit 1/10 der Molmenge an Inhibitor (0,4 μM im Ansatz), so stellt man fest, daß ein Resonanzsignal für die Hydratform des Inhibitors in Analogie zu den Abbildungen 31 und 32 nicht mehr beobachtet wird (Abbildung 33).

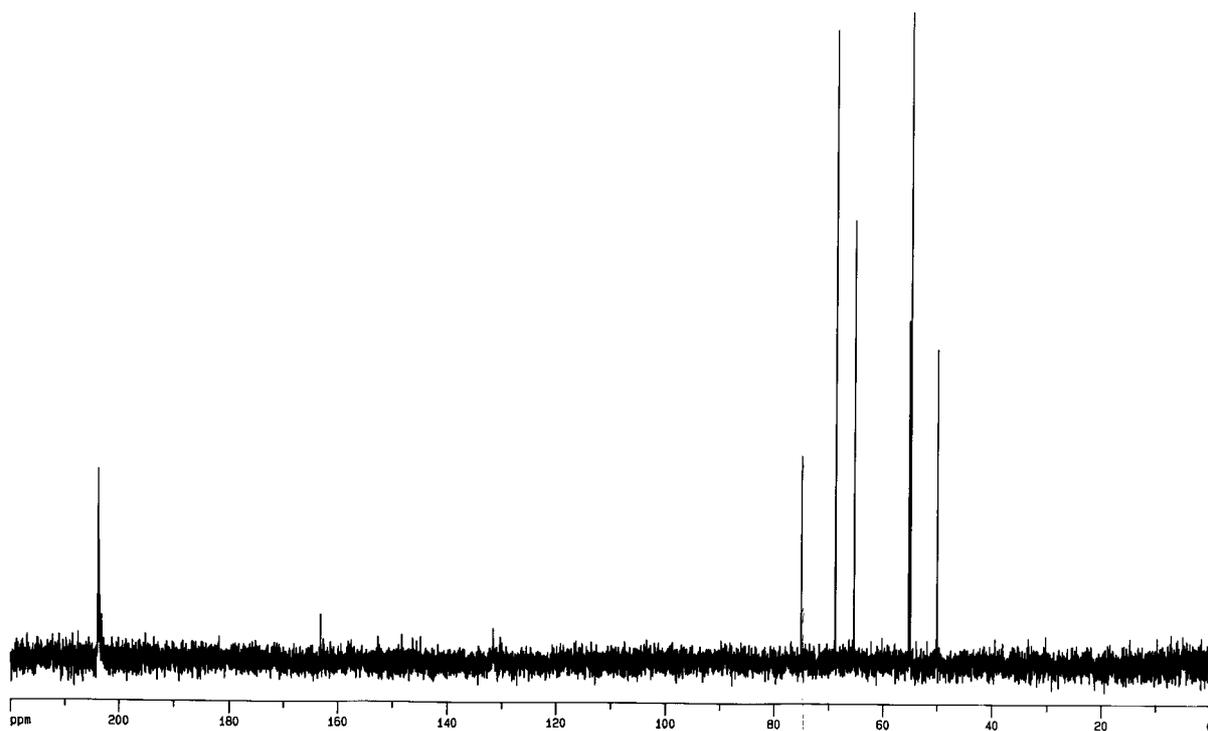


Abb. 33: ^{13}C -NMR-Spektrum (80016 Scans) von markiertem Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon ($0,4 \mu\text{M}$ im Ansatz) in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9 : 1 Vol.-Teile) in Gegenwart von PEP aus *Flavobacterium menigosepticum* ($6,3 \text{ U/ml}$, $4 \mu\text{M}$ im Ansatz)

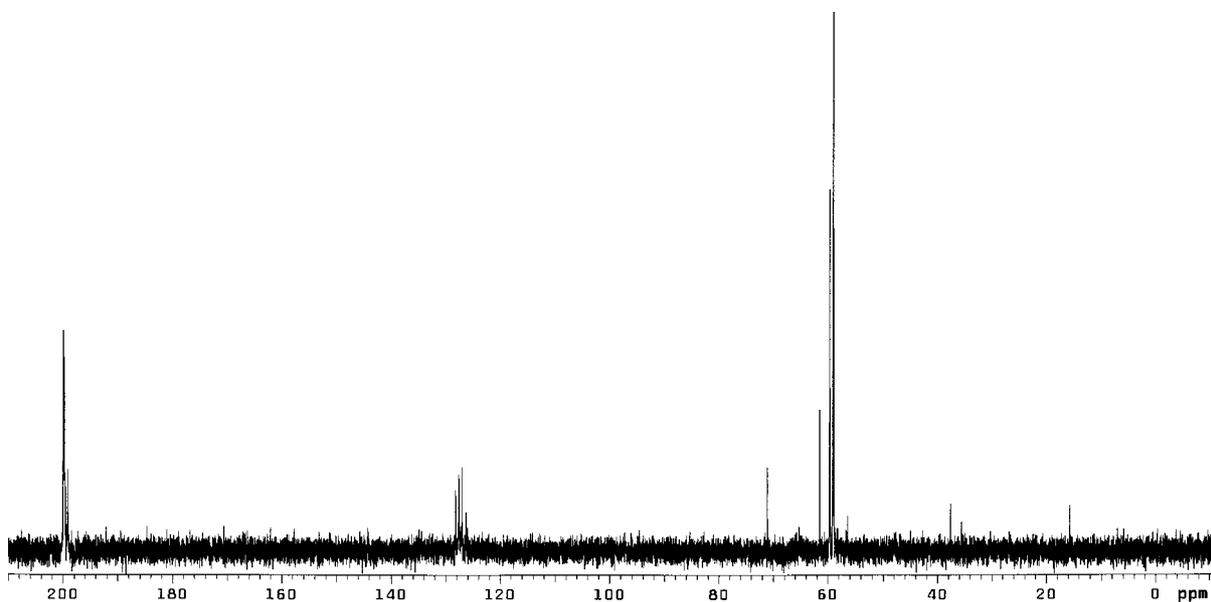


Abb. 34: ^{13}C -NMR-Spektrum (83520 Scans) von markiertem Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon ($40 \mu\text{M}$ im Ansatz) in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9 : 1 Vol.-Teile) in Gegenwart von PEP aus *Flavobacterium menigosepticum* ($6,9 \text{ U/ml}$, $4 \mu\text{M}$ im Ansatz)

Auch unter Zugabe von weiterem Inhibitor bis zu einer equimolaren Menge (4 μM), bzw. in 10fachem Überschuß (40 μM , Abbildung 34) gegenüber der eingesetzten Enzymmenge, kann jeweils nach 3 Tagen Spektrenakkumulation kein Signal bei 98,7 ppm detektiert werden. Eine weitere Resonanz, charakteristisch für dieses ^{13}C -Atom, konnte auch an keiner weiteren Stelle des Spektrums gefunden werden. Es erscheint lediglich das Prolin-Carbonylkohlenstoff-Signal bei 203,7 ppm. Erst nach Zugabe eines sehr großen Überschusses an Inhibitor (45 mM) gegenüber dem Enzym ist das oben beschriebene Hydratsignal wieder zu beobachten (Abbildung 35).

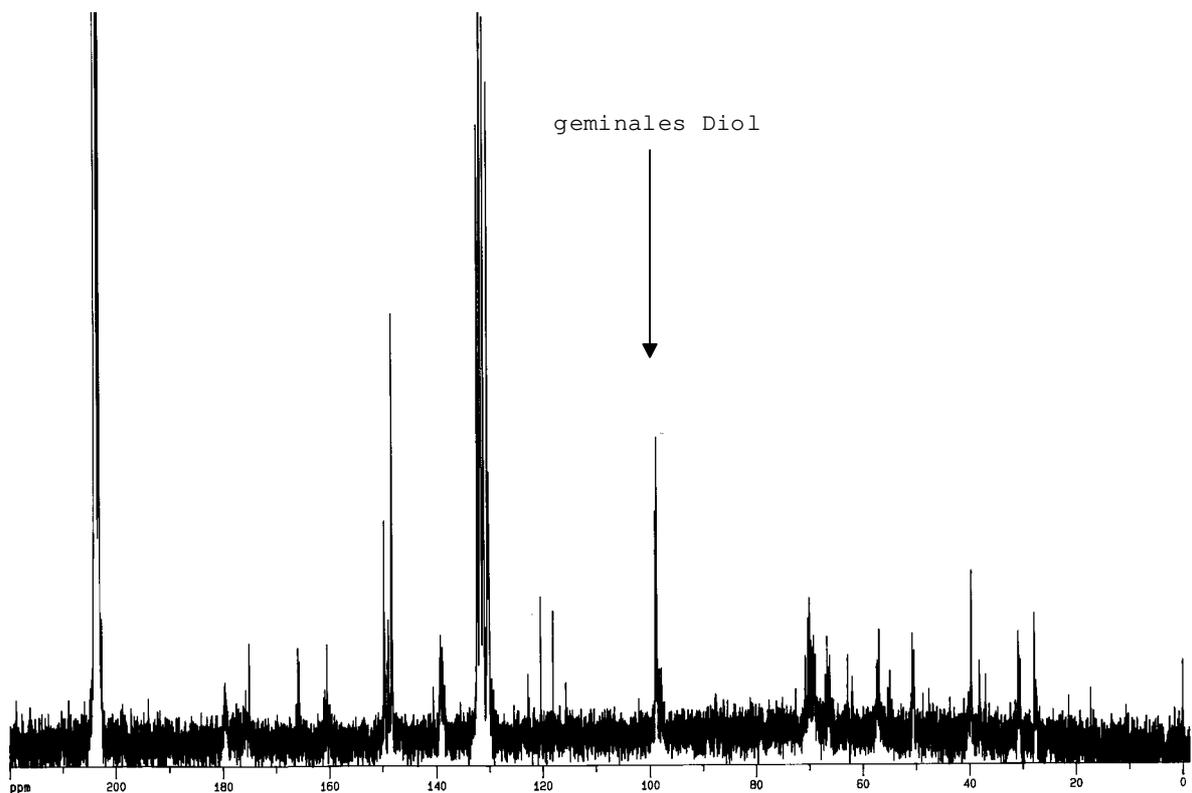


Abb. 35: ^{13}C -NMR-Spektrum (6685 Scans) von markiertem Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (45 mM im Ansatz) in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9 : 1 Vol.-Teile) in Gegenwart von PEP aus *Flavobacterium meningosepticum* (6,8 U/ml, 4 μM im Ansatz)

Die Ergebnisse dieser NMR-Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß sich unter den gegebenen Meßbedingungen die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen PEP und dem Inhibitor über die Detektion eines entsprechenden Signals für ein tetrahedrales C-Atom im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht belegen läßt. Hier hätte, unter Einsatz eines Enzymüberschusses gegenüber dem Inhibitor, das Prolin-Carbonylkohlenstoff-Signal bei 203,7 ppm verschwinden

und im Bereich um 100 ppm ein neues Signal registriert werden müssen, beispielsweise hervorgerufen durch ein tetraedrales Intermediat, d. h. durch den Angriff der OH-Gruppe des Serins im aktiven Zentrum des Enzyms an das Prolin-Carbonylkohlenstoffatom. Ein solches Addukt ist im ^{13}C -NMR-Spektrum von Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon in CD_3OD nachweisbar und zeigt eine chemische Verschiebung von 99,1 ppm.

Aus den Beobachtungen wird vielmehr postuliert, daß der Inhibitor nichtkovalent, durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, im aktiven Zentrum der PEP bindet. Für die Hydratform des Inhibitors gibt es daher diese Möglichkeit zu binden nicht. Das Enzym verschiebt durch selektive Bindung des Keton-Derivates, das in Abbildung 36 beschriebene Gleichgewicht zugunsten der nicht hydratisierten Form.

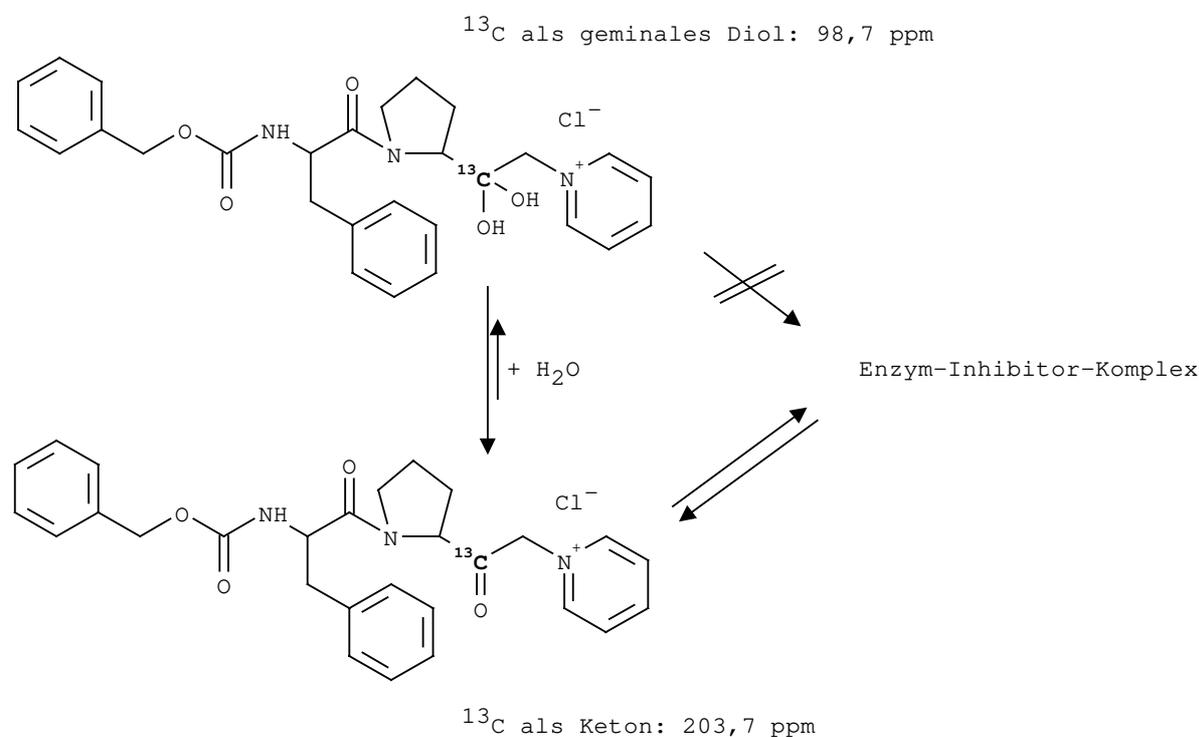


Abb. 36: Schema des postulierten Gleichgewichtes in wässriger Lösung zwischen Enzym und Inhibitor, der in hydratisierter und nichthydratisierter Form vorliegt. Unterscheidbar sind beide Formen durch die chemische Verschiebung im NMR (Angabe in ppm)

Der vom Enzym freigesetzte Inhibitor bildet langsamer ein Hydrat aus, als er erneut vom Enzym gebunden wird. Daher ist das Signal bei 98,7 ppm für die Hydratform des Prolin-Carbonylkohlenstoffatoms des Inhibitors bei Enzymzugabe zum Inhibitor (10facher

Überschuß an Inhibitor, equimolar bzw. 10facher Überschuß an Enzym) verschwunden. Nur das Signal für das unhydratisierte Prolin-Carbonylkohlenstoffatom wird beobachtet. Erst bei einem Mischungsverhältnis von Inhibitor zu Enzym von 10.000 zu 1 ist das Signal für die geminale Diolform des Inhibitors wieder zu detektieren (Abbildung 35).

Wird der Inhibitor in Gegenwart von Enzym in equimolarer Konzentration (I = 40 μ M, E = 40 μ M) 13 C-NMR-spektroskopisch untersucht, nachdem das Enzym thermisch denaturiert wurde, erscheint ebenfalls ein Hydratsignal bei 98,7 ppm (Abbildung 37).

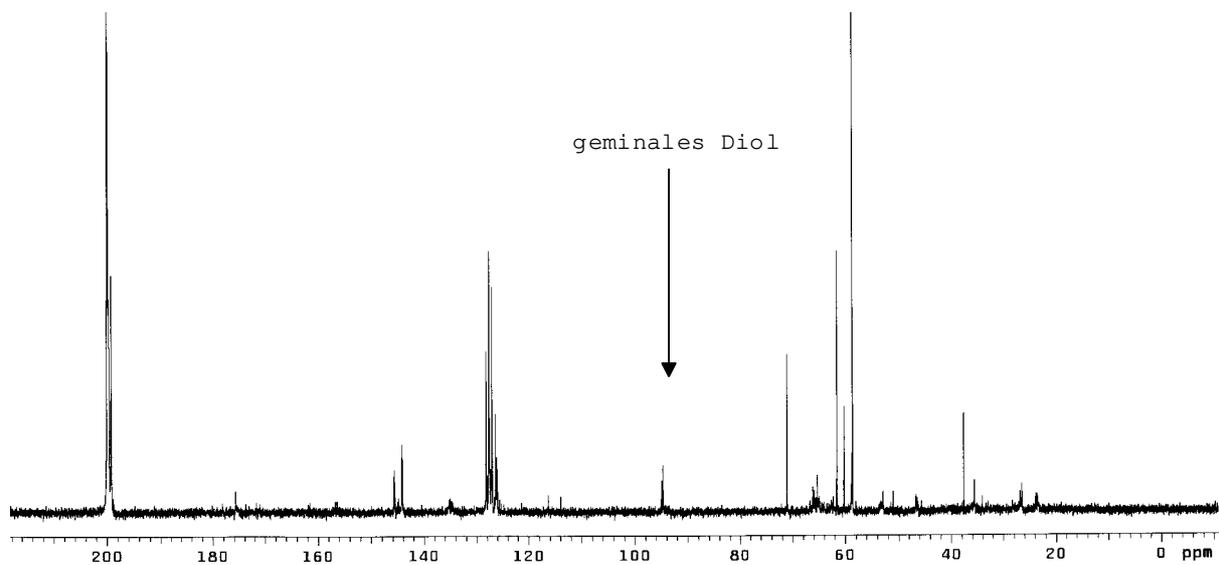


Abb. 37: 13 C-NMR-Spektrum (131872 Scans) von markiertem Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon (40 μ M im Ansatz) in H_2O/D_2O (9 : 1 Vol.-Teile) in Gegenwart von thermisch denaturierter PEP aus *Flavobacterium meningosepticum* (40 μ M im Ansatz)

Offensichtlich erfolgt die Bildung des stabilen EI*-Komplexes nicht unter Ausbildung einer kovalenten Bindung. Der postulierte nucleophile Angriff eines Serin-Hydroxyls des Enzyms unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zur Ketogruppe des Inhibitors und damit eines tetrahedralen Intermediates (Halbacetal) bleibt aus.

Demnach könnte das beobachtete slow-binding Verhalten auf Konformations-Änderungen des Enzym-Inhibitor-Komplexes unter Verstärkung der nichtkovalenten Wechselwirkungen zurückgeführt werden. Dieses Ergebnis ist konform mit dem in Kapitel 2.2.2. dargestellten Resultat, nach dem eine Veränderung der elektronischen Verhältnisse am Heteroatom Stickstoff beim Vergleich der Verbindungen N-(Z-Phe-Pro- CH_2 -)Pyridin, -Pyrrolidin bzw.

-Piperidin eher einen inversen Effekt auf die Geschwindigkeitskonstante k_{on} des Andockens von Inhibitor-molekül an das Zielenzym zur Folge hat (Tabelle 3, Seite 45). Die gleichzeitige Erhöhung der Elektrophilie am Reaktionszentrum (δ^+ -Charakter) des Prolin-Carbonyls durch die am benachbarten Stickstoff positionierte positive Ladung führt hier nicht zu einer erhöhten Affinität des Inhibitors zum Enzym. Die Ergebnisse beider Experimente, sowohl die nicht nachweisbare Bildung eines tetrahedralen Intermediates, als auch der nicht nachweisbare elektronische Einfluß auf die Reaktivität, d. h. die kinetischen Konstanten der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen, sprechen gegen die Ausbildung einer chemischen Bindung im Zuge der Interaktion zwischen Inhibitor und Enzym. Das steht im Gegensatz zu den nachgewiesenen Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen von zum Beispiel Thrombin und substratanalogen Arginyl-Ammonium-Methylketonen, bei denen die Autoren eine derartige kovalente Wechselwirkung nachweisen konnten [290]. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis für die differenten Katalysemechanismen von Serinproteasen des Subtilisin- bzw. Trypsin-Typs und der Prolyloligopeptidase-Familie [6].

2.3. H-Xaa-Pro-Pyridinium-Methylketon-Derivate als Inhibitoren der DP IV

DP IV (DP IV, E.C: 3.4.14.5) ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das ebenfalls zur Prolyloligopeptidase-Familie gehört. Abweichend von den Eigenschaften der PEP, ist ein freier protonierter N-Terminus in P₂-Position Voraussetzung für die Substraterkennung der DP IV. Alle bisher bekannten Effektoren der PEP sind in ihrer N-terminal deblockierten Form DP IV-Substrate oder -Inhibitoren [1, 6].

Die Beeinflussung der DP IV durch Effektoren kann gegebenenfalls mehrere Signalkaskaden in verschiedenen Geweben gegenläufig modulieren. In der pharmakologischen Forschung ist es daher von zunehmendem Interesse, bestimmte Zielproteine nur im gewünschten Zielgewebe zu beeinflussen, was als Drug targeting bezeichnet wird. Eine zeitlich begrenzte Wirkung der Pharmaka am Zielort kann ein wesentlicher Vorzug zur Vermeidung von unerwünschten Neben- und Langzeitwirkungen sein. Es besteht daher Interesse an DP IV-Inhibitoren mit variabler Stabilität.

2.3.1. Modell für die Optimierung und *in vivo*-Untersuchung von DP IV-Inhibitoren

Da bekannt ist, daß DP IV in verschiedenen Signalkaskaden eine Schlüsselrolle spielt, war im Rahmen der Arbeit zu prüfen, ob sich der Metabolismus des Glukose-abhängigen insulinotropischen Polypeptides (GIP₁₋₄₂) durch DP IV-Inhibierung als Modell für die Optimierung von Inhibitoren eignet.

Das Incretin *gastric inhibitory peptide* (GIP₁₋₄₂, synonyme Bezeichnung: *glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) [50, 264] und das kürzere *glucagon-like peptide-1* (GLP-1₇₋₃₆ und GLP-1₇₋₃₇) sind Hormone der Glucagon-Familie [289] und werden als Folge der Nahrungsaufnahme von Darmzellen ins Blut freigesetzt [103, 263]. Beide Peptide wirken synergistisch zu Glukose auf die Insulinfreisetzung, sind jedoch allein nicht in der Lage, eine Insulinfreisetzung zu bewirken [146]. Die Incretinabgabe ist von der Glukosekonzentration abhängig [94]. In Gegenwart erhöhter zirkulierender Incretinkonzentration wird Insulin abgegeben, wenn es akut benötigt wird (z.B. in Gegenwart von Glukose, Aminosäuren, Fett etc.). Folglich können Incretine nicht selbst die Insulinabgabe stimulieren, dafür aber die Insulinsekretion in Folge von Nahrungsaufnahme verstärken.

Einige Pro-Hormon- und Hormonsequenzen weisen N-terminal ein X-Pro-Dipeptid auf und sind dadurch resistent gegen proteolytische Spaltung durch die meisten Proteasen. Man

glaubt, daß DP IV, u. a. im Serum vorkommend [125], eine wichtige Rolle in der Aktivierung bzw. Inaktivierung dieser biologisch aktiven Polypeptide spielt. Es wurde vermutet, daß N-terminale, DP IV-katalysierte Abspaltung eines Dipeptides von biologisch aktiven Polypeptiden nicht direkt die Inaktivierung zur Folge haben muß, aber diese Hydrolyseprodukte nun für andere Exopeptidasen zugänglich sind [5]. Die gastrointestinalen Hormone GIP und GLP-1 wurden als potentielle DP IV-Substrate untersucht [102, 213]. Durch Pederson et al. konnte gezeigt werden, daß GIP₁₋₄₂ und GLP-1₇₋₃₆ Substrate der im Blut zirkulierenden Exopeptidase Dipeptidylpeptidase IV sind. Die Abspaltung der Dipeptide Tyr-Ala bzw. His-Ala führt zu einer Inaktivierung der Inkretine (GIP₃₋₄₂ und GLP-1₉₋₃₆). Es wird vermutet, daß die DP IV-katalysierte Inkretinhydrolyse diese Hormone deaktiviert und damit der erste Schritt im Metabolismus dieser Polypeptide ist (Abbildung 38) [102].



Abb. 38: N-terminale Polypeptidsequenzen von (a) GIP und (b) GLP-1 mit entsprechender DP IV-Spaltstelle

Es wurde bereits gezeigt, daß kompetitiv wirkende Substrate und spezifische DP IV-Inhibitoren die GIP₁₋₄₂-Hydrolyse *in vitro* unterdrücken können [104]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß durch spezifische DP IV-Inhibitoren *in vivo* die Inaktivierung endogen abgegebener, biologisch aktiver Inkretine beeinflußt werden kann. Es wurde prognostiziert, daß die Inhibierung von DP IV auch nach oraler Gabe des Inhibitors die Verweilzeit der biologisch aktiven Inkretine im Blut verlängert und infolgedessen deren Wirkung auf die Insulinabgabe verstärkt wird.

Es war zu klären, wie sich eine Leitverbindung hinsichtlich Stabilität und Transportierbarkeit im Organismus verhält. Für diese Untersuchungen wurde Isoleucyl-Thiazolidid-Hydrochlorid, ein reversibler Inhibitor der DP IV, synthetisiert (Kapitel 2.1.). Diese Verbindung wurde eingesetzt, um die Effekte einer DP IV-Inhibierung *in vitro* [102, 104] und *in vivo* [52] zu untersuchen. Das Ziel der folgenden Untersuchungen war es, durch orale Gabe von H-Ile-Thiazolidid an Ratten endogene DP IV zu inhibieren und den Effekt dieser Inhibierung auf die Insulinausschüttung und damit einhergehend auf die Senkung des Glukosespiegels im Blut zu ermitteln. Der zeitliche Ablauf dieses Regulationsprinzips soll Aufschluß über die optimale Wirkungszeitspanne der DP IV-Inhibierung im Organismus geben. Diese Ergebnisse sollen im Design neuer Inhibitoren auf der Basis der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone Berücksichtigung finden.

Inhibierung der DP IV-katalysierten Spaltung von GIP₁₋₄₂ *in vitro*

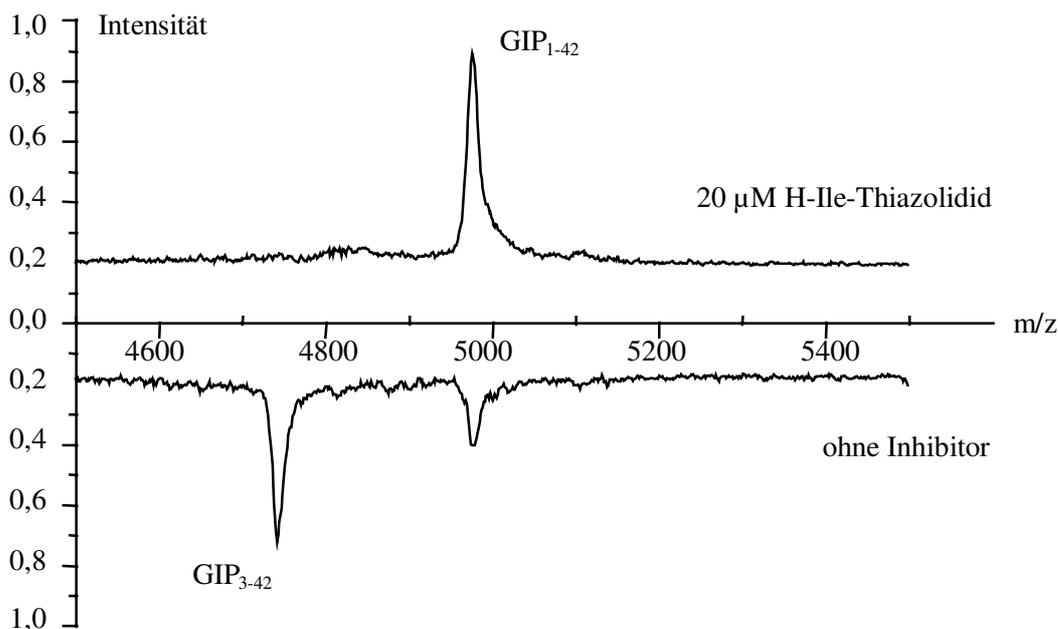


Abb. 39: MALDI-TOF-MS der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GIP₁₋₄₂ und deren Inhibierung durch H-Ile-Thiazolidid

30 µM GIP₁₋₄₂ wurden in 20 % humanem Serum über 24 h inkubiert. Die DP IV-katalysierte Hydrolyse von GIP₁₋₄₂ ergab einen Umsatz von 71,0 % in das Abbauprodukt GIP₃₋₄₂. Diese

Spaltung wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie quantitativ untersucht (Abbildung 39) [104]. In einem Parallelversuch in Gegenwart von 20 μM H-Ile-Thiazolidid wurde kein GIP_{3-42} als Abbauprodukt nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, daß DP IV die Serumprotease ist, die für den Abbau von GIP_{1-42} in das inaktive Polypeptid GIP_{3-42} verantwortlich ist. Dies wurde durch Inhibierung der DP IV durch H-Ile-Thiazolidid belegt. Die Bildung des DP IV-Abbauproduktes konnte über 24 h vollständig unterdrückt werden. Für GLP_{7-36} konnte dies ebenfalls unter gleichen Versuchsbedingungen nachgewiesen werden. Die Hydrolyse der Polypeptide mit gereinigter DP IV führte zum gleichen Resultat.

Inhibierung der DP IV *in vivo* als Folge der oralen Gabe von H-Ile-Thiazolidid

Um den Effekt von DP IV auf die Insulinsekretion an Wistar-Ratten zu untersuchen, wurde die endogene GIP_{1-42} -Sekretion durch orale Gabe von Glukose in An- und Abwesenheit von oral verabreichtem H-Ile-Thiazolidid stimuliert. In definierten Zeitintervallen wurde der Glukosegehalt direkt nach Blutentnahme gemessen und später im Plasma die DP IV-Aktivität und Insulinkonzentration bestimmt.

Die DP IV-Aktivität im Serum wurde zu verschiedenen Zeiten nach Beginn des Glukosetoleranztestes unter Verwendung von H-Gly-Pro-pNA als Substrat (Kapitel 4.2.) photometrisch bestimmt (Abbildung 40).

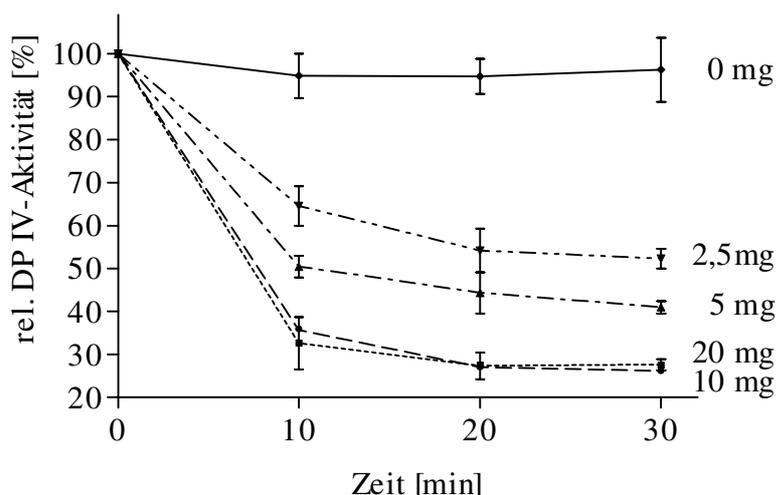


Abb. 40: Plasma DP IV-Aktivität als Folge endogener DP IV-Inhibierung durch orale H-Ile-Thiazolidid-Gabe (2,5 bis 20 mg in 1 ml physiologischer Salzlösung) an Ratten (250 g Körpergewicht) bei gleichzeitiger oraler Glukosegabe (0,75 ml 40 %ige Lösung)

Die orale Gabe von H-Ile-Thiazolidid an Ratten, kombiniert mit Glukose, verringert die Plasma-DP IV-Aktivität auf ca. 25 % (10 und 20 mg Dosis/Ratte) über mindestens 30 min. Die Plasma-DP IV-Aktivität wurde sogar noch nach 90 min auf 31,5 % der ursprünglichen Aktivität bei Gabe von 20 mg Inhibitor pro Ratte reduziert. Mit einer 5 mg-Dosis wurde nach 30 min 39,5 % DP IV-Restaktivität festgestellt. Eine 2,5 mg-Dosis verringerte die DP IV-Aktivität auf bis zu 50 % nach der gleichen Zeit. Die Abhängigkeit der DP IV-Restaktivität von der verabreichten Menge an Inhibitor ist in Abbildung 41 gezeigt. 5 - 10 mg des Inhibitors für eine 250 g schwere Ratte ist eine geeignete Dosis, um DP IV im Blut signifikant zu hemmen. Wird die verabreichte Inhibitormenge von 10 mg weiter auf 20 mg erhöht, stellt man fest, daß die DP IV-Aktivität im Blut dadurch nicht weiter abnimmt. Es wird unabhängig von der Inhibitorosis größer 10 mg eine gleichbleibende Restaktivität im Blutplasma bestimmt. Es tritt eine Sättigung der Inhibierung ein.

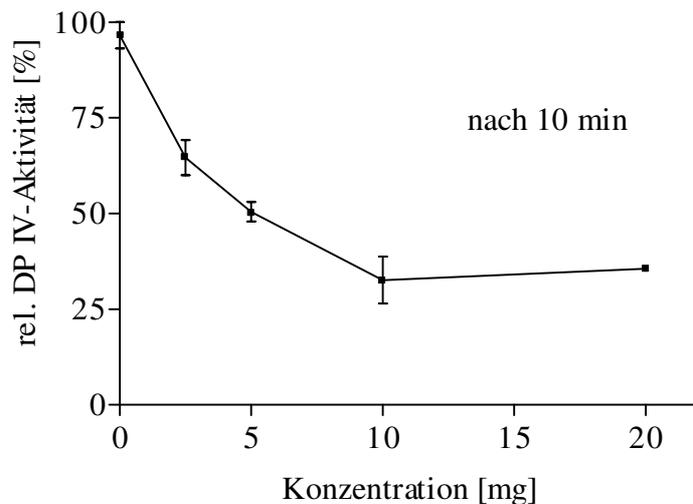


Abb. 41: Abhängigkeit der DP IV-Restaktivität (relative DP IV-Aktivität nach 10 min) von der oral verabreichten Menge an Inhibitor pro Tier (250 g Körpergewicht) in Kombination mit Glukosegabe

Im Vergleich dazu wurde die proportionale Abhängigkeit zwischen Inhibitorkonzentration und humaner Plasma-DP IV-Restaktivität *in vitro* nachgewiesen. Eine vollständige Inhibierung der Plasma-DP IV durch H-Ile-Thiazolidid als Inhibitor ist *in vitro* möglich. Das Ergebnis ist in Abbildung 42 dargestellt.

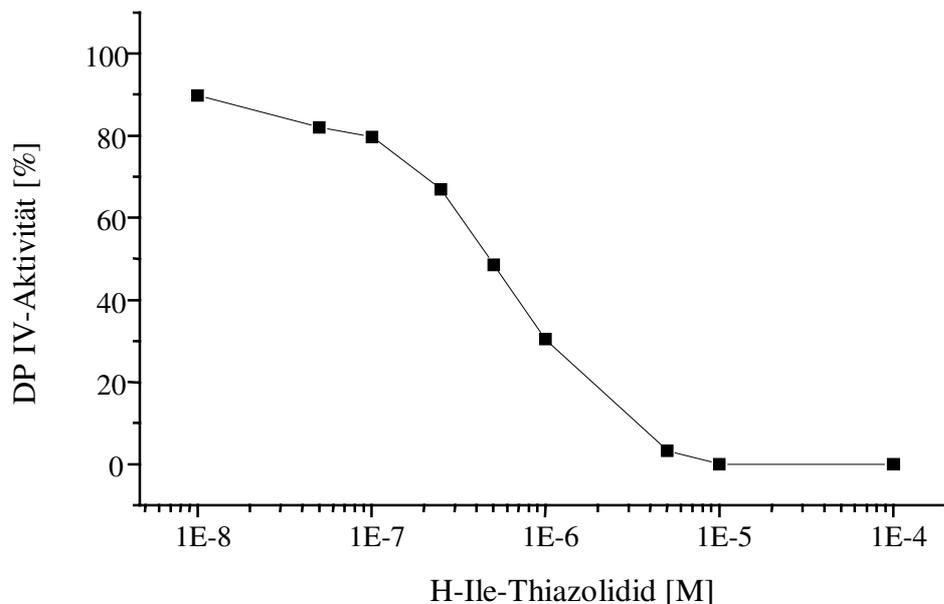


Abb. 42: Inhibierung humaner Plasma-DP IV *in vitro* durch H-Ile-Thiazolidid verschiedener Konzentrationen

Offenbar gibt es zwischen der oral verabreichten H-Ile-Thiazolidid-Dosis und zur Verfügung stehender Inhibitormenge im Blut eine limitierende Barriere. Eine maximale zur Verfügung stehende Transportkapazität durch die Darmwand kann Grund dafür sein, daß nicht die gesamte Inhibitormenge ins Blut resorbiert wird. Um die Frage nach der Transportkapazität zu beantworten, wurde die Inhibitorkonzentration im Blut aus den ermittelten DP IV-Aktivitäten nach der Geschwindigkeitsgleichung einer kompetitiven Hemmung berechnet und gegen die Zeit nach der oralen Gabe des Inhibitors aufgetragen (Abbildung 43). Die berechneten Konzentrationen im Blut nähern sich nach 20 min einem Maximalwert. Der Verlauf der Kurve läßt eine Carrier-vermittelte Diffusion oder einen aktiven Transport vermuten.

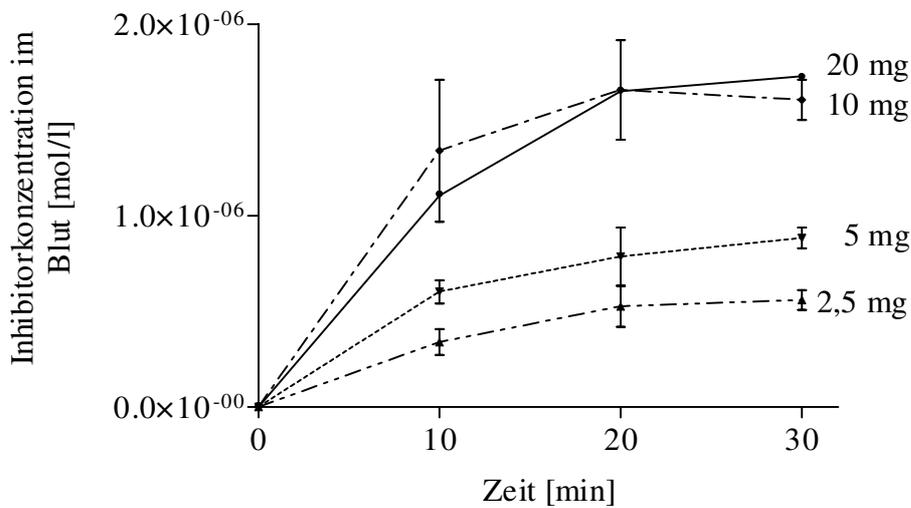


Abb. 43: Berechnete Inhibitorkonzentration im Rattenblut in Abhängigkeit der oralen Dosis/Tier (250 g Körpergewicht) und der Zeit

Wichtig für die Einschätzung der Ergebnisse der DP IV-Aktivitätsbestimmung ist die Tatsache, daß zum einen die eingesetzte Plasmamenge 1 : 10 in der Küvette verdünnt wurde und zum anderen eine Konkurrenz zum verwendeten Testsubstrat um das Enzym vorliegt. Die Verdünnung der Plasmaproben hat zur Folge, daß im Assay nur 1/10 der im Blut vorliegenden Inhibitorkonzentration zur Verfügung steht. Da H-Ile-Thiazolidid ein reversibler Inhibitor der DP IV ist, ist die Restaktivität im Blutplasma geringer als im Assay bestimmt wurde. Die um den Verdünnungseffekt korrigierte Restaktivität im Plasma als Folge endogener DP IV-Inhibierung durch H-Ile-Thiazolidid ist in Abbildung 44 dargestellt. Die maximale Inhibitormenge, die ins Blut transportiert werden kann, verursacht eine Hemmung der DP IV auf 3 % ihrer ursprünglichen Aktivität. Daraus ist ersichtlich, daß es zwar, wie gezeigt, eine begrenzte, maximale ins Blut transportierte Inhibitormenge gibt, diese jedoch zur vollständigen Inhibierung der DP IV im Blut der Ratten ausreicht.

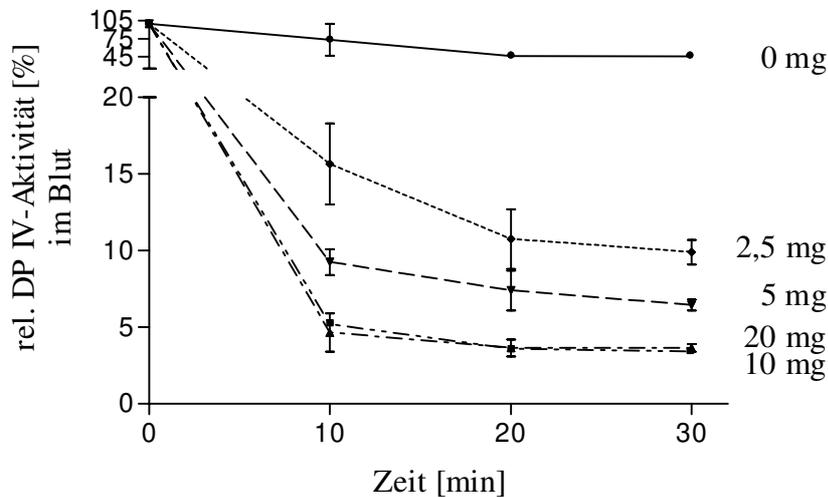


Abb. 44: Plasma-DP IV-Aktivität als Folge endogener DP IV-Inhibierung durch orale H-Ile-Thiazolidid-Gabe (Dosis/250 g Körpergewicht) unter Berücksichtigung des Verdünnungseffektes im Assay

Bestimmung der Insulinkonzentration im Blutplasma von Ratten nach oraler Glukosegabe und DP IV-Inhibitorgabe

Die Insulinkonzentration im Plasma wurde mit einem Radioimmunoassay (Kapitel 4.3.) bestimmt. In Tieren, denen ausschließlich Glukose und kein H-Ile-Thiazolidid verabreicht wurde, betrug die höchste Plasma-Insulinkonzentration nach 60 min 61 $\mu\text{U/ml}$. Tiere, denen oral Inhibitor und Glukose gegeben wurde, zeigten eine ähnliche Plasma-Insulin-Konzentration von 55 $\mu\text{U/ml}$. Dieser Maximalwert stellte sich jedoch schon nach 45 min ein. Ursache für das schnellere Erreichen des Insulinmaximums ist der verlangsamte Inkretinabbau durch DP IV und damit eine stimuliertere Insulinabgabe zu einem früheren Zeitpunkt. Der schnellere Anstieg der Insulin-Konzentration in Inhibitor-behandelten Ratten ermöglicht eine schnellere Senkung des Blut-Glukose-Spiegels nach der oralen Aufnahme von Glukose.

Bestimmung der Glukosekonzentration im Rattenblut nach oraler Glukosegabe und DP IV-Inhibitorgabe

Verfolgt man den Glukosespiegel in den Kontrolltieren, so beobachtet man einen steilen Anstieg in den ersten 20 Minuten, wonach dieser Wert auch weiterhin auf hohem Niveau verharrt (60 min) (Abbildung 45). In den mit H-Ile-Thiazolidid behandelten Ratten entsteht ein vergleichbarer Verlauf, jedoch sind die Glukosewerte nach 20 und 30 Minuten bei den H-Ile-Thiazolidid-behandelten Ratten deutlich niedriger.

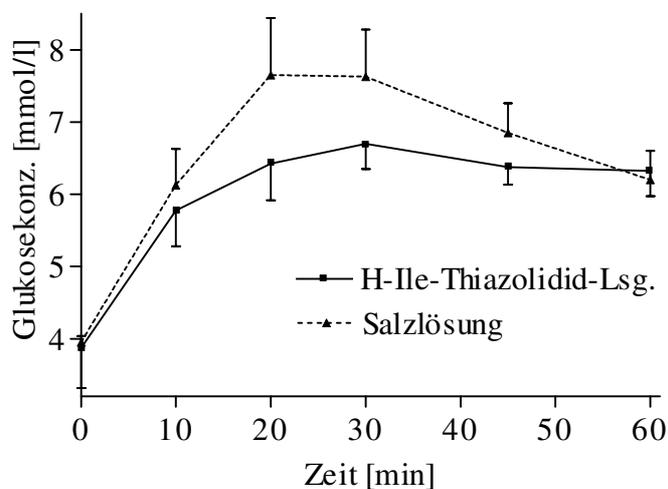


Abb. 45: Effekt der endogenen DP IV-Inhibierung (10 mg H-Ile-Thiazolidid/Ratte mit 250 g Körpergewicht) auf den Blutglukosespiegel in Folge einer Glukosegabe

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Inhibierung der DP IV-Aktivität in Ratten eine schnellere Normalisierung des Glukosespiegels zur Folge hat, welche durch einen von Inkretinen vermittelten Mechanismus gesteuert wird [176]. Dieses Ergebnis konnte auch bei oraler Gabe des Inhibitors bestätigt werden. Die beschriebenen Versuche liefern ein Fundament für die Entwicklung oral zu verabreichender Wirkstoffe, die die Wirkung endogener Inkretine verlängern.

Da DP IV in verschiedenen peptidergen Systemen vorkommt, besteht die Gefahr, daß bei ihrer Hemmung durch exogene Inhibitoren verschiedene Regelkreisläufe beeinflußt werden. Insbesondere sollte eine Beeinflussung des Immunsystems eine Rolle spielen, da bekannt ist,

daß DP IV-Inhibitoren proliferationshemmend auf T-Lymphozyten wirken. Demzufolge wurde nach Möglichkeiten gesucht, die zirkulierende DP IV-Aktivität zwar potent, aber möglichst kurzzeitig zu beeinflussen. Geeignet für den physiologischen Einsatz sollten Inhibitorstrukturen sein, die nach der Freisetzung am Zielort zeitlich definiert ihre Wirkung entfalten und anschließend in physiologisch inaktive Substanzen zerfallen. Die Wirkungsdauer der Inhibitoren auf DP IV im Blut sollte in bezug auf das beschriebene Modell über ca. 1 Stunde gewährleistet sein.

Da bekannt ist, daß N-terminal ungeschützte, C-terminal-aktivierte, prolinhaltige Peptide zur intramolekularen Cyclisierung neigen [178], sollte geprüft werden, ob sich Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Verbindungen in N-terminal ungeschützter Form für eine autokatalytische „Entgiftung“ eignen. Die N-terminal ungeschützten Xaa-Pro-Pyridinium-Methylketon-Verbindungen sind in wässrigem Medium instabil. Die Halbwertszeiten des Zerfalls liegen im Minutenbereich [232]. Für die zeitweise Inhibierung der DP IV und damit für die Unterdrückung der GIP_{1-42} - und GLP_{7-36} -Hydrolyse würde eine Halbwertszeit der Inhibitoren im Bereich von 10 - 20 Minuten ausreichen. Gleichzeitig sollte die Verbindung noch genügend inhibitorische Potenz gegenüber DP IV entfalten, da durch eine mögliche Transportlimitierung nicht beliebig viel Inhibitor ins Blut gelangen kann.

Dementsprechend wurden Modellsubstanzen dargestellt und deren Stabilität in wässriger Lösung sowie enzymologische Eigenschaften untersucht.

2.3.2. Charakterisierung des nichtenzymatischen Zerfalls von H-Xaa-Pro-Pyridinium-Methylketon-Derivaten

Charakteristisch für alle bisher untersuchten DP IV-Inhibitoren, insbesondere am C-Terminus der P₁-Aminosäure aktivierte Substanzen (z. B. Chlormethylketone), ist ihr instabiles Verhalten. Für den Zerfall von Peptidylchlormethylketonen wurde von Demuth der in Abbildung 46 dargestellte Mechanismus diskutiert [178]. Es kommt zur intramolekularen Cyclisierung.

Wie aus der Literatur bereits bekannt ist, bilden N-terminal ungeschützte Dipeptidyl-Methylketone unter intramolekularer Wasserabspaltung Dihydropyrazine, die sich durch Autoxidation zu Pyrazin-Derivaten weiter umsetzen (Abbildung 46) [180].

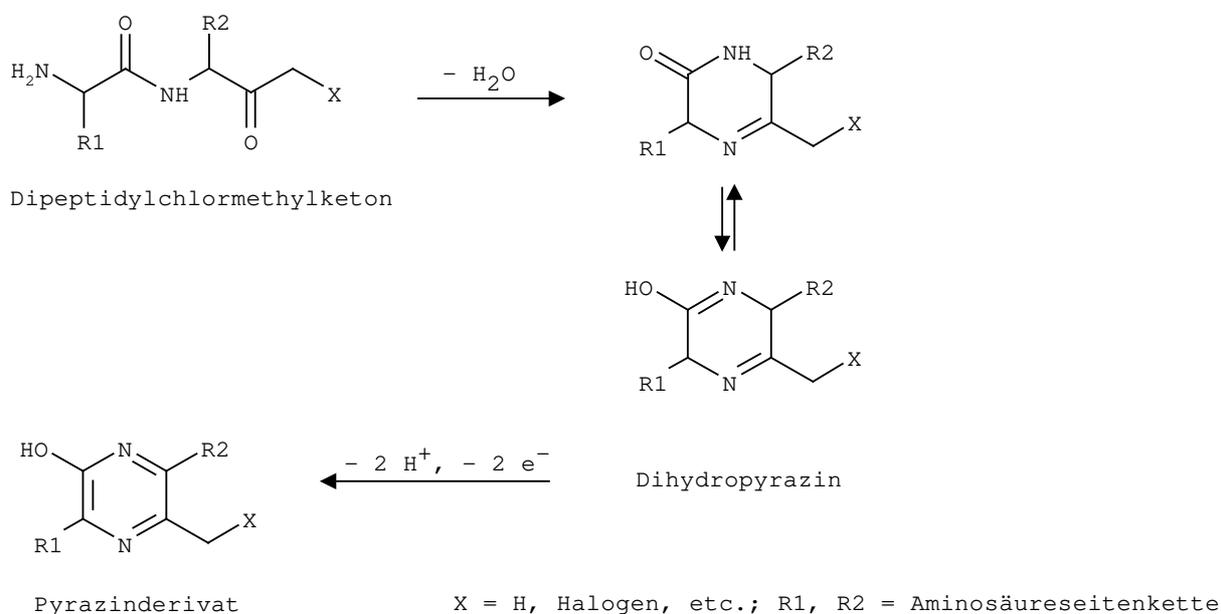


Abb. 46: Schema des Zerfallsmechanismus für N-terminal ungeschützte Chlormethylketone [178] bzw. Methylketone [180]

N-terminal ungeschützte Dipeptid-Derivate neigen ebenfalls, unabhängig von ihrer Sequenz, zur Diketopiperazinbildung [296, 297].

Eine Ausnahme bezüglich der Stabilität in wässriger Lösung stellen die als Substrate der DP IV bekannten Diacylhydroxylamine [228] und die als Inhibitoren der DP IV eingesetzten Boronsäurederivate dar, die eine deutlich höhere Stabilität aufweisen.

Für die Inhibierung der PEP-katalysierten Hydrolyse von prolinhaltigen Substraten wurden die bisher beschriebenen, verschieden substituierten und N-terminal Z-geschützten

Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone untersucht. Bis auf wenige Ausnahmen sind diese Verbindungen stabil. Wie bereits gezeigt wurde, handelt es sich bei den Ausnahmen um Verbindungen mit einer Methylesterfunktion als Substituent am Pyridinring (Kapitel 2.2.1.).

N-terminal ungeschützte Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone sind als potentielle DP IV-Inhibitoren geeignet, da sie eine für DP IV nicht spaltbare $-CO-CH_2-$ Bindung enthalten. Es sollte nun untersucht werden, wie sich diese N-terminal ungeschützten Verbindungen in wässriger Lösung verhalten.

Für diese Untersuchungen der Stabilität von N-terminal ungeschützten Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivaten wurden N-(H-Phe-Pro- CH_2 -)Nicotinsäure und N-(H-Val-Pro- CH_2 -)Nicotinsäure bzw. H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon und H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon synthetisiert. Massenspektrometrisch und spektralphotometrisch konnte die Zerfallsreaktion der N-terminal ungeschützten Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivate verfolgt werden. Das Endprodukt wurde isoliert und charakterisiert.

Der Zerfall von N-(H-Phe-Pro- CH_2 -)Nicotinsäure und N-(H-Val-Pro- CH_2 -)Nicotinsäure wurde in Tris-Puffer (pH = 7,6) mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie qualitativ verfolgt. Die abhängig von der Inkubationszeit auftretenden Produkte mit der Masse 239 Da (Abbildung 47) bzw. 191 Da (Abbildung 48) entsprechen den jeweiligen cyclischen Endprodukten.

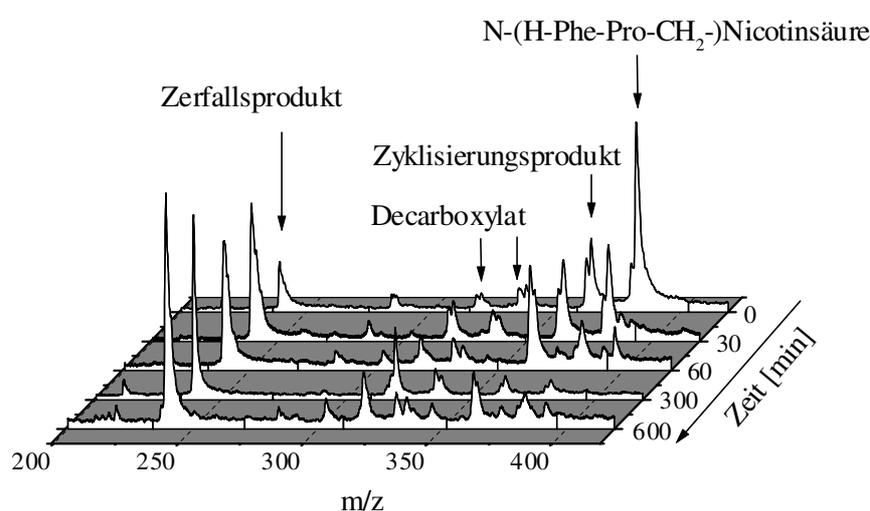


Abb. 47: Massenspektren des nichtenzymatischen Zerfalls von N-(H-Phe-Pro- CH_2 -)Nicotinsäure in wässriger Pufferlösung (pH = 7,6) bei 30 °C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

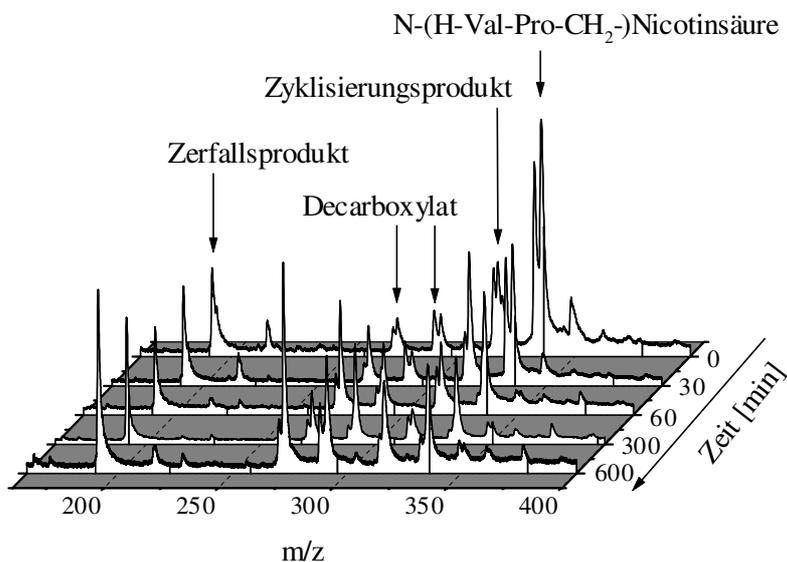


Abb. 48: Massenspektren des nichtenzymatischen Zerfalls von N-(H-Val-Pro-CH₂-)Nicotinsäure in wässriger Pufferlösung (pH = 7,6) bei 30 °C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Während des Zerfalls sind die Intermediate in den Massenspektren detektierbar, die für eine Cyclisierung der Verbindung unter Wasserabspaltung (-18 Da), gefolgt von einer Eliminierung von Wasserstoff und Pyridin (-2 Da und -79 Da), sprechen. Dieser Zerfall wird zusätzlich von einer Decarboxylierung (-44 Da) überlagert. Die Abbildungen 47 und 48 zeigen die Massenspektren in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Der nichtenzymatische Zerfall von N-(H-Phe-Pro-CH₂-)Nicotinsäure und N-(H-Val-Pro-CH₂-)Nicotinsäure in HEPES-Pufferlösung (pH = 7,6) bei 30 °C lief mit einer Halbwertszeit von ca. 5 - 10 Minuten ab. Eine genaue Quantifizierung des Zerfalls war aufgrund der Heterogenität der Reaktionsfolge nicht möglich. Die Folgereaktion der Cyclisierung mit anschließender Abspaltung des Pyridinringes wurde von der Decarboxylierung überlagert. Die von Steinmetzer [212] an Peptidylchloromethylketonen hinsichtlich der auftretenden Produkte angewandte Methode, die durch die Zunahme der UV-Absorption homogene zeitabhängige Spektren ergaben, war auf N-(H-Phe-Pro-CH₂-)Nicotinsäure und N-(H-Val-Pro-CH₂-)Nicotinsäure nicht übertragbar, da die zeitlich parallel verlaufende Decarboxylierung keine homogenen Spektren lieferte.

Um den nichtenzymatischen Zerfall N-terminal ungeschützter Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone in Pufferlösung eindeutig zu untersuchen, wurden demzufolge H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon und H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon synthetisiert. Bei diesen Verbindungen ist der die Quantifizierung störende Verlust eines Substituenten am Pyridinring ausgeschlossen.

Untersuchungen mittels MALDI-TOF-MS ergaben für H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon und H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon die in Abbildung 49 und 50 gezeigten, in zeitlicher Abfolge aufgelisteten Spektren. Es wurden stabile Abbauprodukte mit der Masse 239 Da (Abbildung 49) bzw. 191 Da (Abbildung 50) detektiert. Es konnte qualitativ für beide Substanzen die Cyclisierung (-18 Da für H₂O) und die Abspaltung von Fragmenten einer Masse von 2 Da und 79 Da (H₂, Pyridin) bestätigt werden. Die Reihenfolge der beiden Abspaltungen konnte aus den Massenspektren nicht eindeutig ermittelt werden.

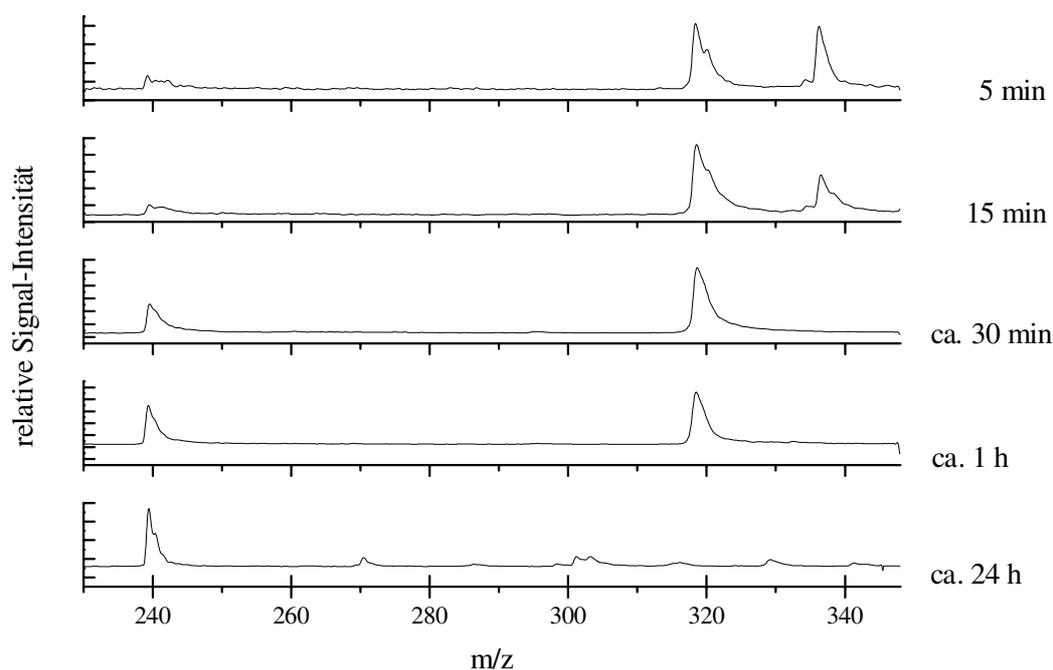


Abb. 49: MALDI-TOF-MS des nichtenzymatischen Zerfalls von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon in wässriger Pufferlösung (pH = 7,6) bei 30 °C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

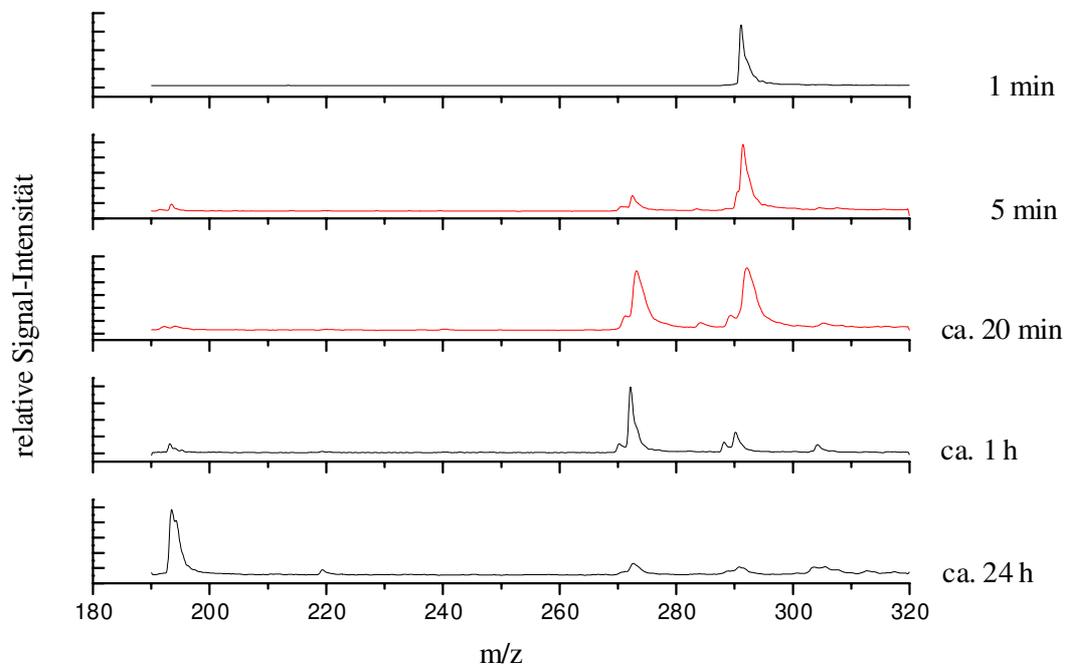


Abb. 50: MALDI-TOF-MS des nichtenzymatischen Zerfalls von H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon in wässriger Pufferlösung (pH = 7,6) bei 30 °C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Um über die Charakterisierung eines Endproduktes den Zerfall zu belegen, wurde N-(H-Phe-Pro-CH₂-)Nicotinsäure mit einer 25 %igen Ammoniumhydroxidlösung inkubiert und das Abbauprodukt isoliert. Das Endprodukt des nichtenzymatischen Zerfalls konnte mit Hilfe der NMR-Analyse charakterisiert werden (Abbildung 51). Die Massenspektren des Zerfalls und die NMR-spektroskopische Charakterisierung des Endproduktes belegen den in den Abbildungen 52 bis 54 dargestellten Mechanismus.

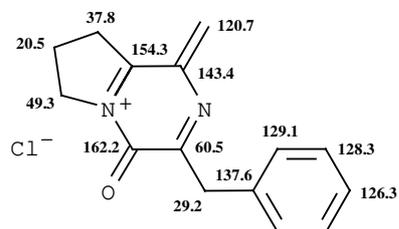
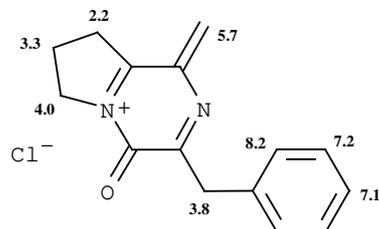
^{13}C -NMR-Daten [ppm] ^1H -NMR-Daten [ppm]

Abb. 51: Strukturformeln des Endproduktes des nichtenzymatischen Zerfalls von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon mit ^{13}C -NMR- und ^1H -NMR-Daten (in ppm), den entsprechenden Atomen zugeordnet

Abweichend von den von Demuth, Fittkau bzw. Prasad [178, 180, 296, 297] (Seite 76) für verschiedene kurze Peptide vorgeschlagenen Cyclisierungsreaktionen sollte ein Abbau über die Dihydropyrazine im Fall der Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketon-Verbindungen mit Prolin in P_1 -Position nicht möglich sein, da hier eine Keto-Enol-Tautomerie, wie in Abbildung 46 gezeigt, nicht möglich ist. Ein dreifach ungesättigtes aromatisches Ringsystem kann folglich nicht ausgebildet werden. Für die Substanzklasse der Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone mit Prolin in P_1 -Position ist aus den bereits beschriebenen Untersuchungsergebnissen der folgende Mechanismus des nichtenzymatischen Zerfalls in wässriger Pufferlösung zu postulieren:

Im ersten Schritt kommt es zu einem nucleophilen Angriff des freien N-Terminus an der Carbonylgruppe des Prolins. Während der Cyclisierung wird ein Wassermolekül abgespalten (-18 Da). Für die dabei gebildete Doppelbindung gibt es drei mögliche Positionen im Molekül (Abbildung 52).

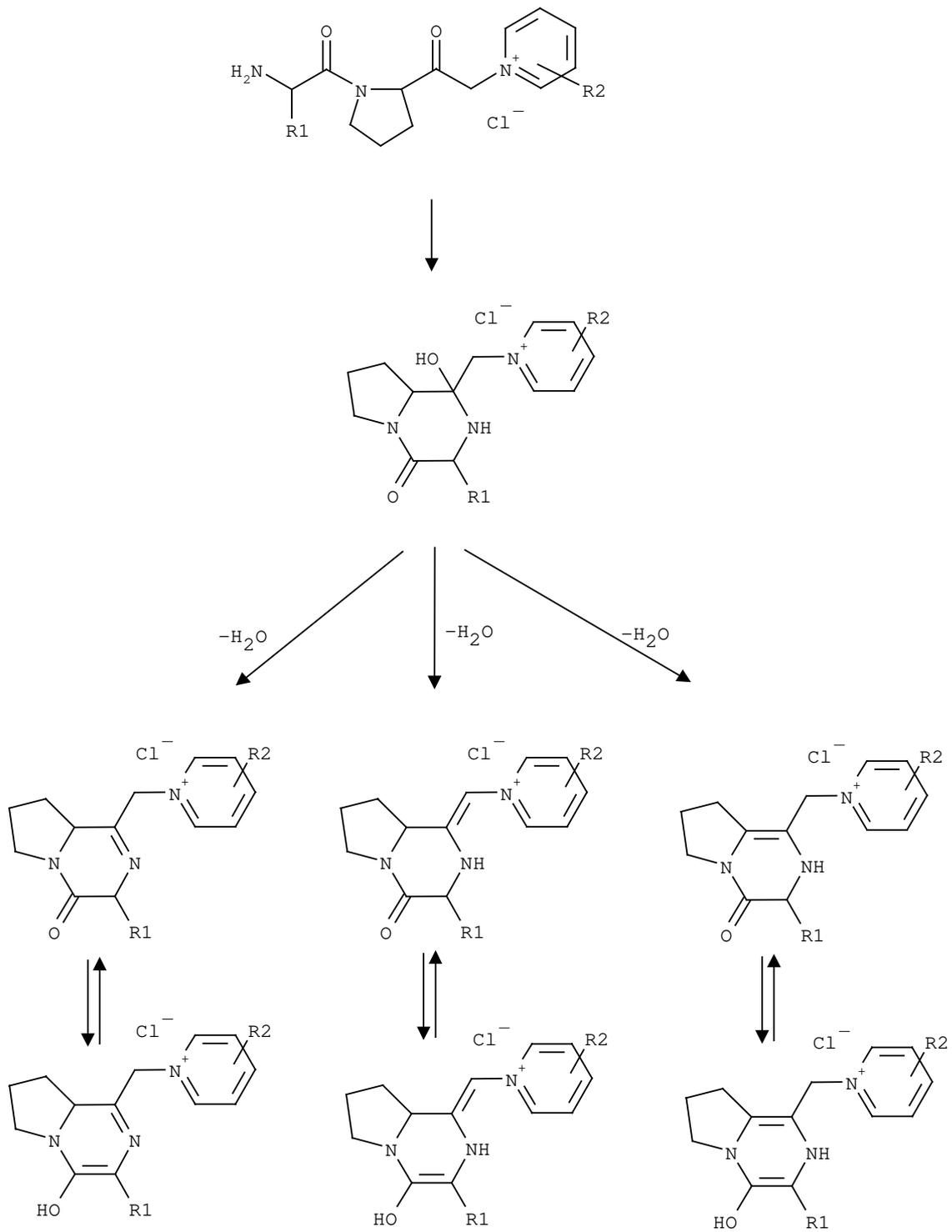


Abb. 52: Schema des Zerfallsmechanismus (Cyclisierung) für N-terminal ungeschützte Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone mit Prolin in P₁-Position, R1 = Aminosäureseitenkette, R2 = H oder COOH

Bei zwei dieser Kondensationsprodukte kann es über eine Keto-Enol-Tautomerie zu einer H₂-Eliminierung kommen. Triebkraft für diese Reaktion ist die Bildung konjugierter Doppelbindungen.

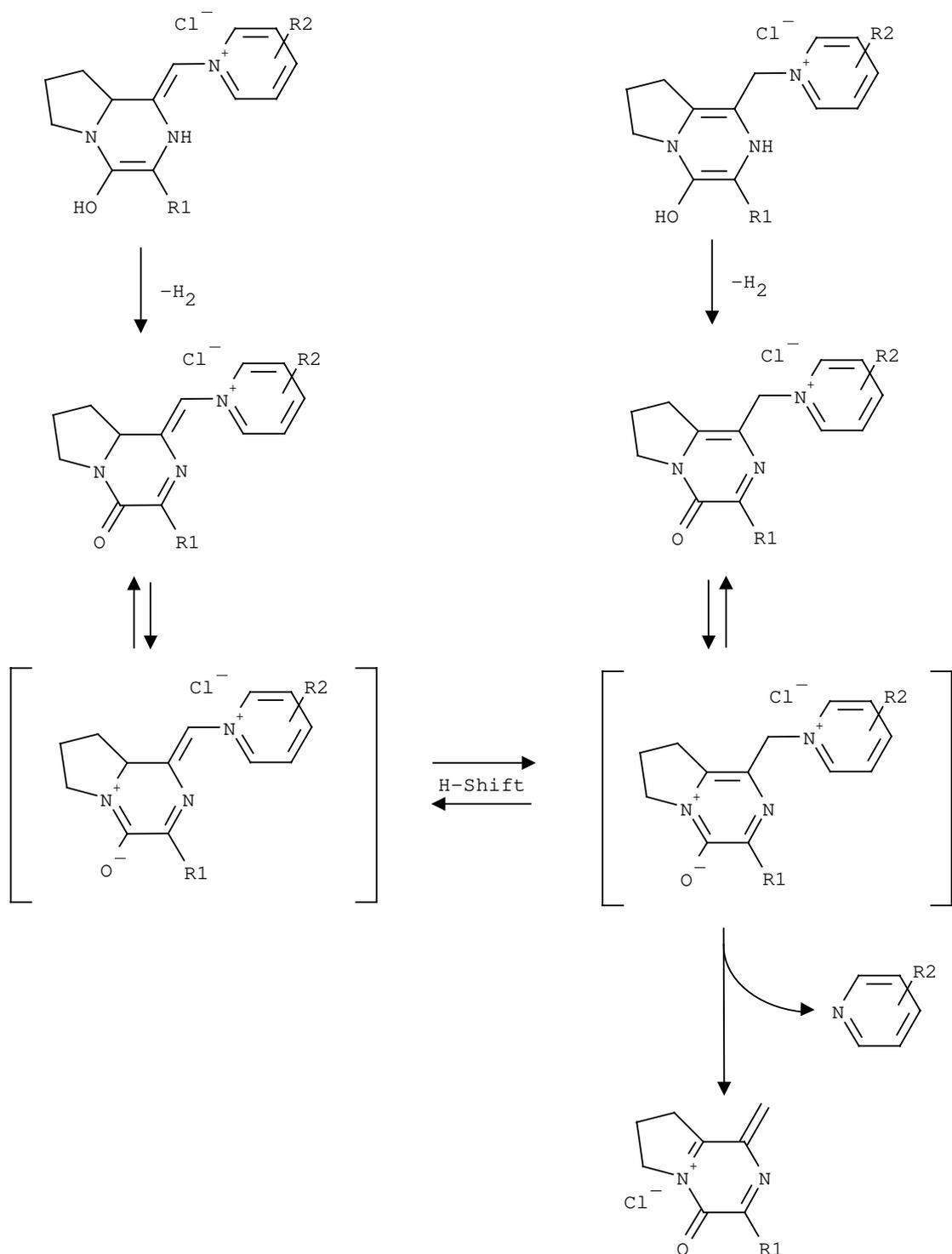


Abb. 53: Schema des Zerfallsmechanismus (Eliminierung) für N-terminal ungeschützte Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone mit Prolin in P₁-Position, R1 = Aminosäureseitenkette, R2 = H oder COOH

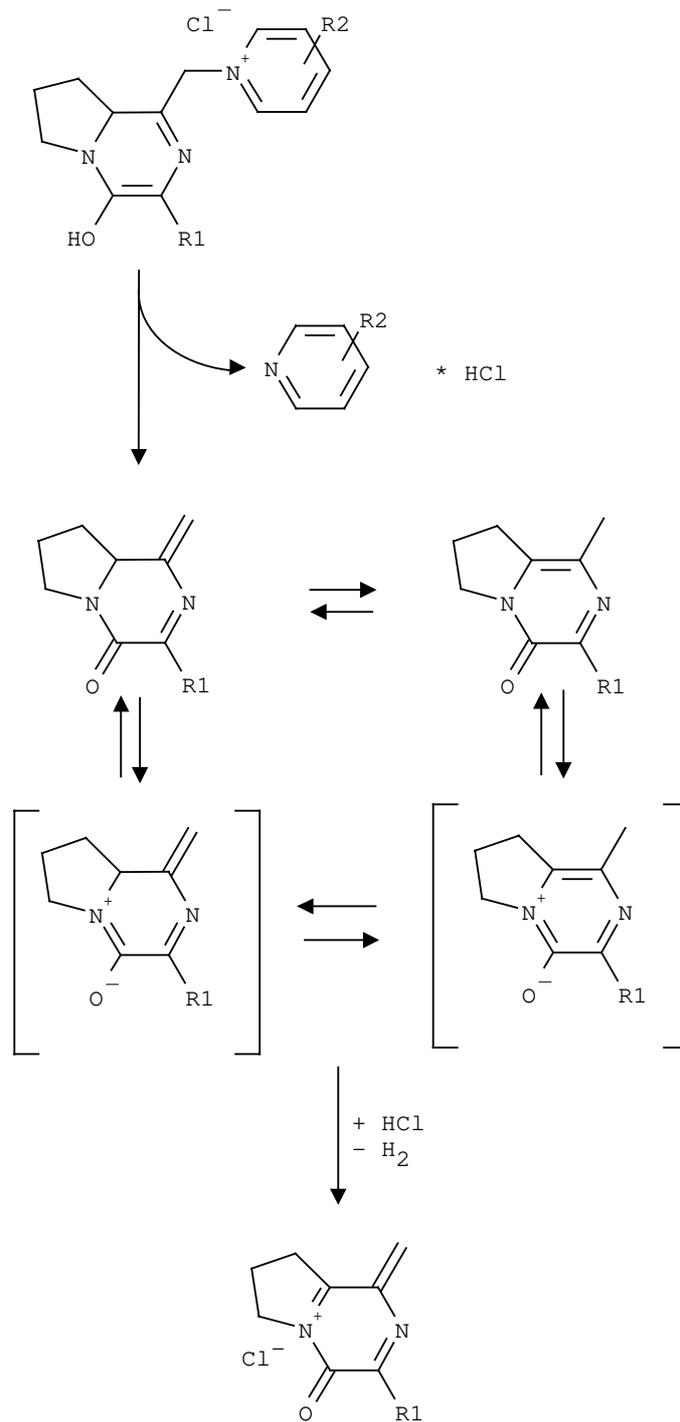


Abb. 54: Schema des Zerfallsmechanismus (Eliminierung) für N-terminal ungeschützte Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone mit Prolin in P₁-Position, R₁ = Aminosäureseitenkette, R₂ = H oder COOH

Die mittels MALDI-TOF-MS ermittelte Massendifferenz von 79 Da deutet auf den Verlust des Pyridinringes hin. Die Abspaltung von Pyridin verläuft wahrscheinlich unter Mitnahme beider Bindungselektronen. Triebkraft der Eliminierung ist die Auflösung der Enolatstruktur an der ursprünglichen P₁-Aminosäure. Die positive Ladung des Stickstoffs im Prolinring wird von einem Chloridion abgesättigt. Es entsteht ein organisches Salz.

Das postulierte dritte Cyclisierungsprodukt (Abbildung 54) konnte nicht isoliert werden. Ausschließlich im Massenspektrometer wurde eine über längere Zeit vorhandene Verbindung mit entsprechender Molmasse detektiert. Vermutlich erfolgt auch hier durch einen Redoxprozeß die Eliminierung von Wasserstoff ($- 2 \text{ H}^+$, $- 2 \text{ e}^-$) und es entsteht das bereits bekannte Abbauprodukt (Abbildung 51, Seite 81).

Der nichtenzymatische Zerfall von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon und H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon in wässriger Lösung wurde spektralphotometrisch untersucht.

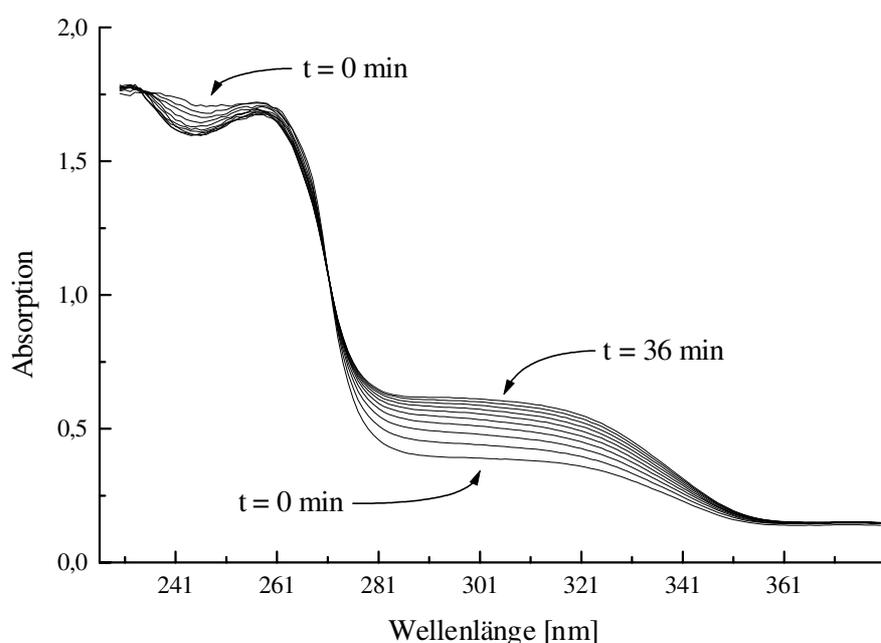


Abb. 55: UV-Spektren des nichtenzymatischen Zerfalls von 0,37 mg H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon, inkubiert in 2 ml HEPES-Pufferlösung (pH = 7,6) bei 30 °C, 10 Messungen innerhalb von 40 min

Die Verbindungen wurden bei 30 °C in einer Standard-Pufferlösung inkubiert. Nach definierten Zeitintervallen wurden die UV-Absorptionsspektren der inkubierten Verbindungen aufgenommen. Am Beispiel von N-(H-Phe-Pro-CH₂-)Nicotinsäure ist in Abbildung 55 die Abfolge der UV-Spektren der in Puffer inkubierten Verbindung in

Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Es wird deutlich, daß es sich um eine homogene Zerfallsreaktion handelt. Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls bei Inkubation von N-(H-Val-Pro-CH₂-)Nicotinsäure in wässriger Pufferlösung (pH = 7,6).

Die Spektren weisen charakteristische Bereiche auf. Im Bereich zwischen 230 und 270 nm nimmt die Extinktion mit der Zeit ab. Im Bereich zwischen 270 und 360 nm nimmt sie zu. Das isolierte Endprodukt weist bei 315 nm ein Maximum auf. Die Extinktionszunahme in diesem Bereich ist auf die veränderten Elektronenübergänge aus besetzten bindenden σ - oder π -Orbitalen bzw. nichtbindenden n -Orbitalen (einsame Elektronenpaare) in die leeren, antibindenden π^* - oder σ^* -Orbitale des intramolekularen Kondensationsproduktes als Intermediat und des entstehenden Endproduktes (3-Benzyl-1-methylen-4-oxo-6H,7H,8H-azolo[1,2-a]pyrazin-5-ium) (Seite 81, Abbildung 51) zurückzuführen. Das Extinktions-Wellenlängen-Diagramm weist bei 270 nm (H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon und H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon) und 335 nm (H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon) bzw. 360 nm (H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon) je einen isosbestischen Punkt auf. Das Auftreten von zwei isosbestischen Punkten ist eine hinreichende Bedingung für einen homogenen Reaktionsverlauf. Damit ist im Gegensatz zu den inhomogenen Zerfallsreaktionen von N-(H-Phe-Pro-CH₂-)Nicotinsäure und N-(H-Val-Pro-CH₂-)Nicotinsäure eine Quantifizierung des Reaktionsverlaufes mittels UV- Spektroskopie möglich.

Die quantitative Auswertung der Meßergebnisse der UV-spektroskopisch beobachteten Zerfallsreaktion nach einer Reaktion pseudo-erster-Ordnung ergibt unter der Annahme, daß die intramolekulare Kondensation im Zerfallsprozeß geschwindigkeitsbestimmend ist, für den nichtenzymatischen Zerfall von H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon in wässriger Lösung eine Geschwindigkeitskonstante von $8,7 \cdot 10^{-4} (\pm 4,0 \cdot 10^{-5}) \text{ min}^{-1}$ und für H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon eine Konstante von $1,2 \cdot 10^{-3} (\pm 3,9 \cdot 10^{-5}) \text{ min}^{-1}$. Das entspricht einer Halbwertszeit von 13,3 min (H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon) bzw. 9,6 min (H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon). Die Pyridinium-Methylketone sind damit in wässriger Lösung etwas stabiler als N-terminal ungeschützte Dipeptidylchlormethylketone, für deren nichtenzymatischen Zerfall von Demuth unter analogen Bedingungen Halbwertszeiten unter 6 Minuten bestimmt wurden [178].

2.3.3. Wechselwirkungen von Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen mit DP IV

Nachdem der nichtenzymatische Zerfall von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon und H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon qualitativ und quantitativ analysiert wurde, versuchten wir, quantitativ die Wechselwirkung zwischen DP IV und dem genannten Inhibitor zu charakterisieren.

Zu berücksichtigen ist die bereits untersuchte Stabilität der Verbindungen. Inkubiert man das Substrat H-Gly-Pro-pNA mit Inhibitor (H-Xaa-Pro-Pyridinium-Methylketon) in Pufferlösung (pH = 7,6) und startet die DP IV-katalysierte Hydrolyse des Testsubstrates durch Zugabe des Enzyms, so stellt man fest, daß sowohl H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon als auch H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon das Enzym über mindestens 100 min signifikant inhibieren. Der beobachtete Aktivitätsverlauf zeigt keine einfache Beziehung.

Eine Quantifizierung der Teilreaktionsschritte mit Hilfe der Aktivitätsänderung durchzuführen ist kompliziert, da im Verlauf der Gesamtreaktion mehrere Reaktionen stattfinden.

1. Nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor führen zu einer Verringerung der DP IV-Aktivität.
2. Kovalente Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor führen zu einer Verringerung der DP IV-Aktivität.
3. Der nichtenzymatische Zerfall des Inhibitors in eine inaktive Form führt zur Reaktivierung des Enzyms.

Die Progresskurven der durch H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon und H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon inhibierten Katalyse sind in den Abbildungen 56 und 57 dargestellt. Um vergleichbare kinetische Parameter zu gewinnen, wurde die Auswertung der Progresskurve auf den K_i -Wert für die initiale steady-state-Phase und K_i^* -Wert für den steady-state-Bereich nach einem slow-binding entsprechend durchgeführt (Kapitel 4.1.). Allerdings sind diese K_i - bzw. K_i^* -Werte nur als Näherungswerte zu betrachten, da der nichtenzymatische Zerfall des Inhibitors in der Pufferlösung die Inhibitorkonzentration ständig verringert.

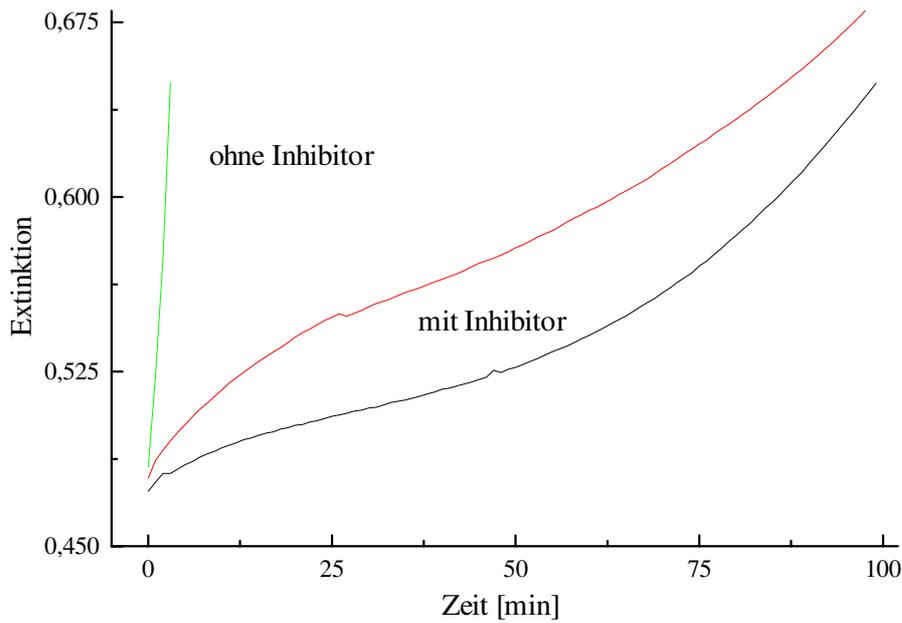


Abb. 56: Progresskurven der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA in Gegenwart von H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon $2,8 \cdot 10^{-3}$ M, DP IV 0,06 mg/ml, 1,9 U/ml, H-Gly-Pro-*p*NA $4 \cdot 10^{-4}$ M im Ansatz, HEPES-Puffer (pH = 7,6)

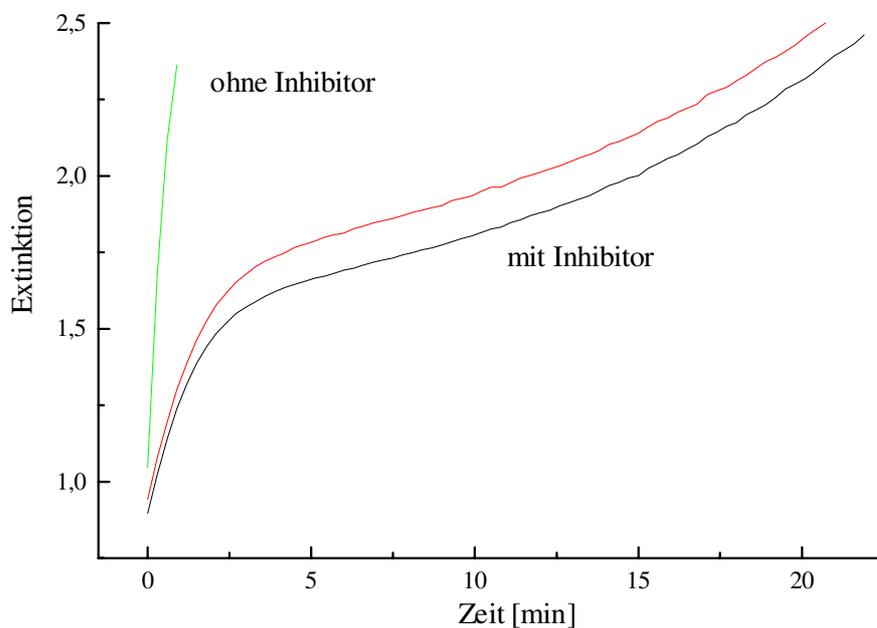


Abb. 57: Progresskurven der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA in Gegenwart von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon $2,1 \cdot 10^{-4}$ M, DP IV 0,6 mg/ml, 19 U/ml, H-Gly-Pro-*p*NA $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l im Ansatz, HEPES-Puffer (pH = 7,6)

Die Progresskurven der durch H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon und H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon inhibierten DP IV-katalysierten Hydrolyse eines chromogenen Substrates zeigen in ihrem zeitlichen Verlauf initial einen steilen Anstieg, der nach 5 min Reaktionszeit abflacht. Dieser Übergang ist auf das charakteristische slow-binding Verhalten des Inhibitors zurückzuführen. Geht man davon aus, daß die Halbwertszeit der nichtenzymatischen Zerfallsreaktion des Inhibitors 9,6 bzw. 13,3 Minuten beträgt, sollte der Zerfall des Inhibitors sich deutlich auf eine Veränderung der steady-state-Geschwindigkeit auswirken. Abnehmende Inhibitormenge, und damit einhergehend die Zunahme der DP IV-Aktivität, hat einen höheren *p*NA-Substratumsatz zur Folge. Dieser für die Inaktivierung des Inhibitors typische Kurvenverlauf zeigt sich bei Reaktion von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon mit DP IV zu einem früheren Zeitpunkt als bei Reaktion von H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon mit DP IV (Abbildungen 56 und 57).

Für die Inhibierung der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA durch H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon wurde für die initiale steady-state-Phase ein K_i -Wert von $1,7 \cdot 10^{-6} (\pm 1,6 \cdot 10^{-6})$ M bestimmt. Für H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon wurde entsprechend ein K_i -Wert von $4,3 \cdot 10^{-6} (\pm 3,4 \cdot 10^{-7})$ M ermittelt. Wertet man die Progresskurve im Zeitintervall zwischen 10 und 20 Minuten für H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon unter Berücksichtigung einer Halbwertszeit aus, ergibt sich ein K_i^* -Wert von $1,0 \cdot 10^{-7} (\pm 3,7 \cdot 10^{-8})$ M.

Aus diesen kinetischen Untersuchungen wird ersichtlich, daß Verbindungen der Substanzklasse der Pyridinium-Methylketone in N-terminal ungeschützter Form DP IV in signifikanter Weise hemmen.

Es ist bekannt, daß im Gegensatz zu prolinhaltigen Dipeptid-Derivaten, die zur Diketopiperazinbildung neigen, Tri-, Tetra- und längere Peptide dagegen nicht intramolekular cyclisieren. Basierend auf dieser hydrolytischen Stabilität von N-terminal ungeschützten Tetrapeptiden soll nun eine neue Variante der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone eingeführt werden.

Die bisher verwendete Verbindung H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon wird um zwei Aminosäuren N-terminal verlängert. Ein essentielles Substrat-Erkennungsmerkmal ist bekannterweise der freie N-Terminus der P_2 -Aminosäure. Die Einführung einer Aminosäure am N-Terminus würde analog einer Schutzgruppe die Erkennung der Verbindung durch DP IV verhindern. Fügt man jedoch H-Xaa-Pro- als N-terminale Verlängerung an, so wird beispielsweise in H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon der DP IV eine weitere

Spaltstelle offeriert. Das Erkennungsmerkmal eines freien N-Terminus an der P₂-Aminosäure für DP IV-Substrate ist für die zusätzliche Spaltstelle der Verbindung gegeben.

H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon sollte in wässriger Lösung deutlich stabiler sein als Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone mit freiem N-Terminus. Ein cyclisches Produkt, analog der beim Zerfall von H-Xaa-Pro-Pyridinium-Methylketonen beschriebenen cyclischen Verbindung, wurde beim Tetrapeptidyl-Pyridinium-Methylketon nicht beobachtet. Das verwendete H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon ist in wässriger Lösung über 24 Stunden stabil.

Physiologisch interessant an H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon ist, daß die Verbindung für DP IV nicht Inhibitor, sondern zunächst Substrat ist. Als Spaltprodukte entstehen jedoch zwei Inhibitoren der DP IV. Das enzymatische DP IV-Hydrolyseprodukt H-Gly-Pro-OH besitzt einen vernachlässigbaren K_i-Wert von $1,6 \cdot 10^{-3}$ M. Der zweite entstehende Inhibitor ist das bereits untersuchte H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon. DP IV setzt also aus H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon seinen eigenen Inhibitor frei. Dieser Inhibitor hemmt die DP IV für eine begrenzte Zeit, da die Verbindung in wässriger Pufferlösung, wie bereits gezeigt, instabil ist. Es entsteht eine die DP IV nicht hemmende Verbindung. Die kinetische Auswertung von Meßdaten des Tetrapeptidyl-Pyridinium-Methylketons gestaltet sich sehr kompliziert. Folgende Einzelreaktionen finden gleichzeitig oder nacheinander statt und beeinflussen sich im DP IV-Assay gegenseitig.

1. Das Enzym hydrolysiert das Substrat H-Gly-Pro-*p*NA. Es bildet sich ein intermediärer Enzym-Substrat-Komplex.
2. Das Enzym hydrolysiert H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon zu H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon und H-Gly-Pro-OH.
3. H-Gly-Pro-OH inhibiert das Enzym reversibel (vernachlässigbar).
4. H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon inhibiert das Enzym nach einem slow-binding Mechanismus.
5. H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon zerfällt, wie bereits postuliert, in eine cyclische Verbindung und Pyridin. Diese Zerfallsprodukte beeinflussen das Enzym nicht in seiner Aktivität.

Für einzelne Teilreaktionen sind bereits Konstanten bekannt. So hat H-Gly-Pro-*p*NA einen K_a -Wert von $1,3 \cdot 10^{-4}$ M bei der DP IV-katalysierten Hydrolyse. Deshalb wurde als Modellsubstrat für die Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante K_a des Tetrapeptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivates H-Gly-Pro-Val-Pro-OH synthetisiert und einer DP IV-katalysierten Hydrolyse unterzogen. Die Spaltung wurde an der Kapillarelektrophorese verfolgt. Die Auswertung nach Eisenthal-Cornish-Bowden ergab einen K_a -Wert von $3,85 \cdot 10^{-4}$ M bei einem V_{\max} von $8,43 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$. Dieses Ergebnis ist jedoch nur unter Vorbehalt auf die DP IV-katalysierte Hydrolyse von H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon zu übertragen. Wertet man den Initialanstieg der Progresskurve in Abbildung 58 aus, so errechnet sich für die hydrolytische Freisetzung des Inhibitors H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon eine Bindungskonstante von $2,1 \cdot 10^{-5} (\pm 8,5 \cdot 10^{-6})$ M. Hier ist jedoch sofort auch eine Inhibierung der DP IV durch das Hydrolyseprodukt gegeben. H-Gly-Pro-OH inhibiert die DP IV-katalysierte Hydrolyse von H-Ala-Pro-*p*NA mit einem K_i -Wert von $1,6 \cdot 10^{-3}$ M. Cyclisiert das Dipeptid-Derivat zum Dihydropyrazin, beeinflußt es die DP IV nicht mehr in seiner Aktivität. Für H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon wurde gegenüber der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA ein K_i -Wert von $4,3 \cdot 10^{-6}$ M bestimmt. Für die Zerfallsgeschwindigkeit dieser Verbindung wurde eine Halbwertszeit von 13,3 min errechnet. In Abbildung 58 ist der Verlauf der DP IV-katalysierten *para*-Nitroanilin-Freisetzung in Gegenwart des Tetrapeptidyl-Pyridinium-Methylketons dargestellt. Nach einem steilen Anstieg der Kurve, ähnlich der Hydrolyse ohne Inhibitor, zeigt sich eine verzögerte Freisetzung von *para*-Nitroanilin nach den ersten Minuten. Hier wird durch Hydrolyse der Inhibitor H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon freigesetzt. Es folgt ein steady-state-Verhalten. Es wird in gleichem Maße durch DP IV aus dem Tetrapeptidyl-Pyridinium-Methylketon das Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketon als Inhibitor freigesetzt, wie gleichzeitig Inhibitor nichtenzymatisch zerfällt. Freiwerdendes Enzym setzt also sofort durch Spaltung von H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon seinen eigenen Inhibitor frei. Dieses steady-state-Gleichgewicht bleibt bei den gegebenen Konzentrationsverhältnissen (Abbildung 58) bis über 500 min konstant. Steht kein Tetrapeptidyl-Pyridinium-Methylketon mehr zur Freisetzung von Inhibitor zur Verfügung und zerfällt dieser aber nachfolgend nichtenzymatisch, sollte eine Zunahme der *para*-Nitroanilin-Freisetzung zu verzeichnen sein.

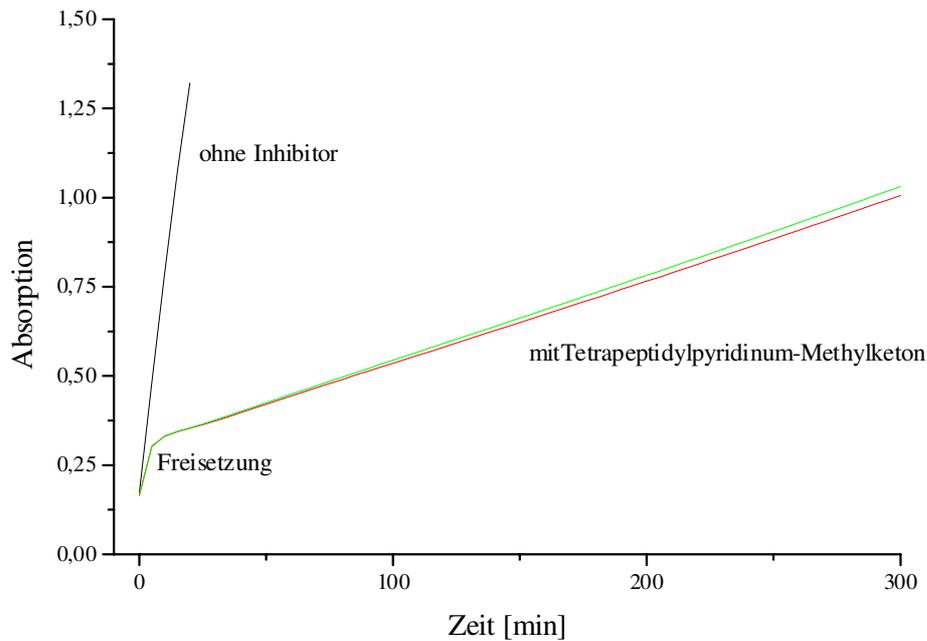


Abb. 58: Progresskurven der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA in Gegenwart von H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon $2,6 \cdot 10^{-5}$ mol/l, DP IV 0,6 mg/ml, 19 U/ml, H-Gly-Pro-*p*NA $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l im Ansatz, HEPES-Puffer (pH = 7,6)

Für den Bereich des steady-state-Gleichgewichtszustandes für die komplexe Abfolge von Inhibitorfreisetzung, Inhibierung der DP IV und nichtenzymatischem Zerfall des Inhibitors wurde ein scheinbarer K_i -Wert von $2,2 \cdot 10^{-6}$ ($\pm 5,4 \cdot 10^{-7}$) M bestimmt. Die kinetischen Parameter der DP IV-Inhibitoren auf Basis der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tab. 9: Kinetische Parameter der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA in Gegenwart von Tetra- bzw. Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketonen

Struktur	K_i (μM)	K_i^* (μM)	$t_{1/2}$ -Zerfall bei 25 °C in H ₂ O pH = 7,6 (min)
H-Val-Pro-CH ₂ -Pyridin	4,3 ($\pm 0,3$)	0,1 ($\pm 0,037$)	13,3 ($\pm 0,6$)
H-Phe-Pro-CH ₂ -Pyridin	1,7 ($\pm 1,6$)	nicht bestimmt	9,6 ($\pm 0,3$)
H-Gly-Pro-Val-Pro-CH ₂ -Pyridin	21 ($\pm 8,5$)	2,2 ($\pm 0,540$)	stabil über 10 h

Die relative Stabilität des gewünschten Inhibierungseffektes über den Zeitraum von 300 min macht diese Verbindungsklasse zu einem interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung physiologisch anwendbarer DP IV-Inhibitoren. Für den Einsatz dieses Inhibitors im bereits beschriebenen Modell für die *in vivo*-Untersuchungen von DP V-Inhibitoren kann die Dosis noch deutlich herabgesetzt werden, da hier nur eine Wirkungsdauer von ca. 1 h erforderlich ist. Durch Austausch der Aminosäure in P₂-Position des Inhibitors kann die Halbwertszeit des nichtenzymatischen Zerfalls und damit die Wirkungsdauer des Inhibitors am Zielenzym im Organismus eingestellt werden. Die Freisetzung des Inhibitors durch DP IV garantiert die gewünschte Wirkort-Spezifität.

Das MALDI-TOF-Massenspektrum zeigt quasi eine „Momentaufnahme“ der im steady-state-Gleichgewicht im Reaktionsansatz nach 50 min vorliegenden Verbindungen (Abbildung 59).

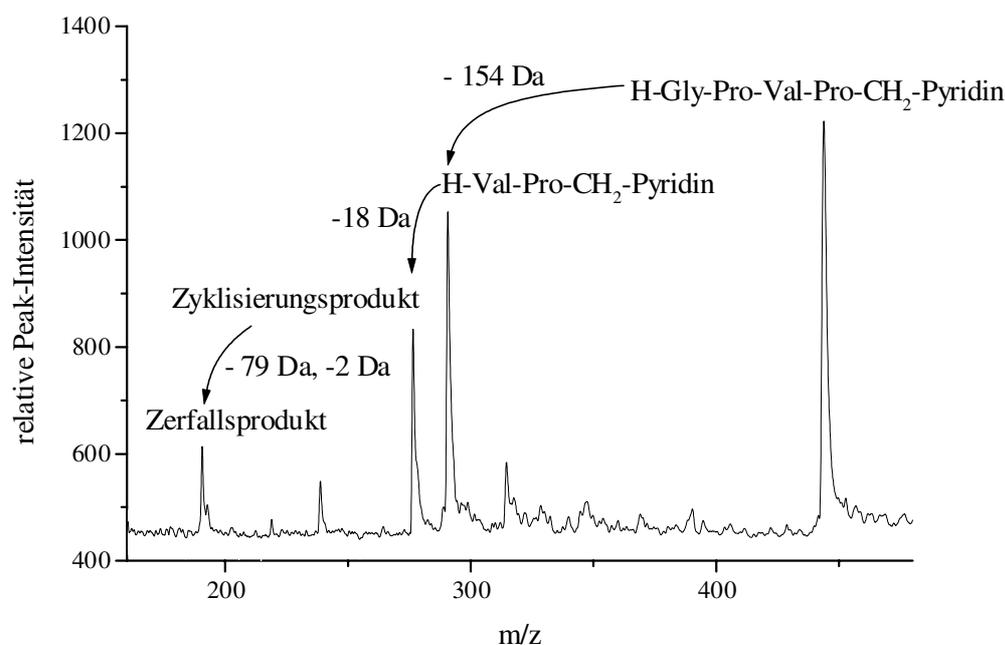


Abb. 59: MALDI-TOF-MS des Reaktionsansatzes der DP IV-katalysierten Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA in Gegenwart von H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon $2,6 \cdot 10^{-5}$ mol/l, DP IV 0,6 mg/ml, 19 U/ml, H-Gly-Pro-*p*NA $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l, HEPES-Puffer (pH = 7,6) nach 60 min

3. Zusammenfassung und Schlußbetrachtung

Die Prolylendopeptidase (PEP, E.C: 3.4.21.26) und die Exopeptidase Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, E.C: 3.4.14.5) spalten mit hoher Spezifität Prolylamidbindungen. Die vorliegende Arbeit behandelt die selektive Inhibierung dieser beiden prolinspezifischen Peptidasen. Als Verbindungstyp wurde die Substanzklasse der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone in den Mittelpunkt der synthetischen Arbeit gestellt. Die kinetische Charakterisierung dieser Verbindungen in wässriger Lösung und in Gegenwart von PEP bzw. DP IV führte zu einer Optimierung der Stabilität und zu einer Verbesserung des inhibitorischen Verhaltens der Peptididylpyridinium-Methylketone. ^{13}C -NMR-Untersuchungen lassen Rückschlüsse auf die Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen zu. In einem Tierversuch mit Ratten wurden die physiologischen Effekte der oralen Gabe eines DP IV-Inhibitors auf den Blutzuckerspiegel untersucht.

Folgende Ergebnisse sind dabei im einzelnen zu diskutieren:

- Peptidylchlormethylketone reagieren mit Pyridin-Derivaten zu quartären Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen. Für die Darstellung der N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure, -Nicotinsäure bzw. -Picolinsäure wurden für die in organischen Lösungsmitteln kaum löslichen Edukte Reaktionsbedingungen entwickelt, die eine Synthese in ausreichender Ausbeute ermöglichen.
- Für die Darstellung der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone wurde ein weiterer Syntheseweg entwickelt, der sowohl N-terminal die Variation von Aminosäuren als auch Variationen und Verlängerungen am C-Terminus zuläßt. Die Synthese wird dabei an Wang- bzw. Sasrin-Harz durchgeführt.
- Ein Syntheseweg zur Darstellung cyclischer Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Verbindungen wurde erarbeitet. Die Verknüpfung zum Ring wurde vom C-Terminus aus zur Lysin-Seitenkette mittels DCC durchgeführt. Es wurde γ -cyclo-(N(Z-Lys-Pro-CH₂-)Nicotinsäure-Gly₂)/Cl⁻ erhalten.

-
- Eine ^{13}C -markierte Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Verbindung wurde durch Reaktion von markiertem Prolin mit einem N-Hydroxysuccinimidester und anschließender Umsetzung über das Chlormethylketon zum Peptidyl-Pyridinium-Methylketon erhalten.
 - N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester ist in wässriger Lösung bei pH = 7,6 instabil. Die ermittelte Halbwertszeit der nichtenzymatischen Esterverseifung zu N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure mit anschließender Decarboxylierung zu Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon beträgt 38 Minuten und wurde durch zwei unterschiedliche Methoden ermittelt.
 - Mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde eine neue Quantifizierungsmethode zur kinetischen Bestimmung einer nichtenzymatischen Esterverseifung (N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester) mit anschließender Decarboxylierung der Säure entwickelt. Sowohl Edukt als auch Zwischen- und Endprodukt können gleichzeitig nebeneinander detektiert werden.
 - Peptidyl-Pyridinium-Methylketone sind Inhibitoren der Prolylendopeptidase und wirken reversibel nach einem slow-binding Mechanismus. Es konnte geklärt werden, daß die positive Ladung im Inhibitormolekül bei der Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor keine Rolle spielt.
 - Sowohl offenkettige als auch cyclische Verbindungen der Pyridinium-Methylketon-Verbindungs-klasse inhibieren die PEP-katalysierte Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-pNA gleichermaßen. Es ist wahrscheinlich, daß das aktive Zentrum der PEP nicht in Form einer tiefen Tasche vorliegt, wie von den trypsinähnlichen Serinproteasen bekannt ist. Somit ist genügend Raum für eine konformative Anpassung zum Enzym-Inhibitor-Komplex vorhanden.
 - Die Substanzklasse der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone wurde für die PEP-katalysierte Hydrolyse von H-Gly-Pro-Pro-pNA durch Variation der Substituenten und ihrer Stellung am Pyridinring optimiert. N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Nicotinsäure hat einen initialen K_i -Wert von $1,5 \cdot 10^{-7} (\pm 3,2 \cdot 10^{-8})$ M. Der steady-state K_i^* -Wert beträgt $1,8 \cdot 10^{-8} (\pm 5,7 \cdot 10^{-9})$ M.

-
- Die C-terminale Verlängerung der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone durch eine Aminosäurekette unterschiedlicher Länge konnte die inhibierende Wirkung dieser Substanzklasse auf die PEP-katalysierte Hydrolyse verbessern.
N(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridylessigsäure-Gly₂-OH hat aus dieser Reihe den besten steady-state-K_i*-Wert von $1,8 \cdot 10^{-10}$ ($\pm 3,7 \cdot 10^{-13}$) M. Unter Berücksichtigung aller kinetischen Konstanten für das slow-binding Verhalten der mit einer Glycinkette verlängerten Peptidyl-Pyridinium-Methylketone hat sich eine Aminosäurekettenlänge von 4 Glycinen als besonders wirksam herausgestellt. Dieses Ergebnis läßt auf eine zusätzliche Interaktion zwischen Enzym und C-Terminus des Inhibitors schließen.

 - Die ¹³C-markierte Verbindung Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon wurde zur Aufklärung des Mechanismus der Interaktionen zwischen PEP und Inhibitor mittels NMR eingesetzt. Dabei konnte ein tetrahedrales Enzym-Inhibitor-Addukt nicht detektiert werden. Es wird eine nichtkovalente Wechselwirkung zwischen Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon und PEP postuliert.

 - Beobachtet man die DP IV-katalysierte Hydrolyse eines chromogenen Substrates in Gegenwart N-terminal ungeschützter Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone, so ist eine zeitabhängige Inhibierung der DP IV zu erkennen, die mit fortschreitender Zeit schwächer wird. Das bekannte slow-binding Verhalten der Inhibitoren ist vom nichtenzymatischen Spontanzerfall des Inhibitors überlagert.

 - N-terminal ungeschützte Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone neigen zu intramolekularer Kondensationsreaktion mit anschließender Eliminierung des Pyridinrings. Der Abbau dieser Substanzen wurde massenspektrometrisch verfolgt. Das Endprodukt (3-Benzyl-1methylen-4oxo-1H,4H,6H,7H,8H-azolo[1,2-a]pyrazin-5-ium) aus dem nichtenzymatischen Zerfall von H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon konnte isoliert und charakterisiert werden.

 - Der nichtenzymatische Zerfall von H-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon und H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon in HEPES-Pufferlösung wurde UV-spektrometrisch quantifiziert. Die Halbwertszeiten für die Cyclisierung liegen im Bereich von 5 - 10 Minuten. Die Zerfallsprodukte inhibieren die DP IV-katalysierte Hydrolyse von H-Gly-Pro-pNA nicht. Die Substanzklasse ist durch ihre potentielle, zeitlich begrenzte Wirksamkeit interessant für pharmakologische Anwendungen.

-
- N-terminal ungeschützte Pyridinium-Methylketone sind Inhibitoren der Dipeptidyl-peptidase IV und wirken reversibel nach einem slow-binding Mechanismus. Für H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon wurde ein initialer K_i -Wert von $1,7 \cdot 10^{-6}$ ($\pm 1,6 \cdot 10^{-6}$) M bestimmt. Für H-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon analog ein initialer K_i -Wert von $4,3 \cdot 10^{-6}$ ($\pm 3 \cdot 10^{-7}$) M.
 - Um die hydrolytische Stabilität der N-terminal ungeschützten Pyridinium-Methylketon-Verbindungen zu verbessern, wurden Tetrapeptidyl-Pyridinium-Methylketone entwickelt, deren Inhibitorsequenz erst durch N-terminale Abspaltung eines Dipeptids freigesetzt wird. H-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon wurde bezüglich der inhibierenden Eigenschaften auf die DP IV-katalysierte Hydrolyse von H-Gly-Pro-*p*NA untersucht. DP IV selbst setzt *in situ* den eigenen Inhibitor aus einer nicht als DP IV-Inhibitor wirkenden Verbindung frei. Anschließend zerfällt der Inhibitor in wässriger Lösung in eine physiologisch unwirksame Verbindung. Die DP IV-inhibierende Wirkung der Substanz ist zeitlich begrenzt und wird erst am Wirkort aktiviert. Für den Bereich des steady-state-Gleichgewichtszustandes für die komplexe Abfolge von Inhibitorfreisetzung, Inhibierung der DP IV und den nichtenzymatischen Zerfall des Inhibitors ist ein scheinbarer K_i -Wert von $2,2 \cdot 10^{-6}$ ($\pm 5,4 \cdot 10^{-7}$) M bestimmt worden.
 - H-Ile-Thiazolidid als potenter, kompetitiv wirkender DP IV-Inhibitor wurde Ratten oral verabreicht und die Wirkung auf die enterointestinale Achse untersucht. Die Spaltung von GIP_{1-42} durch DP IV in die physiologisch inaktive Form GIP_{3-42} wurde durch die Inhibitorgabe unterdrückt. Die Insulinabgabe wurde durch die erhöhte Konzentration an GIP_{1-42} im Blut weiterhin stimuliert, was eine beschleunigte Abnahme des Blutzuckerspiegels zur Folge hat. Aus diesem Modell wurden Aussagen zu Wirkungsdauer und Transport für eine weitere Optimierung von Inhibitorstrukturen abgeleitet. Diese Anforderungen werden von der vorgestellten Tetrapeptidyl-Pyridinium-Methylketon-Verbindung erfüllt.

Eine Beteiligung der PEP an der Pathophysiologie der Alzheimer'schen Krankheit wird vermutet [55]. Aufgrund der Substratspezifität könnte PEP als sogenannte γ -Sekretase an der Freisetzung des plaque-bildenden β -A4-Peptids mitwirken. Ein Wirkstoff auf Basis der Pyridinium-Methylketone als Inhibitor für Prolylendopeptidase kann für die Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit entwickelt werden.

Ein bereits seit Jahren bekanntes Krankheitsbild ist Diabetes. Es wurde nachgewiesen, daß H-Ile-Thiazolidid geeignet ist, Dipeptidylpeptidase IV (CD 26) und damit den Glukosemetabolismus bei Nahrungsaufnahme zu modulieren. Auf der Basis der Peptidyl-Pyridinium-Methylketone kann eine neue Klasse von verbesserten Wirkstoffen entwickelt werden.

Beide Krankheitsbilder stehen in ihrer Physiologie im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit bearbeiteten Enzymen PEP bzw. DP IV. Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivate sind, wie gezeigt wurde, potente Inhibitoren dieser beiden Enzyme. Daher ist eine weitere Optimierung der Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivate in bezug auf den Transport, die Stabilität und die Wirksamkeit von Interesse.

Im einzelnen sind folgende Punkte zu untersuchen:

- Die Verbindungsklasse der Pyridinium-Methylketone ist bezüglich der Transportmechanismen durch verschiedene Membranbarrieren einschließlich der Bluthirnschranke weiterzuentwickeln.
- Eine zeitlich begrenzte Stabilität der N-terminal ungeschützten Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone könnte einen zeitlich definierten Einfluß auf den Organismus zulassen. Auf Basis der Tetrapeptidyl-Pyridinium-Methylketone kann ein neuer Wirkstoff entwickelt werden, der erst am Zielort freigesetzt wird und anschließend nur eine begrenzte Zeit als Inhibitor aktiv ist.
- Statt DP IV selbst können auch andere im Organismus vorkommende Enzyme gewählt werden, die den DP IV-Inhibitor aus Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen freisetzen. Hierfür sind entsprechende N-terminale Aminosäuresequenzen am Inhibitor anzusetzen. Auch die Freisetzung, nicht durch ein Enzym, sondern durch einen chemischen Prozeß ist denkbar.

- Die Erkenntnisse aus den kinetischen Untersuchungen der C-terminalen Strukturvariation an Peptidyl-Pyridinium-Methylketonen können in die Synthese von Alkyl-Ammonium-Methylketonen einfließen. Hier bietet sich ebenfalls ein weites Feld für Strukturvariationen am C-Terminus.

4. Experimenteller Teil

4.1. Mathematische Grundlagen des slow-binding Mechanismus

Startet man eine enzymkatalysierte Substrathydrolyse mit Enzym in Gegenwart eines slow-binding Inhibitors, z. B. aus der Inhibitor-Klasse der Pyridiniummethylketone, so stellt man eine zeitabhängige Zunahme der Hemmung des Zielenzym bis zum Erreichen einer konstanten steady-state-Geschwindigkeit fest. Inkubiert man jedoch Enzym und slow-binding Inhibitor ausreichend lange miteinander vor und startet die enzymkatalysierte Substrathydrolyse anschließend mit Substrat, ist eine Zunahme der Enzymaktivität feststellbar, bis wiederum eine konstante Geschwindigkeit erreicht wird. Werden in beiden Fällen gleiche Enzym-, Substrat-, und Inhibitor-Konzentrationen verwendet, erhält man unter Ausschluß von Produktinhibierung, zu hohem Substratumsatz oder anderen zur Enzyminaktivierung führenden Faktoren gleiche steady-state-Geschwindigkeiten. Morrison [285, 286] führte für dieses kinetische Verhalten die Bezeichnung slow-binding Inhibierung ein. Substratanaloge reversible Enzyminhibitoren werden danach in vier Klassen eingeteilt (Tabelle 10). Entsprechend der Bindungsstärke und der Geschwindigkeit für die Gleichgewichtseinstellung zwischen Enzym und Inhibitor werden die Verbindungen in klassische, tight-binding, slow-binding und slow-tight-binding Inhibitoren eingeteilt. Eine klare Abgrenzung der Klassen untereinander ist jedoch nicht leicht.

Tab. 10: Eigenschaften substratanaloger reversibler Inhibitor-Klassen

Inhibitor-Klasse	Eigenschaften	
	$[I_0] / [E_0]$	Gleichgewichtseinstellung zw. E, I und EI
klassisch, kompetitiv	$[I_0] \gg [E_0]$	schnell
tight-binding	$[I_0] \sim [E_0]$	schnell
slow-binding	$[I_0] \gg [E_0]$	langsam
slow-tight-binding	$[I_0] \sim [E_0]$	langsam

Da eine Unterscheidung zwischen slow-binding Inhibierung und slow-tight-binding Inhibierung nicht immer möglich ist, wird für die kinetische Analyse des slow-binding Verhaltens der slow-tight-binding Inhibitor durch Verwendung relativ hoher Substratkonzentrationen in den slow-binding Bereich gedrängt.

An dieser Stelle werden die Modelle des kinetischen Verhaltens der slow-binding Inhibierung erläutert. Es lassen sich drei verschiedene Mechanismen definieren (Abbildung 60).

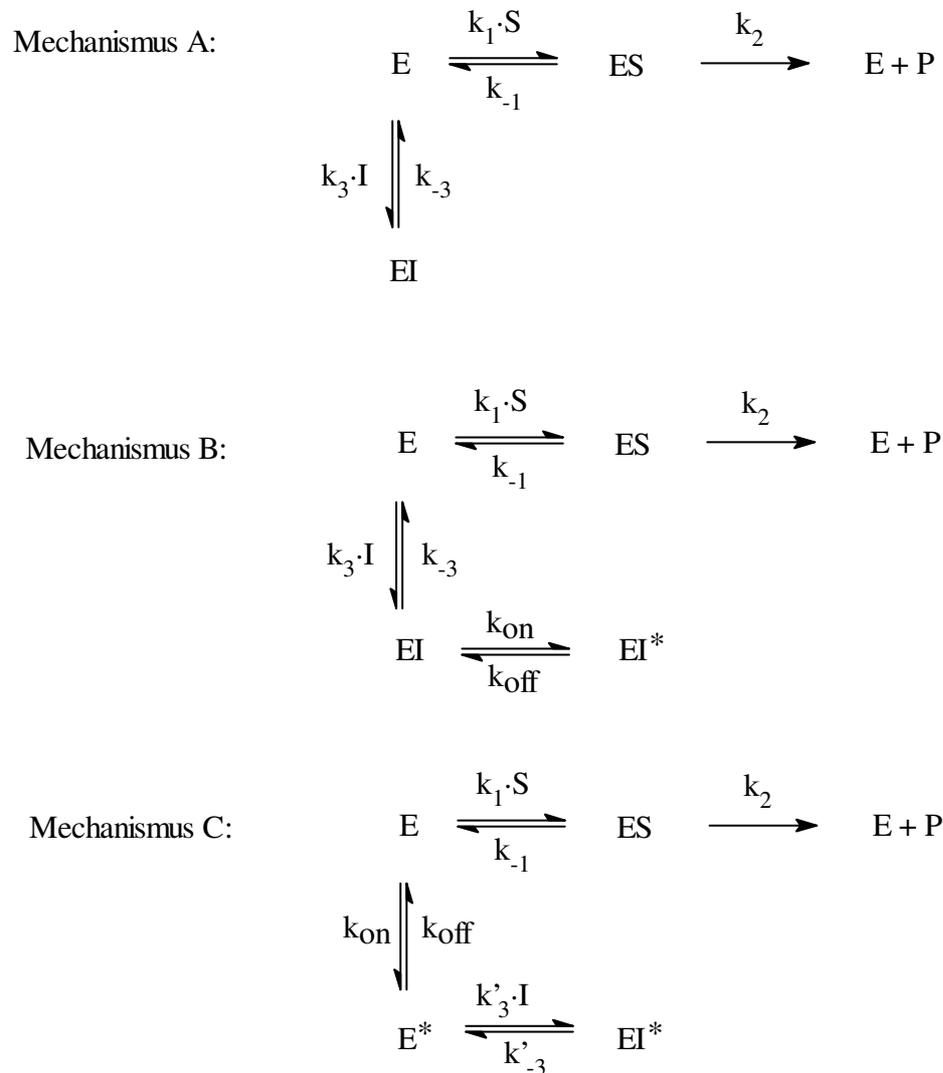


Abb. 60: Mögliche Mechanismen einer slow-binding Inhibierung nach Morrison und Walsh [285, 286]

Mechanismus A zeigt das einfachste Modell einer kompetitiven slow-binding Inhibierung. In einem Inkubationsansatz aus Inhibitor, Substrat und Enzym bindet der Inhibitor im Vergleich zum Substrat sehr viel langsamer an das Enzym. Die Umwandlung von Substrat S zu Produkt P, katalysiert durch das Enzym E, ist sehr viel schneller als die Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes EI (K_a = Michaelis-Menten-Konstante).

$$K_a = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} > K_i = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Eine Produktinhibierung ist ausgeschlossen. Der steady-state-Zustand für den Enzym-Substrat-Komplex ES wird sofort erreicht. Die Substratabnahme ist vernachlässigbar. Es gilt außerdem:

$$k_{-1} > k_{-3} \quad \text{und} \quad k_1 S > k_3 I \quad (\text{Gleichung 2})$$

Für die Reaktionsgeschwindigkeit v_i in Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit v_0 und der steady-state-Geschwindigkeit v_s gilt:

$$\frac{dP}{dt} = v_i = v_s + (v_0 - v_s) e^{-kt} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Integriert man Gleichung 3, so folgt daraus für die Produktbildung P einer enzymkatalysierten Substrathydrolyse der slow-binding Inhibierung:

$$P = v_s t - (v_s - v_0) (1 - e^{-k_{obs} t}) / k_{obs} \quad (\text{Gleichung 4})$$

k_{obs} ist dabei die erste Ordnungs-Geschwindigkeitskonstante für die Einstellung der Gleichgewichtsgeschwindigkeit v_s . Gleichung 4 weist eine Asymptote auf. Der Term $(1 - e^{-k_{obs} t})$ geht gegen eins, wenn t groß genug ist. Die Progresskurve wird, wenn t groß genug ist, vereinfacht von folgender Gleichung beschrieben:

$$P = v_s t - (v_s - v_0) / k_{obs} \quad (\text{Gleichung 5a})$$

Geht t gegen Null, gilt

$$P = v_0 t \quad (\text{Gleichung 5b})$$

für die Tangente in einem Meßpunkt der Kurve.

Eine Besonderheit der slow-binding Inhibierung ist, daß die Kinetik davon abhängig ist, ob die enzymkatalysierte Substrathydrolyse mit Enzym oder Substrat gestartet wird. Startet man die Reaktion mit Enzym, so ergeben sich für v_0 , v_s , und k_{obs} folgende Ausdrücke:

$$v_0 = VS / (S + K_a) \quad (\text{Gleichung 6})$$

$$v_s = VS / (S + K_a (1 + I/K_i)) \quad (\text{Gleichung 7})$$

$$k_{\text{obs}} = k_{-3} \frac{1 + \frac{S}{K_a} + \frac{I}{K_i}}{1 + \frac{S}{K_a}} = k_{-3} + \frac{k_3 I}{1 + \frac{S}{K_a}} \quad (\text{Gleichung 8})$$

wobei V die Maximalgeschwindigkeit darstellt.

$$V = k_2 E_t \quad (\text{Gleichung 9})$$

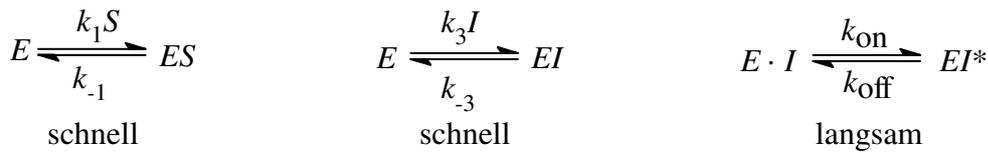
Unter Variation der Inhibitorkonzentration bei konstanter Substratkonzentration bleibt die Initialgeschwindigkeit v_0 konstant und k_{obs} ist eine lineare Funktion der Inhibitorkonzentration.

Startet man die enzymkatalysierte Substrathydrolyse mit Enzym, so nimmt v_i kontinuierlich mit zunehmender Zeit ab. Auch die Steigung der Kurve im Diagramm P gegen t nimmt mit zunehmender Zeit ab. Es gilt $v_0 > v_s$.

Wird das Enzym mit Inhibitor vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Substrat gestartet, nimmt die Steigung der Kurve durch die Meßpunkte im Diagramm P gegen t mit zunehmender Zeit zu. Hier gilt somit $v_s > v_0$.

Ein weiteres Charakteristikum der slow-binding Inhibierung ist, daß die Konstante k_{obs} mit steigender Inhibitorkonzentration I zunimmt. Das bedeutet, daß bei höheren Inhibitorkonzentrationen die Produkt-Progressekurve die Asymptote eher erreicht.

In Mechanismus B stellt die Isomerisierung des EI-Komplexes in den EI^* -Komplex den langsamsten Schritt dar.



Für die mathematische Beziehung werden einige Annahmen vorausgesetzt: (i) Der EI-Komplex liegt sofort im Gleichgewicht vor, (ii) die Werte für k_1A , k_{-1} , k_3I , und k_{-3} sind weit größer als k_{on} und k_{off} , (iii) $k_{\text{off}} < k_{\text{on}}$ und (iv) die Substratkonzentration wird als konstant über den gesamten Zeitraum betrachtet.

$$E = \frac{K_a}{S} (E \cdot S) \quad E \cdot I = \frac{1}{K_i} \frac{K_a}{S} (E \cdot S)$$

Auch für diesen Mechanismus gilt Gleichung 3 unter der Voraussetzung, daß für die Enzymkonzentration gilt:

$$E_t = E + ES + EI + EI^*$$

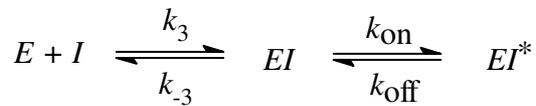
Die Definitionen für v_0 , v_s , und k lauten wie folgt:

$$v_0 = \frac{k_2 E_t S}{S + K_a \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} = \frac{V S}{S + K_a \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad (\text{Gleichung 10})$$

$$v_s = \frac{k_2 k_{\text{off}} E_t S}{k K_a} = \frac{V S}{S + K_a \left(1 + \frac{I}{K_i^*}\right)} \quad (\text{Gleichung 11})$$

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{off}} \frac{1 + \frac{S}{K_a} + \frac{I}{K_i^*}}{1 + \frac{S}{K_a} + \frac{I}{K_i}} = k_{\text{off}} + k_{\text{on}} \frac{\frac{I}{K_i}}{1 + \frac{S}{K_a} + \frac{I}{K_i}} \quad (\text{Gleichung 12})$$

Für die Charakterisierung der Interaktion zwischen Inhibitor und Enzym soll nun folgendes Gleichgewicht näher betrachtet werden:



Die Enzymkonzentration in diesem Gleichgewicht berechnet sich aus:

$$E_t = E + EI + EI^* \quad (\text{Gleichung 13})$$

Für das initiale Anlagern des Inhibitors an das Enzym beschreibt K_i als Konstante das Gleichgewicht.

$$K_i = k_{-3} / k_3 \quad \text{oder} \quad K_i = E \cdot I / EI \quad (\text{Gleichung 14})$$

Ist die Reaktion weiter fortgeschritten, so setzt zunehmend die Isomerisierung des EI-Komplexes in den EI*-Komplex ein.

$$K_{\text{Isomerisierung}} = k_{\text{off}} / k_{\text{on}} \quad \text{oder} \quad K_{\text{Isomerisierung}} = EI / EI^* \quad (\text{Gleichung 15})$$

Für das Gesamtgleichgewicht aus EI-Komplexbildung und Isomerisierung wird die Gleichgewichtskonstante K_i^* definiert.



$$K_i^* = E \cdot I / (EI + EI^*) \quad (\text{Gleichung 16})$$

Daraus folgt:

$$K_i^* = K_i / (1 + k_{\text{off}} / k_{\text{on}}) = K_i \cdot k_{\text{off}} / (k_{\text{on}} + k_{\text{off}}) \quad (\text{Gleichung 17})$$

Aus Gleichung 17 läßt sich rechnerisch $K_{\text{Isomerisierung}}$ aus K_i und K_i^* und Gleichung 15 bestimmen.

Nach Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der beiden Teilschritte (Anlagerung des Inhibitors und Isomerisierung des Enzym-Inhibitorkomplexes) soll nun die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen dem EI- und EI*-Komplex bei einer bestimmten Substrat- und Inhibitorkonzentration untersucht werden. Es gilt $k_{\text{on}} < k_3 I$ und $k_{\text{off}} < k_{-3}$.

$$\frac{dEI}{dt} = k_3 I E_t - (k_3 I + k_{-3} + k_{\text{on}}) EI + (k_{\text{off}} - k_3 I) EI^*$$

$$\frac{dEI^*}{dt} = k_{\text{on}} EI - k_{\text{off}} EI^*$$

Wendet man die Laplace-Transformation zur Lösung dieser Gleichungen an, so ergibt sich unter Annahme, daß $EI = EI^* = 0$ zur Zeit $t = 0$ gilt, für die erste Ordnungs-Konstante k_{obs} (Gleichung 12) unter Berücksichtigung der Enzymkonzentration (Gleichung 13):

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{off}} + k_{\text{on}} I / (I + K_i) \quad (\text{Gleichung 18})$$

Ist die Substratkonzentration konstant, so nimmt k hyperbolisch als eine Funktion von I zu. Die untere und obere Grenze sind k_{off} und $k_{\text{on}} + k_{\text{off}}$. Für k_{obs} läßt sich auch schreiben:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{off}} \frac{1 + \frac{I}{K_i^* (1 + \frac{S}{K_a})}}{1 + \frac{I}{K_i (1 + \frac{S}{K_a})}} \quad (\text{Gleichung 19})$$

In Mechanismus C geht der Bindung des Inhibitors an das Enzym ebenfalls ein Isomerisierungsschritt voraus. Ist die Gleichgewichtseinstellung von E^* zu EI^* langsam gegenüber dem schnellen Isomerisierungsschritt des Enzyms, so ist Mechanismus C nicht von Mechanismus A zu unterscheiden. Ist die Gleichgewichtseinstellung zwischen E und E^* jedoch der langsamere Schritt, so führt Mechanismus C zu folgender Abhängigkeit für k von I .

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{on}}}{1 + \frac{S}{K_a}} + \frac{k_{\text{off}}}{1 + \frac{I}{K_i}} \quad (\text{Gleichung 20})$$

$$K_i = \frac{k'_{-3}}{k'_3} \quad (\text{Gleichung 21})$$

Wie schon in Mechanismus B ergibt sich auch in Mechanismus C eine hyperbolische Abhängigkeit zwischen k und I . Der Unterschied liegt jedoch darin, daß k in Mechanismus B mit steigendem I ebenfalls zunimmt, wohingegen in Mechanismus C k mit zunehmender Inhibitorkonzentration abnimmt.

4.2. Enzymologische Methoden

Dipeptidylpeptidase IV

Die DP IV, die in den Untersuchungen verwendet wurde, ist aus Schweinenierenrinde nach der in der Literatur beschriebenen und etwas modifizierten Methode präpariert worden [1]. Für die Berechnung der Enzymkonzentration wird ein Molekulargewicht von 115 kDa je aktive Untereinheit zugrunde gelegt. Die mit H-Gly-Pro-pNA als chromophores Substrat bestimmte spezifische Aktivität beträgt 40 U/mg bei pH = 7,6 und 30 °C. Die Reinheit des Enzyms wird massenspektrometrisch und durch SDS PAGE kontrolliert und ist frei von Fremdaktivitäten.

Prolylendopeptidase

Die Isolierung der PEP aus Schweinenieren wurde nach einer in der Abteilung Wirkstoffbiochemie des Hans-Knöll-Institutes in Jena entwickelten Methode aus Schweinenierenrinde isoliert. Die wesentlichen Schritte der Proteinaufreinigung sind dabei eine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung und zwei Chromatographieschritte über DEAE-Sephacel und Q-Sepharose. Das Molekulargewicht des Enzyms beträgt etwa 76 kDa. Die mit Z-Gly-Pro-pNA als chromophores Substrat bestimmte spezifische Aktivität beträgt 6 U/mg bzw. 1,7 U/ml. Die Reinheit des Enzyms wurde massenspektrometrisch und durch SDS PAGE kontrolliert und ist frei von Fremdaktivitäten.

Rohextrakt rekombinanter PEP aus *Flavobacterium meningosepticum* wurde von der Firma Weissheimer Malzfabrik bezogen. Die Proteinkonzentration betrug 5,5 mg Protein/ml und die spezifische Aktivität gegenüber dem eingesetzten Substrat H-Gly-Pro-Pro-pNA 24 U/mg Protein.

Die verwendete PEP aus Rinderhirn wurde von Dr. O'Connor Universität Dublin zur Verfügung gestellt. Die Aktivität beträgt 10 mU/ml (Z-Gly-Pro-pNA).

Substrate

Z-Gly-Pro-pNA und H-Gly-Pro-pNA wurden nach der Mischanhydridmethode nach eigenen Laborvorschriften hergestellt. Die Synthese von H-Gly-Pro-Pro-pNA erfolgte nach Lasch [16].

Spektrophotometrische Analyse der enzymkatalysierten Substrathydrolyse

Kinetische Messungen der enzymkatalysierten Hydrolyse verschiedener chromophorer Substrate wurden UV-spektrometrisch an einem UVIKON 930 der Firma Kontron Instruments durchgeführt. Das Gerät war mit einer temperierbaren Meßzelle, einer Wolfram-Halogen-Lampe (290 - 900 nm), einer Deuteriumlampe (190 - 370 nm) und einem Photomultiplier R 446 als Detektor bestückt. Wenn in der Arbeit keine anderen Angaben gemacht wurden, erfolgten alle Messungen bei einer Temperatur von 30 °C unter Standardbedingungen (0,04 M HEPES Puffer, pH = 7,6, bei 30 °C, Ionenstärke 0,125 mol/l (KCl)). Die enzymkatalysierte Hydrolyse der Peptidyl-*p*-Nitroanilide wurde bei einer Wellenlänge $\lambda = 390$ nm und $T = 30$ °C ($\epsilon_{390} = 11500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durchgeführt. Zur Analyse der linearen und nichtlinearen Meßergebnisse wurden Regressionsprogramme verwendet (GraFit 3.01 von Erithacus Software Ltd., Excel 97 von Microsoft, Enzfitter von Biosoft, Ez-fit von Perrella Scientific Inc.). Die slow-binding Kinetik der Inhibierung der PEP durch Peptidyl-Pyridinium-Methylketon-Derivate wurde anhand der in der Literatur beschriebenen Formeln ausgewertet [8, 10 - 12].

Bestimmung der kinetischen Konstanten K_a und k_{cat} für die enzymatische Hydrolyse von Peptidyl-*para*-nitroaniliden

Der Berechnung der Geschwindigkeit der *para*-Nitroanilin-Freisetzung im Zuge der enzymatischen Reaktion erfolgte entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Es wird bei 390 nm ein Extinktionskoeffizient ϵ_{390} von $11500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ zugrunde gelegt. Das Substrat wird in mit Teflonstopfen fest verschließbaren Quarzküvetten (2,5 ml) in Standardpuffer gelöst und mit 0,1 ml einer konzentrierten Enzymlösung versetzt. Durch Auftragung der ermittelten Extinktionsänderung bei einer geeigneten Wellenlänge nach Totalhydrolyse in Abhängigkeit von der Substratkonzentration entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz kann aus dem Anstieg der Extinktionskoeffizient berechnet werden.

Für die Ermittlung der kinetischen Parameter K_a und V_{max} , bzw. k_{cat} unter Standardbedingungen werden die Substratkonzentrationen im Bereich von $0,5 - 2 K_a$ variiert. Die Konzentration des Enzyms ist ca. drei Größenordnungen geringer. Die Aktivität wird so gewählt, daß während der Messung nur maximal 10 % des Substrates umgesetzt werden.

Untersuchung zur Inhibierung der DP IV und PEP

Für die Bestimmung der kinetischen Konstanten von Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen, die nach einem slow-binding Mechanismus verlaufen, ist es notwendig, nach Inkubation von Substrat, Inhibitor und Enzym die Reaktion bis zur Gleichgewichtseinstellung, die durch eine dann lineare Zeit-Umsatz-Abhängigkeit charakterisiert wird, zu verfolgen. Da sich die einzelnen Messungen über einen relativ langen Zeitraum erstreckten (100 min), wurde ein automatischer 6-Küvettenwechsler benutzt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Enzymzugabe. Um eine exakte Bestimmung der kinetischen Konstanten zu gewährleisten, wurden für die Messungen unter Standardbedingungen jeweils drei Substratkonzentrationen mit mindestens fünf Inhibitorkonzentrationen kombiniert, die im Bereich um den zu erwartenden K_i -Wert lagen und die Initialgeschwindigkeiten bestimmt. Die Inhibitorkonzentrationen wurden so gewählt, daß sie wenigstens um 2 Größenordnungen über der Enzymkonzentration lagen. Während der Messung wurden maximal 10 % des Substrates umgesetzt.

Meßansatz: 1 ml Pufferlösung
 1 ml Inhibitorlösung
 0,5 ml Substratlösung
 0,05 ml Enzymlösung

Spektralphotometrische Bestimmung der Reaktivierung eines Enzym/Inhibitor-Komplexes, gebildet nach Vorinkubation von Enzym mit einem slow-binding Inhibitor

Enzym und Inhibitor werden eine Stunde in folgendem Meßansatz vorinkubiert:

0,5 ml Standardpuffer
0,2 ml Inhibitorlösung
0,1 ml Enzymlösung

Nach Überführung von 0,05 ml aus dem Vorinkubationsansatz in einen Standardmeßansatz konnte die Reaktivierung direkt verfolgt werden. Dabei wird so lange gemessen, bis wenigstens 10 Minuten lang die Enzymaktivität konstant bleibt. Während der gesamten Reaktivierungsmessung ist eine konstante Substratkonzentration gewährleistet.

Spektralphotometrischer Reversibilitätstest

Es wird in einem Standardansatz, bestehend aus

- 0,5 ml HEPES-Puffer,
- 0,5 ml Substratlösung,
- 0,2 ml Inhibitorlösung,

nach Zugabe von 0,05 ml Enzym die Initialgeschwindigkeit bestimmt. Danach wird in die Küvette nochmals

- 0,5 ml Standard-Puffer,
- 0,5 ml Substratlösung,
- 0,25 ml Wasser

gegeben und erneut die Initialgeschwindigkeit gemessen.

Wie für reversibel wirkende Inhibitoren erwartet, betrug diese Initialgeschwindigkeit jeweils mehr als 50 % der zuvor mit dem konzentrierteren Ansatz ermittelten Geschwindigkeit (im Bereich von 55 - 68 %).

4.3. Analysemethoden

MALDI-TOF-MS

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wird das LD-TOF-System G2025A der Firma Hewlett-Packard, ein lineares Gerät mit einer Flugrohrlänge von 100 cm, ausgerüstet mit einem 337-nm-Stickstofflaser und einer Hochpotential-Beschleunigungsquelle (5 kV), genutzt. Es können sowohl positive als auch negative Ionen detektiert werden. Aufnahme, Filtern und Verstärkung der Signale erfolgt mittels eines digitalen 500 MHz Oszilloskopes (LeCroy 9350) in Verbindung mit einem Personal Computer und der entsprechenden Software. Die Kalibrierung der Massenspektren erfolgt extern mit unterschiedlichen Standardlösungen (HEWLETT-PACKARD G2051A).

Folgende Matrixlösungen wurden verwendet:

- a) 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in Acetonitril/Wasser (30 mg/ml), Fluka
- b) 2,6-Dihydroxyacetophenon (DHAP) in Acetonitril/Wasser (30 mg/ml), Aldrich und DHC (44 mg), Fluka
- c) DHB (30 mg/ml) und 5-Methoxysalicylsäure (3,5 mg/ml) in Acetonitril/Wasser (DHB/MSA), Merck
- d) DHB (30 mg/ml) und 1-Hydroxyisochinolin (10 mg/ml) in Acetonitril/Wasser (DHB/HIC), Fluka
- e) *trans*-3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure (Sinapinsäure) in Methanol/Wasser (gesättigte Lösung), Merck

Die Probenlösungen werden dabei im Volumen-Verhältnis 1/1 mit der Matrixlösung gemischt. Man verwendet 1 µl dieser Mischung zum Auftragen auf die Probenfläche. Die Kristallisation wird mittels des Sample Prep Accessory HP G2024A der Firma Hewlett-Packard beschleunigt.

Analyse der Inhibitorstabilität mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Lösungen für die Bestimmung des Linearitätsbereiches der aufgetragenen Konzentration der zu analysierenden Verbindung zur gemessenen Signalintensität werden in zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Um ein Massenspektrum der Inhibitorlösungen in Puffer zu erhalten, werden die Verbindungen bei 30 °C und einem pH-Wert von 7,6 inkubiert. Proben dieser Lösung (4 µl) werden in definierten Zeitintervallen entnommen und mit einem äquivalenten Volumen 0,2 M Matrix (b) gemischt. 2,6-Dihydroxyacetophenon als Matrixlösung in Kombination mit Diammoniumhydrogencitrat hat sich aufgrund der hervorragenden Kristallisationseigenschaften, einer guten Auflösung und hohen Reproduzierbarkeit als herausragend geeignet gegenüber anderen Matrices (z.B. Sinnapinsäure und 2,5-Dihydroxybenzoesäure) erwiesen.

Ein Volumen von 0,6 µl der Matrix-Analyt-Mischung wird auf den Probenkopf aufgetragen und unmittelbar in der Vakuumkammer (HEWLETT-PACKARD G2024A) evakuiert, um eine schnelle und homogene Kristallisation zu gewährleisten. Die Stoppzeit für die kinetische Untersuchung ist die Eintrübung der Mischung kurz vor dem Kristallisationspunkt. Alle Spektren werden aus einem Durchschnitt von 250 einzelnen Spektren akkumuliert. Die Laserstärke variiert zwischen 1,5 und 4,5 µJ. Das Signal/Rausch-Verhältnis sollte sich dabei zwischen 1,5 und 35 einstellen. Die Laserstärke steigert sich automatisch mit einem statistischen Algorithmus von 0,5 auf 2,8 µJ bis zu der Grenze, an der sich das Signal/Rausch-Verhältnis im gewünschten Bereich befindet.

Quantifizierungsmethode mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie werden die Analytmoleküle und eine das Laserlicht stark absorbierende Matrix kokristallisiert. Die Matrixmoleküle (im Überschuß 1 : 1000 bis 1 : 10000) umhüllen dabei wie Solvenzmoleküle in einer Lösung die zu analysierenden Teilchen. Wenn ein Laserpuls auf die Matrix-Biomolekül-Kristalle trifft, wird die zu untersuchende Verbindung abgelöst und ionisiert. Das Molekül bleibt dabei ohne wesentliche Fragmentierungen erhalten und wird so beschleunigt, daß in einem Flugrohr durch Flugzeitmessung die Masse bestimmt werden kann. Fragmentierungen während der Flugphase werden nicht detektiert, da die entstehenden Teilchen die gleiche kinetische Energie wie das Ursprungsteilchen besitzen. Da die Anzahl der ionisierten Moleküle, die detektiert werden, neben der absoluten Anzahl an Analytmolekülen auf der Probenfläche auch

von der Laserstärke und von Eigenschaften der Matrix/Analyt-Kristallschicht (Kristallform, Dicke, Homogenität) abhängen, müssen diese Parameter durch standardisierte Meßbedingungen konstant gehalten werden.

Weitere wichtige Aspekte sind die Ionisierbarkeit und Desorbierbarkeit der zu analysierenden Verbindungen bedingt durch ihre chemische Natur. Aus diesem Grund wird bei den Massenquantifizierungen mittels MALDI-TOF-MS meist ein interner Standard eingesetzt, der strukturell dem zu messenden Stoff ähnlich ist. Im vorliegenden Fall einer quantitativen Charakterisierung des Zerfallsprozesses konnte man auf die Einführung eines internen Standards verzichten, da die Komponenten der Reaktionsmischung strukturell und chemisch sehr verwandt sind. Es handelt sich um Pyridiniumsalze, die schon als Kationen vorliegen.

Vor Messung des Zerfallprozesses wurden Nachweisgrenzen und Abhängigkeiten von Peakintensität zu Konzentration der einzelnen Abbauprodukte ermittelt. Für diese Untersuchungen hat sich DHAP als eine gute Matrix erwiesen. Es ist zu beobachten, daß der Zusammenhang zwischen Analytkonzentration und Signalintensität nicht linear verläuft. Viele Faktoren, wie Ionisierbarkeit der Verbindung, Wechselwirkungen mit der Matrix, Fragmentierungsverhalten spielen hier eine Rolle und sind für jede Verbindung anders zu bewerten. Deshalb wurden für verschiedene Konzentrationen der jeweiligen Verbindung die Peakhöhen detektiert. Man kann über bestimmte Konzentrationsbereiche einen linearen Anstieg der Peakhöhen zur Konzentration feststellen. Um den Bereich der Linearität zu bestimmen, werden Proben unterschiedlicher Konzentration in einem standardisierten Meßregime vermessen und die relative basislinienkorrigierte Peakhöhe im Spektrum zur eingesetzten Konzentration aufgetragen. Der Bereich, in dem eine lineare Abhängigkeit zwischen Konzentration des Analyten auf dem Probenkopf und detektierter Menge bzw. Peakhöhe im Spektrum gewährleistet ist, muß bei den Zerfallsuntersuchungen beachtet werden. In den Abbildungen 61 bis 63 sind die Abhängigkeiten von Peakhöhen und Analytkonzentration der drei für den Zerfall von Z-Phe-Pro-CH₂-Isonicotinsäuremethylester relevanten Verbindungen dargestellt.

Jeder individuelle Punkt auf dieser Kurve repräsentiert die relative Intensität von drei separat aufgenommenen Massenspektren mit einem Standardfehler zwischen 3,3 und 10,6 %. Für die drei Verbindungen wurde ein lineares Verhalten der Abhängigkeit zwischen detektierter Signalintensität und Probenmenge bis auf eine Konzentration von 14 µM herunter festgestellt.

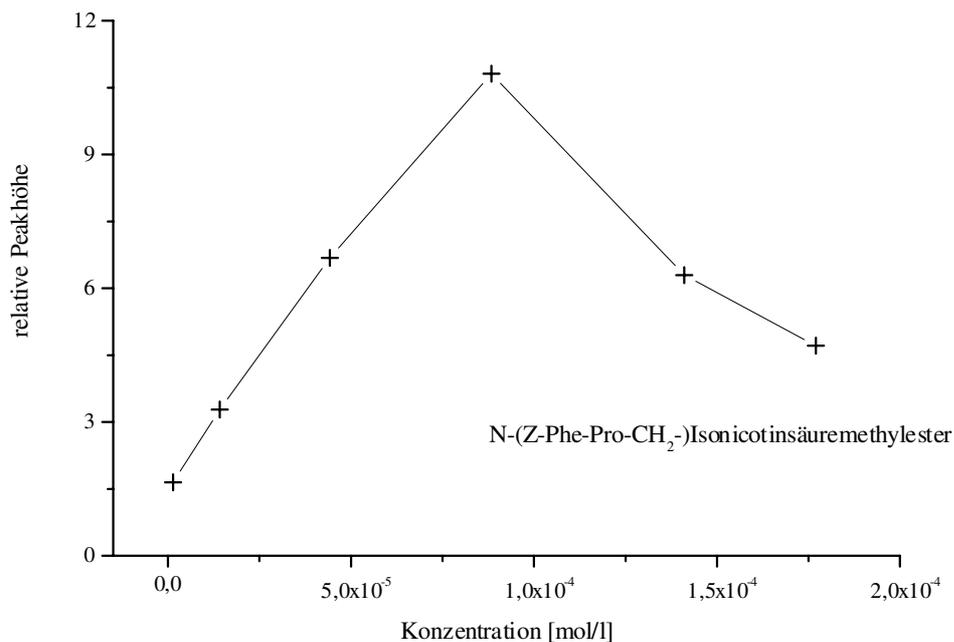


Abb. 61: Abhängigkeit zwischen Konzentration des Analyten N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester und Signalintensität

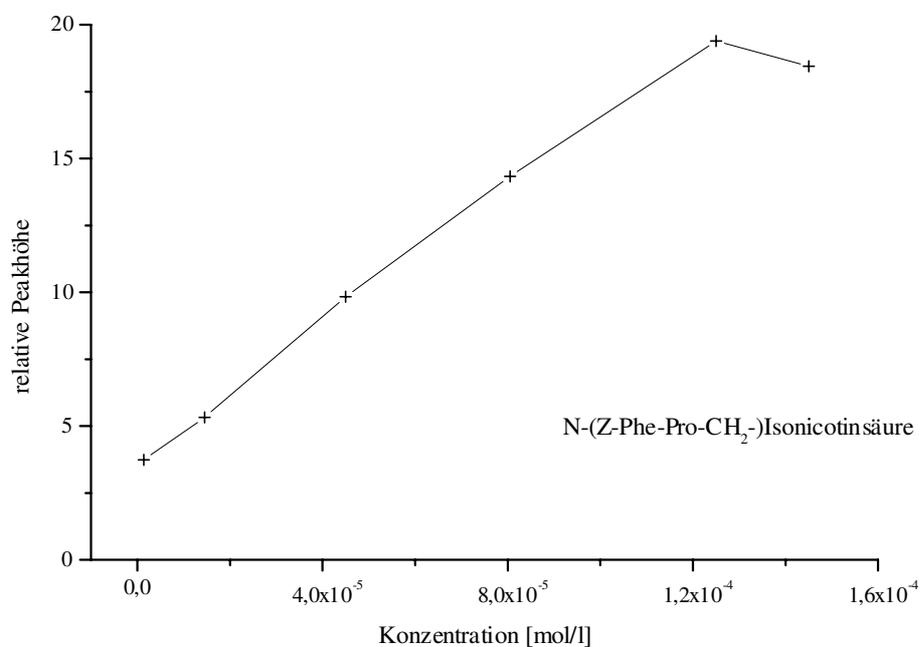


Abb. 62: Abhängigkeit zwischen Konzentration des Analyten N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure und Signalintensität

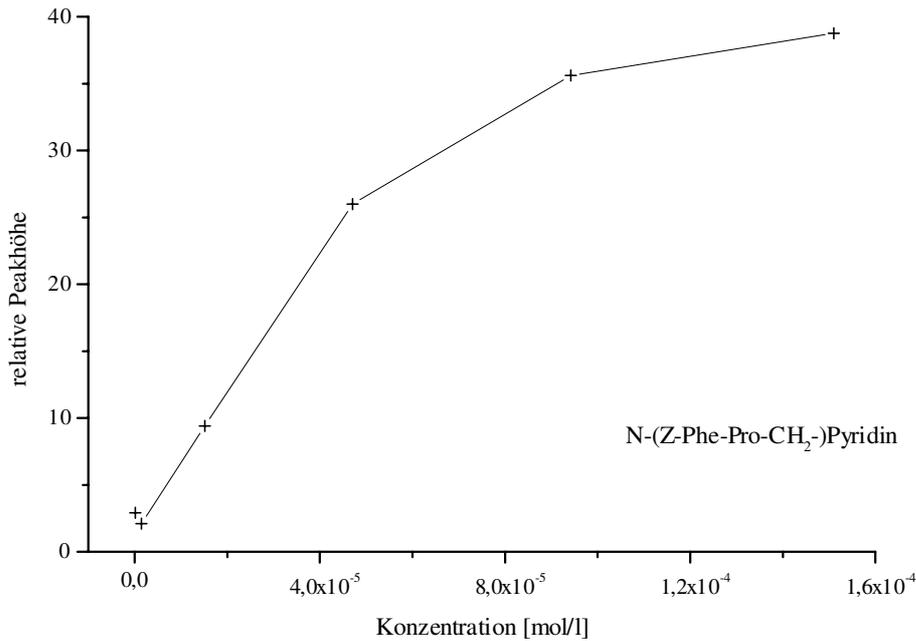


Abb. 63: Abhängigkeit zwischen Konzentration des Analyten N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyridin und Signalintensität

Spektralphotometrische Bestimmung der nichtenzymatischen Zerfallsgeschwindigkeiten N-terminal ungeschützter Dipeptidyl-Pyridinium-Methylketone

Zu Beginn wurde durch die zyklische Aufnahme der UV-Spektren der jeweiligen Verbindung im Meßpuffer eine geeignete Wellenlänge bestimmt, bei der eine maximale Änderung der Extinktion auf Grund des nichtenzymatischen Zerfalls zu beobachten war. Danach erfolgte bei dieser konstanten Wellenlänge die Bestimmung der Geschwindigkeit des nichtenzymatischen Zerfalls unter Standardbedingungen mit einem automatischen 6fach-Küvettenwechsler. Die Quarz-Küvetten waren luftdicht durch Teflonstopfen verschlossen.

Dabei wurde folgender Meßansatz verwendet:

- 2 ml Standardpuffer (pH = 7,6)
- ca. 0,5 - 0,7 mg Inhibitor (fest)

Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten erfolgte durch Auswertung der Meßdaten (Extinktion/Zeit-Wertpaare) nach einer Reaktion erster Ordnung.

Standard-Stabilitätsbestimmung der Z-geschützten Peptidyl-Pyridinium-Methylketone

Die hydrolytische Stabilität aller Verbindungen in pufferfreier, leicht saurer wässriger Lösung wurde mittels HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Sie sind unter diesen Bedingungen bis zu 24 h bei 10 °C stabil (Ausnahmen sind im Text beschrieben).

LC/MS-System

Verwendet wurde das API 365 der Firma Perkin-Elmer Applied Biosystems. Das Gerät ist mit einem API Interface und der quadrupol-Technologie ausgestattet. Die Daten wurden über das MassChrom Data System aufgezeichnet.

HPLC

Die quantitativen Trennungen der Verbindungen wurden an einem HPLC-Gerät der Firma Merck-Hitachi, ausgestattet mit einer L 6200 Intelligent-Pumpe, einem L 4250 UV-Vis-Detektor und einem LC Organizer ELV 7000, für die Unterbringung der Säulen, durchgeführt. Analytische Untersuchungen wurden an einem Gerät der Firma Hewlett Packard der Serie 1050 mit einem Dioden-Array-Detektor des HPLC-Detektionssystems 1040 M der Serie II ausgeführt.

Die verwendeten Chromatographiesäulen sind den Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen im Kapitel 4.5. zugeordnet.

Dünnschichtchromatographie

Zur dünnschichtchromatographischen Kontrolle der Reaktionsabläufe und Endprodukte wurden DC-Alufolien (Kieselgel 60 WF_{254S}) der Firma Merck mit folgenden Laufmitteln verwendet:

(die angegebenen Verhältnisse beziehen sich auf die verwendeten Volumina)

- | | | |
|----|--------------------------------------|----------|
| A) | Dichlormethan/Methanol | 9/1 |
| B) | n-Butanol/Eisessig/Essigester/Wasser | 1/1/1/1 |
| C) | sek. Butanol/Ameisensäure/Wasser | 75/10/15 |

Die Verbindungen wurden mittels UV-Licht (254 nm) und nachfolgender Anfärbung mit 0,2 %iger Ninhydrinlösung in Aceton detektiert.

Elementaranalyse

Die Durchführung der Elementaranalyse erfolgte am Fachbereich Chemie und Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit einem automatischen CHN-Analysator.

Kernresonanzspektrometrie

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an Geräten der Firma Bruker (ARX 500) und Varian (UNITY 500) aufgenommen. Die APT-Meßtechnik wurde zusätzlich zur Strukturaufklärung genutzt. Die chemischen Verschiebungen der Verbindungen beziehen sich in organischen Lösungsmitteln auf den internen Standard TMS (0,05 % v/v) und sind in ppm angegeben.

Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut

Die Analyse der Glukosekonzentration im Blut wurde mit einem Handgerät der Firma Lifescan Canada Ltd, Burnaby durchgeführt. Die Teststreifen (Accutrend Glukose, Code 009, 30. Sept. 98, 24200936) wurden von der Firma Boehringer Mannheim bezogen. Die Analyse wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Radioimmunoassay zur Bestimmung der Insulin-Konzentration

Die Insulin-Konzentration wurde nach dem von Pederson beschriebenen Analysenverfahren bestimmt [308]. Dabei wurde Insulin als Standard und anti-humanes-Insulinserum aus Meerschweinchen (GPO 1) verwendet.

4.4. Allgemeine Synthesevorschriften

Die Peptidsynthesen erfolgten nach den üblichen Methoden der Peptidbindungsknüpfung und Schutzgruppeneinführung. Alle eingesetzten Chemikalien und Lösungsmittel stammen, soweit nicht anders angegeben, von kommerziellen Anbietern (Produkte der Firmen: Fluka, Merck, Aldrich, Sigma, BACHEM, Novabiochem) und werden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Mischanhydridmethode (Methode A)

10 mmol einer N-terminal geschützten Aminosäure werden in 30 ml absolutem THF gelöst. Die Lösung wird in einem Kältebad auf - 40 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur werden unter Rühren 10 mmol NMM und 5 min später 10 mmol CAIBE zugegeben. Der entstandenen weißen Suspension werden nach weiteren 20 min 10 mmol der zweiten, C-terminal geschützten Aminokomponente zugesetzt. Liegt die Verbindung als Salz vor, wird der Reaktionsansatz gleichzeitig mit weiteren 10 mmol NMM versetzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung 1 h in der Kälte und weitere 12 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird der Reaktionsansatz mit Wasser versetzt. Der THF-Anteil wird im Wasserstrahlpumpenvakuum am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Produkt wird aus dem Rückstand 3 x mit je 20 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden 1 x mit ges. NaCl-Lösung, 2 x mit je 20 ml 5 %iger KHSO₄-Lösung, 2 x mit je 20 ml ges. NaHCO₃-Lösung und abschließend nochmals mit 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum kann die Verbindung aus Essigester/Ether kristallisiert werden.

Esterhydrolyse (Methode B)

1 mmol Peptidylmethylester wird in 10 ml Dioxan und 11 ml 0,1 M NaOH-Lösung gelöst und bei RT gerührt. Der Verlauf der Verseifung wird mittels DC verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Dioxan im Vakuum weitgehend entfernt. Die verbleibende wässrige Lösung wird mit 10 ml Wasser verdünnt. Nach Waschen mit Essigsäureethylester wird die wässrige Phase mit 1 M HCl-Lösung auf pH 2 - 3 angesäuert. Anschließend extrahiert man das C-terminal freie Peptid 3 x mit je 10 ml Essigsäureethylester. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 10 ml NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem

Einengen am Rotationsverdampfer bei 10 mbar ist eine Kristallisation aus Essigsäureethylester/Ether möglich.

Darstellung der Chlormethylketon-Derivate (Methode C)

Chlormethylketone lassen sich aus einem gemischten Anhydrid durch Reaktion mit Diazomethan und anschließender salzsaurer Aufarbeitung herstellen.

Zur Darstellung von Diazomethan werden 15 ml einer 40 %igen NaOH-Lösung vorgelegt und mit 50 ml Ether überschichtet. Bei 0 °C werden über eine Dauer von 15 min 50 mmol N-Nitroso-N-methylharnstoff in kleinen Portionen eingetragen. 10 min nach der letzten Zugabe dekantiert man die etherische Diazomethanphase ab und trocknet sie über NaOH (fest) unter Eiskühlung für 3 h.

In einem Rundkolben werden 10 mmol eines C-terminal ungeschützten Peptids, in 30 ml absolutem THF gelöst, vorgelegt. Die Lösung wird in einem Kältebad auf – 40 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur werden unter Rühren 10 mmol NMM und 5 min später 10 mmol CAIBE zugegeben. Die entstandene weiße Suspension wurde abgesaugt und das Filtrat mit der zuvor bereiteten Diazomethanlösung bei – 20 °C versetzt und 5 h bei 0 °C nachgerührt. Anschließend wird eine etherische HCl-Lösung so lange zugesetzt, bis keine Gasbildung mehr zu erkennen ist. Der Reaktionsansatz wird über Nacht nachgerührt. Die Lösung wird eingeeengt, 5 x mit je 25 ml Ethanol versetzt und erneut eingeeengt.

Festphasenpeptidsynthese: Fmoc-Strategie (Methode D)

Das Harz wird nach Kupplung der ersten Fmoc-Aminosäure in das Reaktionsgefäß gegeben. Im Batch-Verfahren startet der Syntheszyklus mit zwei einminütigen DMF-Waschschritten. Die Schutzgruppenabspaltung erfolgt mit einer 20 %igen Piperidinlösung in DMF in einem drei- bzw. einminütigen Behandlungsschritt. Es folgen 4 DMF-, 2 DCM- und wieder 4 DMF-Waschschritte von jeweils einer Minute Dauer. Nun erfolgt die manuelle Zugabe der Fmoc-Aminosäure und TBTU als Kupplungsreagenz in DMF in je zweifachem Überschuß. Die Konzentration sollte mindestens 0,3 mmol/ml betragen. Die Base N-Ethyldiisopropylamin wird in 4fachem molaren Überschuß zugegeben. Es wird 12 Minuten geschüttelt und anschließend nach dem Absaugen der Lösung dieselbe Menge Aminosäure, Base und Kupplungsreagenz in DMF zugegeben und erneut 12 Minuten geschüttelt. Auf Vollständigkeit der Reaktion wird mittels Kaisertest geprüft. Anschließend wird 3 mal mit

DMF, 3 mal mit Isopropanol und 2 mal mit DCM jeweils eine Minute gewaschen. Bei allen Waschsritten wird eine Lösungsmittelmenge von 15 ml/g Harz verwendet.

Peptid-Syntheseautomat:

Alle Synthesen an Harzen wurden im LABORTEC Peptide Synthesizer SP 4000 durchgeführt. Der SP 4000 ist ein halbautomatisiertes Gerät. Es führt alle Waschsritte und die Schutzgruppen-Abspaltung automatisch durch. Aminosäuren und Kupplungsreagenzien müssen manuell zugegeben werden. Das Absaugen der flüssigen Phase wird über eine Wasserstrahl-Vakuumpumpe geregelt.

Reagenzien für den Kaisertest:

- I. 65 mg KCN werden in 100 ml Wasser gelöst. 2 ml dieser Lösung werden mit Pyridin auf 100 ml aufgefüllt.
- II. 40 g Phenol werden unter leichtem Erwärmen in 10 ml n-Butanol gelöst.
- III 2,5 g Ninhydrin werden in 50 ml Ethanol gelöst.

Externe Kupplung des Sasrin- oder Wang-Harzes (Methode E)

Man läßt 1,5 g Harz (Beladung: 0,97 mmol/g) in 20 ml Dichlormethan 20 min quellen. Für die Kupplung der ersten Aminosäure verwendet man 20 ml Dichlormethan, 1 ml DMF, 4 Äquivalente Fmoc-Xaa-OH, 0,2 Äquivalente DMAP, 1 Äquivalente NMM und 4 Äquivalente DCC. Die Reagenzien werden in der angegebenen Reihenfolge zugegeben und 10 h geschwenkt. Nach erfolgter Kupplung wird das Lösungsmittel abgesaugt, und je einmal mit Dichlormethan, DMF und Isopropanol gewaschen. Unbesetzte Kupplungsstellen am Harz (Kaiser-Test) werden mit 6 Äquivalenten (0,62 ml) Essigsäureanhydrid, 0,6 ml Pyridin und 1,2 Äquivalenten (ca. 150 mg) DMAP abgesättigt.

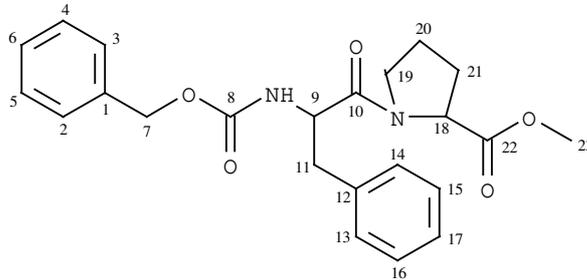
Abspaltung der Z-Schutzgruppe mit HBr/Eisessig (Methode F)

1 mmol Z-geschütztes Peptid versetzt man mit 2 ml HBr/Eisessig (33 %ig) und läßt es bei 23 °C ca. 10 min rühren. Anschließend wird im Vakuum eingeengt. Das Peptid wird gegebenenfalls als Hydrobromid mit Diethylether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

4.5. Synthesebeschreibung einzelner Verbindungen

Z-Phe-Pro-OMe

Strukturformel:



Darstellung: Z-Phe-OH reagiert nach der Mischanhydridmethode (Methode A) mit H-Pro-OMe.

Summenformel: $C_{23}H_{26}N_2O_5$

Molmasse: 410,47 Da

Ausbeute: 96 % d. Th.

DC R_f -Wert (System): 0,89 (A); 0,95 (B); 0,96 (C)

HPLC: Retentionszeit: 5,5 min, LiChrosper 125 RP-18 (125-4); $\lambda = 220$ nm, Flußrate 1,0 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0,1 % TFA)

1H -NMR (DMSO- d_6) δ_H : 1,7-1,9 (2H, m, H_{20}); 1,8-2,0 (2H, m, H_{21}); 2,7-3,0 (2H, m, H_{11}); 3,6 (3H, s, H_{23}); 3,7-3,9 (2H, m, H_{19}); 4,3-4,4 (1H, dd, H_{18}); 4,4-4,5 (1H, m, H_9); 4,9 (2H, s, H_7); 7,0-7,4 (10H, m, H_2 - H_6 u. H_{13} - H_{17}); 7,7 (1H, d, NH)

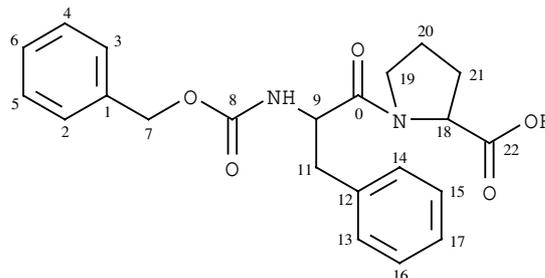
^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ_C : 137,1 (C_1); 127,8 (C_2, C_3); 127,6 (C_4, C_5); 128,2 (C_6); 65,3 (C_7); 156,0 (C_8); 54,2 (C_9); 170,3 (C_{10}); 36,5 (C_{11}); 137,8 (C_{12}); 126,5 (C_{13}, C_{14}); 128,4 (C_{15}, C_{16}); 129,4 (C_{17}); 58,6 (C_{18}); 46,4 (C_{19}); 24,5 (C_{20}); 28,5 (C_{21}); 172,4 (C_{22}); 51,7 (C_{23})

MALDI-TOF-MS m/z: 411,4 Da ($M+H^+$)

Elementaranalyse (%):
ber.: C 67,30 H 6,38 N 6,82
gef.: C 67,14 H 6,02 N 6,55

Z-Phe-Pro-OH (aus Z-Phe-Pro-OMe)

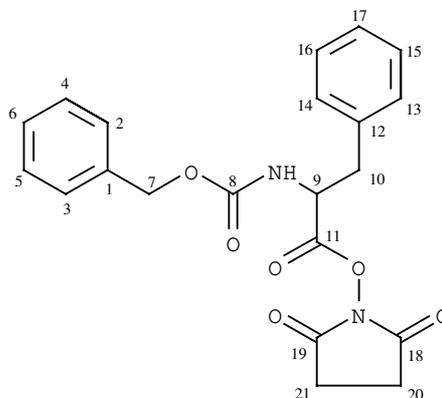
Strukturformel:



Darstellung:	Die Hydrolyse von Z-Phe-Pro-Methylester wird nach Methode B durchgeführt.			
Summenformeln:	$C_{22}H_{24}N_2O_5$			
Molmasse:	396,44 Da			
Ausbeute:	81 % d. Th.			
DC R _f -Wert (System):	0,84 (A); 0,94 (B); 0,94 (C)			
HPLC:	Retentionszeit: 3,1 min, LiChrosper 125 RP-18 (125*4); $\lambda = 220$ nm, Flußrate 1,0 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H ₂ O (0,1 % TFA)			
¹ H-NMR (DMSO-d ₆) δ_H :	1,7-2,0 (4H, m, H ₂₀ , H ₂₁); 2,7-3,0 (2H, m, H ₁₁); 3,5-3,8 (2H, m, H ₁₉); 4,2-4,3 (1H, m, H ₁₈); 4,4-4,5 (1H, m, H ₉); 4,9 (2H, s, H ₇); 7,1-7,4 (10H, m, H ₂ -H ₆ , H ₁₃ -H ₁₇); 7,6-7,7 (1H, d, NH); 12,5 (1H, s, OH);			
¹³ C-NMR (DMSO-d ₆) δ_C :	137,0 (C ₁); 127,7 (C ₂ , C ₃); 127,5 (C ₄ , C ₅); 128,1 (C ₆); 65,3 (C ₇); 155,9 (C ₈); 54,2 (C ₉); 170,0 (C ₁₀); 36,4 (C ₁₁); 137,8 (C ₁₂); 126,4 (C ₁₃ , C ₁₄); 128,3 (C ₁₅ , C ₁₆); 129,3 (C ₁₇); 58,6 (C ₁₈); 46,4 (C ₁₉); 24,6 (C ₂₀); 28,5 (C ₂₁); 173,2 (C ₂₂)			
MALDI-TOF-MS m/z:	397,4 Da (M+H ⁺)			
Elementaranalyse (%):	ber.:	C 66,65	H 6,10	N 7,07
	gef.:	C 66,47	H 5,93	N 6,81

Z-Phe-OSu

Strukturformel:

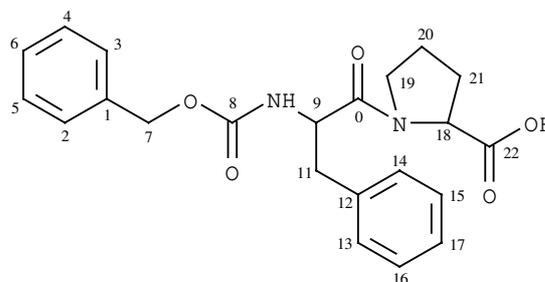


Darstellung: 10 mmol Z-Phe-OH werden zusammen mit 10 mmol HOSu in 30 ml Dioxan vorgelegt. Bei 0 °C wird zu dieser Lösung ein Equivalent einer einmolaren DCC-Lösung in Dioxan zugetropft. Es wird 5 Stunden gerührt, der ausgefallene Harnstoff abgesaugt, und das Filtrat eingengt. Der Rückstand wird in Essigsäureethylester aufgenommen und erneut vom ausgefallenen Harnstoff getrennt. Das Produkt wird in Pentan auskristallisiert, abfiltriert und getrocknet.

Summenformen:	$C_{21}H_{20}N_2O_6$
Molmasse:	396,4 Da
Ausbeute:	92,8 % d. Th.
HPLC:	Retentionszeit: 5,4 min, Serva 250-4 RP-18, $\lambda = 220$ nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 70 % Acetonitril in H_2O (0,1 % TFA)
1H -NMR (DMSO- d_6) δ_H :	2,8 (4H, s, H_{20}, H_{21}); 3,0-3,2 (2H, dd, H_{10}); 4,6-4,8 (1H, m, H_9); 5,0 (2H, s, H_7); 7,2-7,4 (10H, m, H_2, H_6 u. H_{13}, H_{17}); 8,1 (1H, d, NH)
^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ_C :	136,4 (C_1); 127,8 (C_2, C_3, C_6); 127,5 (C_4, C_5); 65,6 (C_7); 155,8 (C_8); 53,7 (C_9); 36,3 (C_{10}); 169,9 (C_{11}); 136,7 (C_{12}); 126,8 (C_{13}, C_{14}); 128,3 (C_{15}, C_{16}); 129,2 (C_{17}); 168,1 (C_{18}, C_{19}); 25,5 (C_{20}, C_{21})
MALDI-TOF-MS m/z:	419,5 Da ($M+Na^+$); 435,5 Da ($M+K^+$)

Z-Phe-Pro-OH (aus Z-Phe-OSu)

Strukturformel:



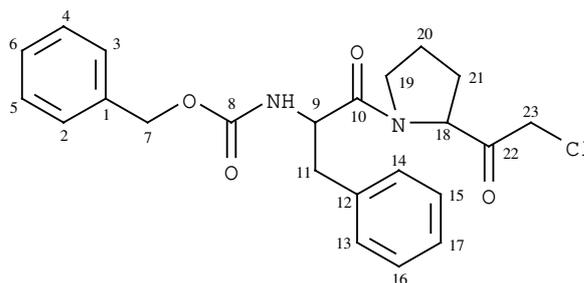
Darstellung:

10 mmol Prolin und 20 mmol $NaHCO_3$ werden in 30 ml Wasser gelöst. Die in 20 ml THF gelösten 10 mmol Z-Phe-OSu werden bei 23 °C zugetropft. Die Suspension läßt man 8 Stunden rühren, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Der THF-Anteil wird am Rotationsverdampfer abgetrennt und der wässrige Rückstand auf pH 2-3 eingestellt. Das Produkt wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Auszüge werden mit $KHSO_4$ und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wird nach dem Einengen weiter eingesetzt.

Summenformen:	$C_{22}H_{24}N_2O_5$
Molmasse:	396,44 Da
Ausbeute:	65,5 % d. Th.
HPLC:	Retentionszeit: 17,6 min, LiChroCART 125-4, 100 RP-18, $\lambda = 220$ nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 40 % Acetonitril in H_2O (0,1 % TFA)
MALDI-TOF-MS m/z:	397,3Da ($M+H^+$)

Z-Phe-Pro-CH₂Cl

Strukturformel:



Darstellung:

Z-Phe-Pro-OH wird nach Methode C mittels Diazomethan zum Z-Phe-Pro-Chlormethylketon umgesetzt. Auf eine gründliche Aufarbeitung wird verzichtet. Die Verbindung wird unmittelbar in die Folgereaktion eingesetzt. Als Verunreinigungen entstehen der entsprechende Methylester bzw. das Hydroxymethylketon.

Summenformeln:

C₂₃H₂₅N₂O₄Cl

Molmasse:

428,91 Da

Ausbeute:

93,4% d. Th. Rohprodukt

DC R_F-Wert (System):

0,94 (B); 0,78 (C)

HPLC:

Retentionszeit: 12,4 min, LiChrosper RP-18 (5 mm);
λ = 220 nm, Flußrate 1,0 ml/min, 10 - 100 % Gradient
Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA) in 30 min

Retentionszeit: 8,9 min, LiChrosper 100 RP-8 (125-4);
λ = 220 nm, Flußrate 1,5 ml/min, 30 - 70 % Gradient Acetonitril
in H₂O (0,1 % TFA) in 25 min

Retentionszeit: 16,8 min, LiChrosper 100 RP-8 (125*4);
λ = 220 nm, Flußrate 0,8 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in
H₂O (0,1 % TFA)

Retentionszeit: 21,8 min, Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm,
Flußrate 8 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 %
TFA)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H:

1,7-2,0 (4H, m, H₂₀, H₂₁); 2,7-3,0 (2H, ddd, H₁₁); 3,4-3,8 (2H,
m, H₁₉); 4,0-4,3 (1H, m, H₁₈); 4,4-4,5 (1H, m, H₉); 4,3-4,6 (2H,
dd, H₂₃); 4,9 (2H, s, H₇); 7,1-7,4 (10H, m, H₂-H₆, H₁₃-H₁₇); 7,6-
7,7 (1H, d, NH)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:

136,8 (C₁); 127,7 (C₂, C₃); 127,5 (C₄, C₅); 128,1 (C₆); 65,3 (C₇);
155,8 (C₈); 53,9 (C₉); 170,3 (C₁₀); 36,4 (C₁₁); 137,4 (C₁₂); 126,4
(C₁₃, C₁₄); 128,2 (C₁₅, C₁₆); 129,2 (C₁₇); 63,0 (C₁₈); 46,7 (C₁₉);
24,8 (C₂₀); 27,8 (C₂₁); 200,3 (C₂₂); 47,4 (C₂₃)

MALDI-TOF-MS m/z:

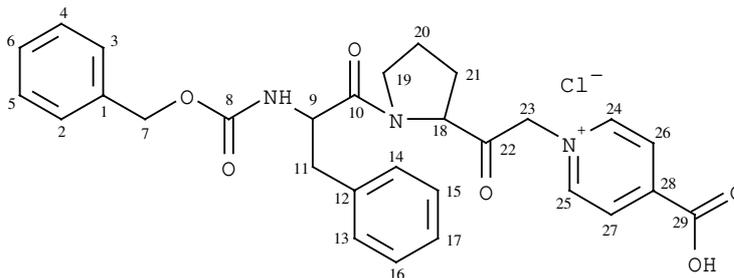
429,0 Da (M+H⁺); 451,1 (M+Na⁺)

Elektrospray-MS:

429,1 Da (M+H⁺)

Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-p-COOH / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

10 mmol Z-Phe-Pro-Chlormethylketon und 20 mmol Isonicotinsäure werden in jeweils 15 ml DMSO gelöst und die beiden Lösungen bei 25 °C zusammengegeben. Es wird 5 Tage bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in einem Aceton-Ethanol-Gemisch (1 : 1 Vol.-Teile) suspendiert. Die bei 0 °C ausfallende Isonicotinsäure wird über eine Fritte abgetrennt. Das Filtrat wird über 20 g Kieselgel gereinigt. Im Eluat (Chloroform/Methanol 9 : 1 bis 1 : 1) wird anfangs das Chlormethylketon und mit zunehmender Polarität des Eluenten das Produkt aufgefangen. N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäure wird anschließend einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Summenformen:

C₂₉H₃₀N₃O₆Cl

Molmasse:

552,02 Da

Ausbeute:

24,3% d. Th.

DC R_F-Wert (System):

0,15 (A); 0,66 (B); 0,57 (C)

HPLC:

Retentionszeit: 2,8 min, LiChrosper 100 RP-8 (125*4);
 λ = 220 nm, Flußrate 1,5 ml/min, 30 - 80 % Gradient Acetonitril
 in H₂O (0,1 % TFA) in 25 min

Retentionszeit: 8,1 min, LiChrosper 100 RP-8 (125*4);
 λ = 220 nm, Flußrate 0,8 ml/min, isokratisch 35 % Acetonitril in
 H₂O (0,1 % TFA)

Retentionszeit: 9,3 min, Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm,
 Flußrate 8 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 %
 TFA)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H:

1,7-2,1 (4H, m, H₂₀ u. H₂₁); 2,7-3,0 (2H, m, H₁₁); 3,5-3,9 (2H, m,
 H₁₉); 4,4-4,6 (2H, m, H₂₄ u. H₂₅); 4,6-4,8 (1H, m, H₉); 4,9-5,1
 (2H, dd, H₇); 5,7-5,8 (1H, d, H₁₈); 5,9-6,1 (2H, dd, H₂₃); 7,1-7,4
 (10H, m, H₂-H₆, H₁₃-H₁₇); 8,4-8,5 (2H, d, 7 Hz, H₂₆ u. H₂₇); 8,8-
 8,9 (1H, d, 7 Hz, NH); 13,3 (1H, br, OH)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:

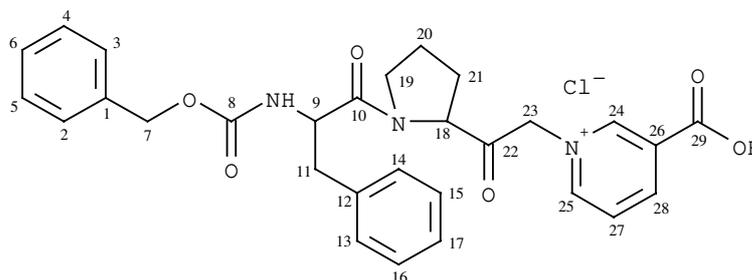
135,4 (C₁); 127,5 (C₂, C₃, C₆); 125,6 (C₄, C₅); 66,2 (C₇); 156,9
 (C₈); 47,0 (C₉); 171,5 (C₁₀); 41,0 (C₁₁); 144,2 (C₁₂); 120,5 (C₁₃,
 C₁₄); 128,1 (C₁₅, C₁₆); 129,8 (C₁₇); 63,5 (C₁₈); 43,7 (C₁₉); 25,6
 (C₂₀); 29,3 (C₂₁); 198,4 (C₂₂); 77,0 (C₂₃); 147,2 (C₂₄, C₂₅); 124,3
 (C₂₆, C₂₇); 136,0 (C₂₈); 169,9 (C₂₉)

MALDI-TOF-MS m/z:

516,7 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-m-COOH / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

Sowohl 10 mmol Z-Phe-Pro-Chlormethylketon als auch 20 mmol Nicotinsäure werden in je 15 ml DMSO gelöst und die beiden Lösungen bei 25 °C zusammengegeben. Es wird 5 Tage bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in einem Aceton-Ethanol-Gemisch (1 : 1 Vol.-Teile) suspendiert. Die bei 0 °C ausfallende Nicotinsäure wird über eine Fritte abgetrennt. Das Filtrat wird über 20 g Kieselgel gereinigt. Im Eluat (Chloroform/Methanol 9 : 1 bis 1 : 1) wird anfangs das Chlormethylketon und mit zunehmender Polarität des Eluenten das Produkt aufgefangen. Das N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Nicotinsäure wird abschließend einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Summenformen:

C₂₉H₃₀N₃O₆Cl

Molmasse:

552,02 Da

Ausbeute:

80,6 % d. Th.

DC R_f-Wert (System):

0,19 (A); 0,53 (B); 0,49 (C)

HPLC:

Retentionszeit: 2,8 min, LiChrosper 100 RP-8 (125*4);
λ = 220 nm, Flußrate 1,5 ml/min, 30 - 80 % Gradient Acetonitril
in H₂O (0,1 % TFA) in 25 min

Retentionszeit: 4,5 min, LiChrosper 100 RP-18, λ = 220
nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O
(0,1 % TFA)

Retentionszeit: 13,4 min, 125-4 LiChrospher, λ = 220 nm,
Flußrate 1 ml/min, Gradient 10 - 100 % Methanol in H₂O (0,1 %
TFA) in 30 min

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H:

1,7-2,1 (4H, m, H₂₀ u. H₂₁); 2,7-3,0 (2H, m, H₁₁); 3,5-3,8 (2H, m, H₁₉); 4,3-4,4 (2H, m, H₂₄ u. H₂₅); 4,4-4,5 (1H, m, H₉); 4,9-5,1 (2H, d, 10 Hz, H₇); 5,7-6,0 (3H, m, H₁₈, H₂₃); 7,1-7,4 (11H, m, H₂-H₆, H₁₃-H₁₇, H₂₇); 7,6 (1H, d, 8 Hz, H₂₈); 8,4 (1H, m, 7 Hz, NH); 9,4 (1H, s, OH)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:

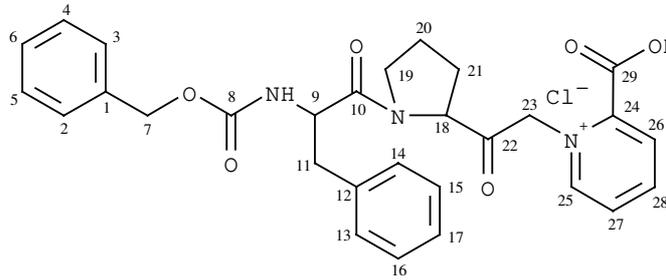
139,3 (C₁); 129,3 (C₂, C₃); 129,1 (C₄, C₅); 129,2 (C₆); 66,8 (C₇); 157,5 (C₈); 55,6 (C₉); 174,8 (C₁₀); 37,8 (C₁₁); 139,4 (C₁₂); 127,9 (C₁₃, C₁₄); 129,8 (C₁₅, C₁₆); 129,7 (C₁₇); 60,1 (C₁₈); 47,8 (C₁₉); 25,9 (C₂₀); 29,9 (C₂₁); 201,5 (C₂₂); 71,9 (C₂₃); 132,2 (C₂₄); 130,9 (C₂₅, C₂₈); 138,5 (C₂₆); 129,7 (C₂₇); 171,6 (C₂₉)

MALDI-TOF-MS m/z:

516,5 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-o-COOH / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

Sowohl 10 mmol Z-Phe-Pro-Chlormethylketon als auch 20 mmol Picolinsäure werden in je 15 ml DMSO gelöst und die beiden Lösungen bei 25 °C zusammengegeben. Es wird 1 Woche bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in einem Pentan-Chloroform-Gemisch (1 : 1 Vol,-Teile) suspendiert. Die bei 0 °C ausfallende Picolinsäure wird über eine Fritte abgetrennt. Das Filtrat wird über 20 g Kieselgel gereinigt. Im Eluat (Chloroform/Methanol 9 : 1 bis 1 : 1) wird anfangs (7 : 3) das Chlormethylketon und mit zunehmender Polarität des Eluenten das Produkt aufgefangen. Das N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Picolinsäure wird abschließend einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Summenformen:

C₂₉H₃₀N₃O₆Cl

Molmasse:

552,02 Da

Ausbeute:

12,5 % d. Th.

DC R_f-Wert (System):

0,25 (A); 0,44 (B); 0,39 (C)

HPLC:

Retentionszeit: 1,2 min, LiChrosper 100 RP-8 (125*4);
 $\lambda = 220$ nm, Flußrate 1,5 ml/min, 30 - 80 % Gradient Acetonitril
 in H₂O (0,1 % TFA) in 25 min

Retentionszeit: 2,5 min, 125-4 LiChrosper, $\lambda = 220$ nm,
 Flußrate 1 ml/min, 10 - 100 % Gradient Acetonitril in H₂O (0,1
 % TFA) in 30 min

Retentionszeit: 7,3 min, Nucleosil, $\lambda = 220$ nm, Flußrate 8
 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C :

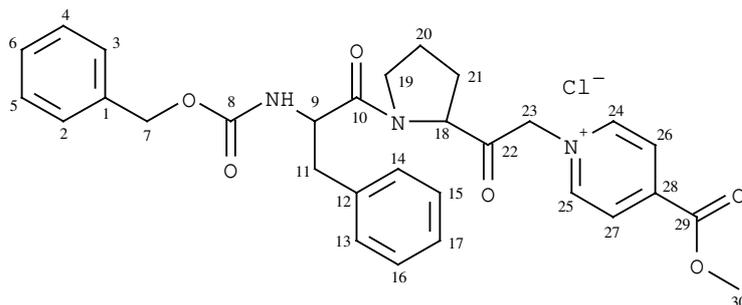
139,1 (C₁); 128,6 (C₂-C₆, C₁₃-C₁₇, C₂₆, C₂₇); 61,2 (C₇); 159,7
 (C₈); 40,4 (C₉); 167,8 (C₁₀, C₂₉); 35,0 (C₁₁); 120,3 (C₁₂); 65,8
 (C₁₈); 46,0 (C₁₉); 19,5 (C₂₀); 31,0 (C₂₁); 200,0 (C₂₂); 64,7 (C₂₃);
 150,0 (C₂₄); 151,0 (C₂₅); 139,1 (C₂₈)

MALDI-TOF-MS m/z:

517,1 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-p-COOMe / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

Sowohl 10 mmol Z-Phe-Pro-Chlormethylketon als auch 20 mmol Isonicotinsäuremethylester werden in je 15 ml Aceton und einigen Tropfen Ethanol gelöst und die beiden Lösungen bei 25 °C zusammengegeben. Es wird 4 Tage bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird bei 10 mbar Vakuum abdestilliert. Das Rohprodukt wird über 60 g Kieselgel gereinigt. Im Eluat Chloroform/Methanol wird anfangs (9 : 1 Vol.-Teile) das Chlormethylketon und mit zunehmender Polarität des Eluenten das Produkt aufgefangen. N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Isonicotinsäuremethylester wird abschließend einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Summenformeln:

C₃₀H₃₂N₃O₆Cl

Molmasse:

566,05 Da

Ausbeute:

22,5 % d. Th.

DC R_f-Wert (System):

0,31 (A); 0,71 (B); 0,59 (C)

HPLC:

Retentionszeit: 20,5 min, LiChrosper 100 RP 8 (5 mm);
λ = 220 nm, Flußrate 1,0 ml/min, Gradient 10 - 100 % Methanol
in H₂O (0,1 % TFA) in 30 min

Retentionszeit: 7,2 min, LiChrosper 100 RP-8 (125*4);
λ = 220 nm, Flußrate 1,5 ml/min, Gradient 30 - 80 % Acetonitril
in H₂O (0,1 % TFA) in 25 min

Retentionszeit: 9,8 min, Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm,
Flußrate 8 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 %
TFA)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H:

1,7-2,0 (4H, m, H₂₀, H₂₁); 2,7-3,0 (2H, ddd, H₁₁); 3,2-3,4 (1H,
m, H₁₈); 3,4-3,8 (2H, m, H₁₉); 3,9 (3H, s, H₃₀); 4,4-4,6 (6H, m,
H₉, H₁₈, H₂₃-H₂₅); 4,9 (2H, dd, H₇); 7,1-7,4 (10H, m, H₂-H₆, H₁₃-
H₁₇); 7,6-7,7 (1H, d, NH); 7,8 (1H, d, H₂₆); 8,8 (1H, d, H₂₇)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:

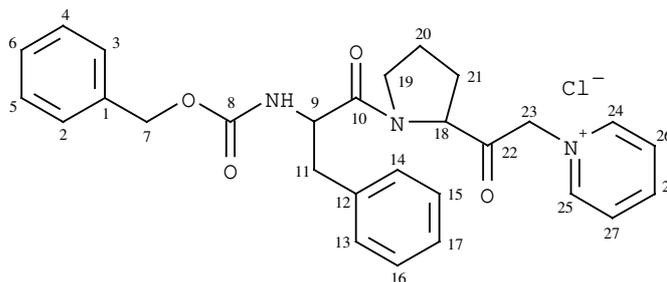
136,8 (C₁); 127,6 (C₂, C₃); 127,5 (C₄, C₅); 128,1 (C₆); 65,3 (C₇);
155,8 (C₈); 53,9 (C₉); 170,3 (C₁₀); 36,4 (C₁₁); 137,4 (C₁₂, C₂₈);
126,4 (C₁₃, C₁₄); 128,2 (C₁₅, C₁₆); 129,2 (C₁₇); 63,0 (C₁₈); 46,7
(C₁₉); 24,7 (C₂₀); 27,7 (C₂₁); 200,3 (C₂₂); 47,4 (C₂₃); 150,6 (C₂₄,
C₂₅); 122,4 (C₂₆, C₂₇); 165,0 (C₂₉); 52,7 (C₃₀)

MALDI-TOF-MS m/z:

531,1 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

10 mmol Z-Phe-Pro-Chlormethylketon werden mit 2 ml Pyridin versetzt. Es wird 4 Tage bei 23 °C gerührt. Das überschüssige Pyridin wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Das Rohprodukt wird über 60 g Kieselgel gereinigt. Im Eluat Chloroform/Methanol wird anfangs (9 : 1 Vol.-Teile) das Produkt und mit zunehmender Polarität des Eluenten das Chlormethylketon aufgefangen. Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon wird abschließend einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Summenformen:

C₂₈H₃₀N₃O₄Cl

Molmasse:

508,01 Da

Ausbeute:

69,6 % d. Th.

DC R_f-Wert (System):

0,32 (A); 0,74 (B); 0,61 (C)

HPLC:

Retentionszeit: 17 min, LiChrosorb RP 8 (Hibar); λ = 220 nm, Flußrate 8,0 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

Retentionszeit: 3,4 min, LiChrosper RP-8 (125*4); λ = 220 nm, Flußrate 1,5 ml/min, Gradient 30 - 80 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA) in 25 min

Retentionszeit: 10,2 min, Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm, Flußrate 8 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H:

1,7-2,1 (4H, m, H₂₀, H₂₁); 2,7-3,0 (2H, m, H₁₁); 3,4-3,9 (2H, m, H₁₉); 4,4-4,6 (1H, m, H₉); 4,6-4,8 (2H, m, H₂₄, H₂₅); 5,0-5,1 (2H, dd, H₇); 5,7-5,8 (1H, d, H₁₈); 5,9-6,1 (2H, dd, H₂₃); 7,2-7,4 (10H, m, H₂-H₆, H₁₃-H₁₇); 8,6-8,8 (1H, dd, H₂₈); 8,2-8,3 (2H, d, H₂₆ u. H₂₇); 8,8-8,9 (1H, d, NH)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:

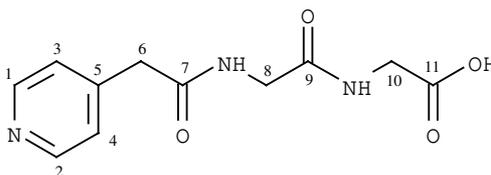
136,8 (C₁); 127,9 (C₂, C₃); 127,6 (C₄, C₅); 128,4 (C₆); 65,5 (C₇); 156,3 (C₈); 54,1 (C₉); 170,9 (C₁₀); 36,4 (C₁₁); 137,6 (C₁₂); 126,6 (C₁₃, C₁₄); 128,4 (C₁₅, C₁₆); 129,3 (C₁₇); 63,1 (C₁₈); 46,9 (C₁₉); 25,1 (C₂₀); 27,6 (C₂₁); 200,7 (C₂₂); 66,3 (C₂₃); 146,2 (C₂₄, C₂₅); 128,2 (C₂₆, C₂₇); 146,4 (C₂₈)

MALDI-TOF-MS m/z:

472,8 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

(NC₅H₄)-pCH₂-CO-Gly₂-OH / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

Die Darstellung findet unter Verwendung von p-Alkoxybenzylalkohol-Harz (Wang/Bachem) als Festphasensynthese am Synthese-Halbautomaten statt. Zuvor kuppelt man Glycin extern nach Methode E an 1,5 g Wang-Harz (Beladung: 0,97 mmol/g). Die nächsten Kupplungsschritte werden nach einem festgelegten Protokoll halbautomatisch nach der Fmoc-Strategie durchgeführt (Methode D). So werden Glycin und 4-Pyridylelessigsäure gekuppelt. Abweichend von herkömmlichen Verfahrensweisen wird die Pyridylelessigsäure erst mit der Base N-Ethyl-diisopropylamin gemischt und ins Reaktionsgefäß gegeben. TBTU dient als Kupplungsreagenz. Die Abspaltung des Produktes vom Harz erfolgt in 30 ml einer 50 %igen TFA-Lösung in DCM, versetzt mit 1,5 % Thioanisol. Nach 2 h wird abgesaugt, mit TFA nachgespült und eingengt. Das Peptid wird in etwas Methanol angelöst und mit Diethylether bei 0 °C ausgefällt.

Summenformeln:

C₁₁H₁₃N₃O₄

Molmasse:

251,24 Da

Ausbeute:

71 % d. Th.

DC R_f-Wert (System):

0,29 (B); 0,24 (C)

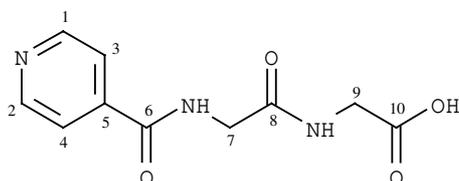
HPLC:

Retentionszeit: 2,2 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4); λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H:3,4 (2H, d, 4 Hz, H₆); 3,5 (2H, s, H₈); 3,7 (2H, d, 6 Hz, H₁₀); 7,3 (2H, d, 5 Hz, H₃, H₄); 7,5 (1H, s, NH); 8,4 (2H, d, 6 Hz, H₁, H₂); 8,7 (1H, s, NH)¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:149,4 (C₁, C₂); 124,6 (C₃, C₄); 145,1 (C₅); 41,3 (C₆); 168,0 (C₇); 42,4 (C₈); 169,5 (C₉); 43,7 (C₁₀); 172,2 (C₁₁)

Elektrospray-MS m/z:

252,11 Da (M+H⁺)(NC₅H₄)-pCO-Gly₂-OH / Cl⁻

Strukturformel:

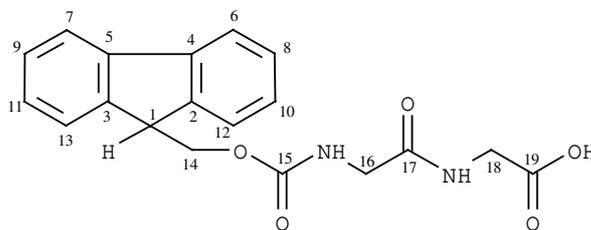


Darstellung: Die Darstellung findet unter Verwendung von p-
Alkoxybenzylalkohol-Harz (Wang/Bachem) als
Festphasensynthese am Synthese-Halbautomaten statt. Zuvor
kuppelt man Glycin extern nach Methode E an 1,5 g Wang-Harz
(Beladung: 0,97 mmol/g). Die nächsten Kupplungsschritte
werden nach einem festgelegten Protokoll halbautomatisch nach
der Fmoc-Strategie durchgeführt (Methode D). So werden
Glycin und Isonicotinsäure gekuppelt. Abweichend von
herkömmlichen Verfahrensweisen wird die Isonicotinsäure erst
mit der Base N-Ethyldiisopropylamin gemischt und ins
Reaktionsgefäß gegeben. TBTU dient als Kupplungsreagenz.
Die Abspaltung des Produktes vom Harz erfolgt in 30 ml einer
50 %igen TFA-Lösung in DCM, versetzt mit 1,5 % Thioanisol.
Nach 2 h wird abgesaugt, mit TFA nachgespült und eingengt.
Das Peptid wird in etwas Methanol angelöst und mit
Diethylether bei 0 °C ausgefällt.

Summenformen: C₁₀H₁₁N₃O₄
Molmasse: 237,21 Da
Ausbeute: 85,6 % d. Th.
DC R_f-Wert (System): 0,55 (B); 0,43 (C)
HPLC: Retentionszeit: 2,2 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4);
λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in
H₂O (0,1 % TFA)
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H: 3,5 (2H, d, 5 Hz, H₇); 3,9 (2H, d, 6 Hz, H₉); 7,7 (1H, t, 5 Hz,
NH); 7,8 (2H, d, 6 Hz, H₃ u. H₄); 8,7 (2H, d, 6 Hz, H₁ u. H₂); 9,2
(1H, t, 6 Hz, NH)
¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C: 150,8 (C₁, C₂); 121,9 (C₃, C₄); 141,6 (C₅); 165,7 (C₆); 43,1 (C₇);
168,6 (C₈); 43,4 (C₉); 172,2 (C₁₀);
Elektrospray-MS m/z: 238,1Da (M+H⁺)

Fmoc-Gly-Gly-OH

Strukturformel:



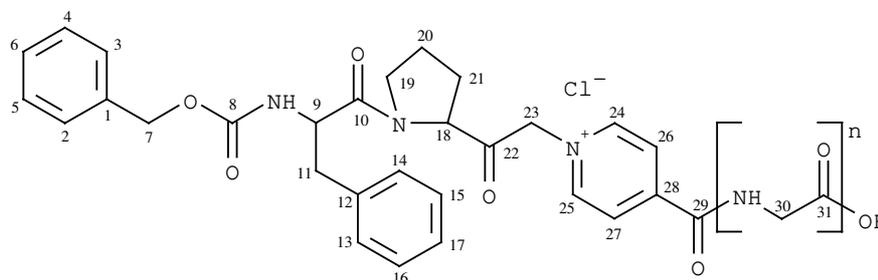
Darstellung: Ein Equivalent (100 mmol) des freien Dipeptids H-Gly₂-OH
wird in 200 ml Aceton suspendiert und mit 267 ml (252 mmol)
einer 10 %igen Na₂CO₃-Lösung versetzt. Bei 0 °C werden 1,05
eq. (105 mmol) N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-
succinimid (FmocOSu) portionsweise zugegeben. Es wird 10 h
bei 23 °C nachgerührt. Zur Aufarbeitung werden 200 ml
Essigsäureethylester zugegeben und die Lösung vorsichtig mit

6 N Salzsäure-Lösung auf pH = 1 eingestellt. Fmoc-Gly-Gly-OH fällt aus und kann abgesaugt werden. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert, die organischen Auszüge werden eingengt und das gesammelte Rohprodukt aus Essigsäureethylester/Pentan kristallisiert.

Summenformen:	$C_{19}H_{18}N_2O_5$
Molmasse:	354,36 Da
Ausbeute:	89,1 % d. Th.
DC R _f -Wert (System):	0,50 (A); 0,69 (B); 0,63 (C)
¹ H-NMR (DMSO-d ₆) δ _H :	3,6-3,7 (2H, d, 6 Hz, H ₁₆); 3,8 (2H, d, 6 Hz, H ₁₈); 4,2-4,3 (3H, m, H ₁ u. H ₁₄); 7,2-7,5 (4H, m, H ₈ -H ₁₁); 7,5-7,6 (1H, t, 7 Hz, NH); 7,7 (2H, d, 7 Hz, H ₁₂ u. H ₁₃); 7,8-7,9 (2H, d, 7 Hz, H ₆ u. H ₇); 8,1-8,2 (1H, t, 5 Hz, NH); 11,5-12 (1H, s, breit, OH)
¹³ C-NMR (DMSO-d ₆) δ _C :	54,1 (C ₁); 146,4 (C ₂ , C ₃); 137,6 (C ₄ , C ₅); 123,2 (C ₆ , C ₇); 129,5 (C ₈ , C ₉); 128,3 (C ₁₀ , C ₁₁); 127,8 (C ₁₂ , C ₁₃); 65,5 (C ₁₄); 156,1 (C ₁₅); 46,9 (C ₁₆); 166,2 (C ₁₇); 36,4 (C ₁₈); 171,2 (C ₁₉)
HPLC:	Retentionszeit: 5,7 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4); λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H ₂ O (0,1 % TFA)
MALDI-TOF-MS m/z:	355,5 Da (M+H ⁺)

Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-p-CO-Gly_n-OH / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

In einem externen Kupplungsschritt (Methode E) wird als erste Aminosäure Glycin ans Harz (Harztyp siehe Tabelle) gekuppelt bzw. kommerziell erworbenes Fmoc-Gly-Sasrin eingesetzt. Weitere Glycine und abschließend Isonicotinsäure werden im halbautomatischen Festphasen-Peptidsynthesizer (Methode D) gekuppelt. Das Harz wird nun gründlich gewaschen, getrocknet und mit Z-Phe-Pro-Chlormethylketon in 2fachem Überschuß in DMF versetzt. Nach Zugabe einer katalytische Menge NaJ wird 3-6 Tage gerührt. Die Reaktion wird mittels MALDI-TOF-MS verfolgt. Nach Reaktionsende wird das Harz mit DCM und Diethylether gründlich gewaschen. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt mit 20 ml einer 10 %igen TFA-Lösung in DCM. Die Reaktionslösung wird eingengt und das Rohprodukt noch 5 mal mit 10 ml DCM versetzt und erneut eingengt. Das Produkt wird mittels HPLC gereinigt,

Z-Phe-Pro-CH ₂ -Pyridin- <i>p</i> -CO-Gly _n -OH	Summenformel	Harztyp	Ausbeute d. Th.	DC R _f -Wert (System)	HPLC-Retentionszeit [min]	Molmasse [Da]	MALDI-TOF-MS (M+H ⁺) ohne Cl ⁻
n = 1	C ₃₁ H ₃₃ N ₄ O ₇ Cl	Fmoc-Gly-Sasrin	36,4%	0,12 (A); 0,75 (B); 0,63 (C)	2,3 ^D , 18,36 ^B	609,07	574,2
n = 2	C ₃₃ H ₃₆ N ₅ O ₈ Cl	Wang	33 %	0,13 (A); 0,68 (B); 0,44 (C)	3,5 ^A , 16,4 ^B	666,13	631,1
n = 3	C ₃₅ H ₃₉ N ₆ O ₉ Cl	Fmoc-Gly-Sasrin	30,4%	0,22 (A); 0,71 (B); 0,40 (C)	7,1 ^C	723,18	687,8
n = 4	C ₃₇ H ₄₂ N ₇ O ₁₀ Cl	Wang	24 %	0,06 (A); 0,56 (B); 0,39 (C)	3,0 ^A , 15,9 ^B	780,23	744,6
n = 5	C ₃₉ H ₄₅ N ₈ O ₁₁ Cl	Fmoc-Gly-Sasrin	17,1%	0,10 (A); 0,44 (B); 0,59 (C)	13,9 ^B , 6,1 ^C	837,28	801,6
n = 6	C ₄₁ H ₄₈ N ₉ O ₁₂ Cl	Fmoc-Gly-Sasrin	12,0%	0,25 (A); 0,35 (B); 0,72 (C)	2,6 ^E , 13,7 ^B	894,33	859,3
n = 10	C ₄₉ H ₆₀ N ₁₃ O ₁₆ Cl	Wang	4%	0,03 (A); 0,55 (B); 0,43 (C)	2,5 ^A , 15,7 ^B	1122,54	1087,0

HPLC:

^A LiChrosper 100 RP-8, λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

^B Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm, Flußrate 5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

^C LiChrosper 100 RP-8, λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 40% Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

^D LiChrosper 100 RP-18, 125-4, λ = 220 nm, Flußrate 1,0 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

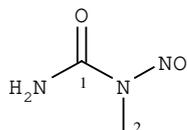
^E LiChrosper 100 RP-18, 125-4, λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:

136,8 (C₁); 127,8 (C₂, C₃); 127,7 (C₄, C₅); 128,3 (C₆); 65,8 (C₇); 157,8 (C₈); 54,0 (C₉); 170,5 (C₁₀); 39,7 (C₁₁); 137,5 (C₁₂); 125,7 (C₁₃, C₁₄); 128,5 (C₁₅, C₁₆); 129,4 (C₁₇); 63,1 (C₁₈); 46,9 (C₁₉); 25,0 (C₂₀); 27,3 (C₂₁); 200,4 (C₂₂); 76,2 (C₂₃); 147,4 (C₂₄, C₂₅); 128,4 (C₂₆, C₂₇); 148,5 (C₂₈); 162,6 (C₂₉); 39 bis 42 (C₃₀); 171 bis 176 (C₃₁)

Nitrosomethylharnstoff

Strukturformel:



Darstellung:

1,5 mol N-Methylamin-hydrochlorid und 5 mol Harnstoff werden in 400 ml Wasser gelöst und unter Rückfluß 3 Stunden erhitzt. Nach dem Zulösen von 1,6 mol Natriumnitrit läßt man die auf -10 °C abgekühlte Lösung in ein mit Eis-Kochsalz-Mischung abgekühltes Gemisch aus 600 g Eis und 110 g konz. Schwefelsäure unter Rühren langsam einfließen. Die sich abscheidende Nitrosoverbindung wird abgesaugt und mit Eiswasser gewaschen. Es folgt eine Reinigung durch Umkristallisieren aus Methanol. Zur Darstellung von Diazomethan wird das anfallende Rohprodukt eingesetzt.

Summenformen:

C₂H₅N₃ O₂

Molmasse:

103,08 Da

Ausbeute:

92,8 % d. Th.

DC R_f-Wert (System):

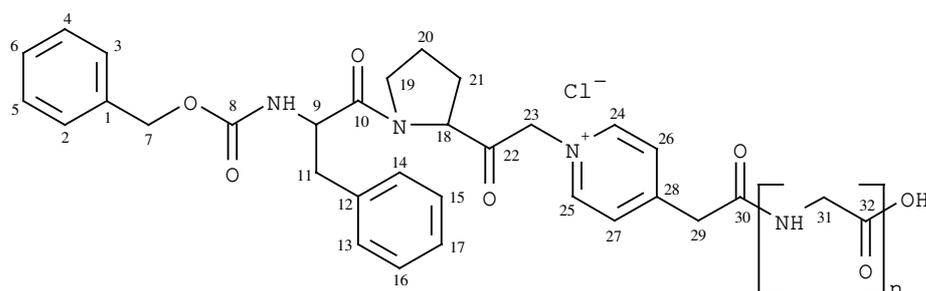
0,85 (A); 0,90 (B); 0,90 (C)

HPLC:

Retentionszeit: 6,3 min, LiChrospher 250 RP-18 (250*4);
λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 40 % Acetonitril in
H₂O (0,1 % TFA)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H:3,1 (3H, s, H₂); 7,8-8,1 (2H, d, 48 Hz, NH₂)¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:154,1 (C₁); 26,5 (C₂)Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-p-CH₂-CO-Gly_n-OH / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

An das kommerziell erworbene Fmoc-Gly-Sasrin-Harz werden mehrmals Glycin und abschließend Pyridylelessigsäure im halbautomatischen Festphasen-Peptidsynthesizer (Methode D) gekuppelt. Das Harz wird nun gründlich gewaschen, getrocknet und mit Z-Phe-Pro-Chlormethylketon in DMF versetzt. Nach Zugabe einer katalytischen Menge NaJ wird 3 - 6 Tage gerührt. Die Reaktion wird mittels MALDI-TOF-MS verfolgt. Nach

Reaktionsende wird das Harz mit DCM und Diethylether gründlich gewaschen. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt mit 20 ml einer 10 %igen TFA-Lösung in DCM. Die Reaktionslösung wird eingengt und das Rohprodukt noch 5 mal mit 10 ml DCM versetzt und erneut eingengt. Das Produkt wird mittels HPLC gereinigt.

Z-Phe-Pro-CH ₂ -Pyridin-p-CH ₂ -CO-Gly _n -OH	Summenformel	Harztyp	Ausbeute d. Th.	DC R _f -Wert (System)	HPLC-Retentionszeit [min]	Molmasse [Da]	MALDI-TOF-MS (M+H ⁺) ohne Cl ⁻
n = 1	C ₃₂ H ₃₅ N ₄ O ₇ Cl	Fmoc-Gly-Sasrin	22 %	0,16 (A); 0,65 (B); 0,57 (C)	4,1 ^A , 17,5 ^B	623,10	587,7
n = 2	C ₃₄ H ₃₈ N ₅ O ₈ Cl	Fmoc-Gly-Sasrin	17,4 %	0,07 (A); 0,67 (B); 0,79 (C)	3,3 ^A , 16,3 ^B	680,15	644,8
n = 3	C ₃₆ H ₄₁ N ₆ O ₉ Cl	Fmoc-Gly-Sasrin	15,5 %	0,07(A); 0,61 (B); 0,37 (C)	2,8 ^A , 19,8 ^C	737,20	701,2
n = 4	C ₃₈ H ₄₄ N ₇ O ₁₀ Cl	Fmoc-Gly-Sasrin	10,5 %	0,13 (A); 0,56 (B); 0,65 (C)	2,7 ^A , 17,9 ^B	794,26	758,9
n = 6	C ₄₂ H ₅₀ N ₉ O ₁₂ Cl	Fmoc-Gly-Sasrin	8,3 %	0,06 (A); 0,39 (B); 0,43 (C)	2,8 ^A , 12,9 ^C	908,36	872,6
n = 8	C ₄₆ H ₅₆ N ₁₁ O ₁₄ Cl	Fmoc-Gly-Sasrin	9,2 %	0,08 (A); 0,44 (B); 0,39 (C)	4,4 ^A , 15,3 ^C , 16,0 ^B	1022,46	987,0
n = 10	C ₅₀ H ₆₂ N ₁₃ O ₁₆ Cl	Fmoc-Gly-Sasrin	50,3 % (roh)	0,07 (A); 0,40 (B); 0,35 (C)	4,4 ^E , 2,5 ^A , 10,3 ^D , 15,2 ^B	1136,56	1100,8

HPLC:

^A LiChrosper 100 RP-8, λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

^B Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm, Flußrate 4 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

^C Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm, Flußrate 5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

^D Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm, Flußrate 5 ml/min, isokratisch 30 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

^E Serva 250-4 RP 18, λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 60 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

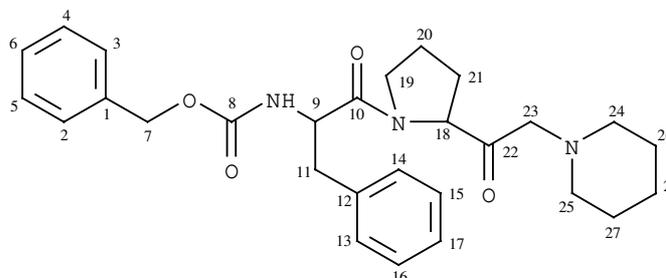
¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:

138,0 (C₁); 129,9(C₂, C₃); 129,8 (C₄,C₅); 129,9 (C₆); 66,9 (C₇); 158,3 (C₈); 50,5 (C₉); 169,3 (C₁₀); 37,6 (C₁₁); 139,0 (C₁₂); 128,0 (C₁₃, C₁₄); 130,7 (C₁₅, C₁₆); 130,8 (C₁₇); 64,0 (C₁₈); 44,3 (C₁₉);

23,0 (C₂₀); 29,0 (C₂₁); 202,0 (C₂₂); 74,0 (C₂₃); 146,7 (C₂₄, C₂₅);
129,2 (C₂₆, C₂₇); 146,8 (C₂₈); 38,0 (C₂₉); 168,0 (C₃₀); 41 bis 45
(C₃₁); 170 bis 177 (C₃₂)

N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Piperidin

Strukturformel:



Darstellung:

Sowohl 1 mmol Z-Phe-Pro-Chlormethylketon als auch 25 mmol Piperidin werden in 20 ml DMF gelöst. Es wird 5 Tage bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in Methanol/Isopropanol angelöst und die überschüssigen Piperidinsalze in Ether ausgefällt. Die flüssige Phase wird vom Feststoff getrennt, eingengt und direkt einer HPLC-Trennung unterzogen.

Summenformen:

C₂₈H₃₅O₄N₃

Molmasse:

477,6 Da

Ausbeute:

42,2 % d. Th.

DC R_f-Wert (System):

0,25 (A); 0,49 (B); 0,51 (C)

HPLC:

Retentionszeit: 5,4 min, LiChrosper 100 RP-18, λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, 50 % isokratisch Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

Retentionszeit: 12,7 min, Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm, Flußrate 4 ml/min, 50 % isokratisch Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H:

1,5-2,0 (10H, m, H₂₀, H₂₁, H₂₆-H₂₈); 2,7-3,0 (8H, m, H₁₁, H₂₃-H₂₅); 3,4-3,8 (2H, m, H₁₉); 4,2-4,3 (1H, m, H₉); 4,4-4,5 (1H, m, H₁₈) 4,9-5,0 (2H, m, H₇) 7,2-7,4 (9H, m, H₂-H₆, H₁₃-H₁₇); 7,9 (1H, d, NH)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:

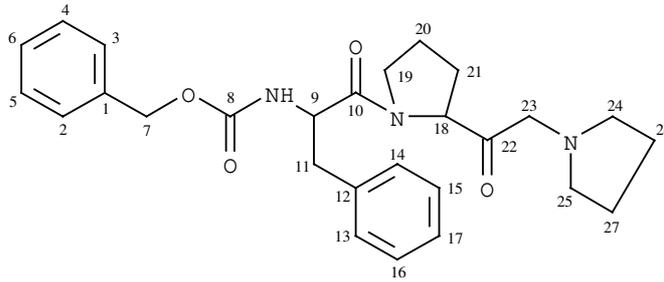
137,1 (C₁); 128,4 (C₂, C₃); 127,8 (C₄, C₅); 128,5 (C₆); 65,6 (C₇); 156,2 (C₈); 54,3 (C₉); 170,8 (C₁₀); 36,4 (C₁₁); 137,3 (C₁₂); 127,6 (C₁₃, C₁₄); 128,6 (C₁₅, C₁₆); 129,5 (C₁₇); 58,7 (C₁₈); 46,7 (C₁₉); 25,0 (C₂₀); 28,6 (C₂₁); 201,7 (C₂₂); 60,7 (C₂₃); 53,1 (C₂₄, C₂₅); 22,2 (C₂₆, C₂₇); 24,2 (C₂₈)

MALDI-TOF-MS m/z:

478,8 (M+H⁺)

N-(Z-Phe-Pro-CH₂-)Pyrrolidin

Strukturformel:



Darstellung:

1 mmol Z-Phe-Pro-Chlormethylketon wird mit einem 100fachen Überschuß Pyrrolidin versetzt. Es wird 5 Tage bei 25 °C gerührt. Das überschüssige Pyrrolidin wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in Methanol/Isopropanol angelöst und die überschüssigen Pyrrolidinsalze in Ether ausgefällt. Die flüssige Phase wird vom Feststoff getrennt, eingengt und direkt der HPLC-Trennung unterzogen.

Summenformen:

C₂₇H₃₃O₄N₃

Molmasse:

463,57 Da

Ausbeute:

35,4 % d. Th.

DC R_f-Wert (System):

0,54 (A); 0,71 (B); 0,58 (C)

HPLC:

Retentionszeit: 5,7 min, LiChrosper 100 RP-18, λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

Retentionszeit: 22,8 min, Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm, Flußrate 4 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H:

1,7-2,1 (8H, m, H₂₀, H₂₁, H₂₆, H₂₇); 2,7-3,0 (8H, m, H₁₁, H₂₃-H₂₅); 3,4-3,8 (2H, m, H₁₉); 4,2-4,3 (1H, m, H₉); 4,4-4,5 (1H, m, H₁₈) 4,9-5,0 (2H, m, H₇) 7,2-7,4 (9H, m, H₂-H₆, H₁₃-H₁₇); 7,7 (1H, d, NH)

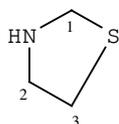
¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:

137,1 (C₁); 128,4 (C₂, C₃); 127,8 (C₄, C₅); 128,5 (C₆); 65,9 (C₇); 156,2 (C₈); 54,3 (C₉); 170,8 (C₁₀); 36,4 (C₁₁); 137,7 (C₁₂); 127,6 (C₁₃, C₁₄); 128,6 (C₁₅, C₁₆); 129,5 (C₁₇); 59,8 (C₁₈); 46,7 (C₁₉); 25,0 (C₂₀); 27,5 (C₂₁); 202,1 (C₂₂); 60,7 (C₂₃); 53,1 (C₂₄, C₂₅); 22,0 (C₂₆, C₂₇)

MALDI-TOF-MS m/z:

464,1 Da (M+H⁺)Thiazolidin-Hydrochlorid

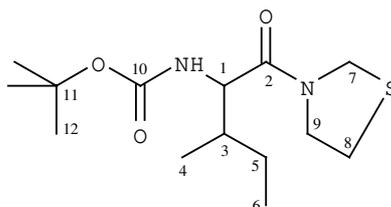
Strukturformel:



Darstellung:	30 g Cysteaminhydrochlorid werden in 100 ml Wasser gelöst und mit 225 ml einer 36 %igen Formaldehydlösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei 23 °C 12 h gerührt. Im Vakuum wird bis zur Trockne eingengt und aus Ethanol umkristallisiert.			
Summenformen:	C ₃ H ₈ SNCl			
Molmasse:	125,5 Da			
Ausbeute:	84 %			
HPLC:	Retentionszeit: 4,7 min, LiChroCart 250-4 RP-18, λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, 50 % isokratisch Acetonitril in H ₂ O (0,1 % TFA)			
¹ H-NMR (DMSO-d ₆) δ _H :	3,1 (2H, t, 8Hz, H ₃); 3,5 (2H, t, 8Hz, H ₂); 4,3 (2H, s, H ₁)			
¹³ C-NMR (DMSO-d ₆) δ _C :	48,5 (C ₁); 48,3 (C ₂); 30,1 (C ₃)			
MALDI-TOF-MS m/z:	89,2 Da (M+H ⁺)			
Elementaranalyse (%):	ber.:	C 28,69	H 6,42	N 11,15
	gef.:	C 28,93	H 6,33	N 11,00

Boc-Ile-Thiazolidid

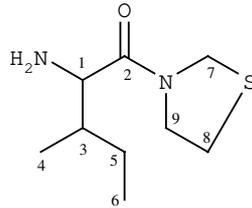
Strukturformel:



Darstellung:	Boc-Ile-OH wird nach der Mischanhydridmethode (Methode A) mit Thiazolidin gekuppelt. Das Produkt wird nach dem Ausschütteln weiter, zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe, eingesetzt.			
Summenformen:	C ₁₄ H ₂₆ N ₂ O ₃ S			
Molmasse:	302,43 Da			
Ausbeute:	94 %			
HPLC:	Retentionszeit: 21,0 min, LiChroCart 125-4 RP-18, λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, 40 % isokratisch Acetonitril in H ₂ O (0,1 % TFA)			
¹ H-NMR (DMSO-d ₆) δ _H :	0,8-1,0 (6H, m, H ₄ , H ₆); 1,4 (9H, d, 8Hz, H ₁₂); 1,6-1,7 (2H, m, H ₅); 1,9-2,0 (1H, m, H ₃); 2,9-3,0 (2H, m, H ₈); 3,4 (1H, d, 7 Hz, NH); 3,7 (1H, m, H ₁); 3,8-3,9 (2H, m, H ₉); 4,4-4,5 (2H, m, H ₇)			
¹³ C-NMR (DMSO-d ₆) δ _C :	56,9 (C ₁); 171,3 (C ₂); 24,1 (C ₃); 15,4 (C ₄); 37,6 (C ₅); 10,9 (C ₆); 48,4 (C ₇); 31,0 (C ₈); 49,2 (C ₉); 155,9 (C ₁₀); 79,7 (C ₁₁); 28,2 (C ₁₂)			
MALDI-TOF-MS m/z:	303,4 Da (M+H ⁺)			
Elektrospray-MS m/z:	303,3 Da (M+H ⁺)			
Elementaranalyse (%):	ber.:	C 55,60	H 8,66	N 9,26
	gef.:	C 55,41	H 8,92	N 9,68

H-Ile-Thiazolidid * TFA

Strukturformel:



Darstellung:

Boc-Ile-Thia wird in 50 %iger TFA-Lösung in DCM für 2 Stunden gerührt. Die Kontrolle der vollständigen Abspaltung erfolgt mittels HPLC. Das Rohprodukt wird eingeeengt, mit DCM versetzt und erneut eingeeengt. Dieser Vorgang wird 5 mal wiederholt. Die weitere Reinigung erfolgt an Kieselgel. Als Eluent dient Chloroform/Methanol (9 : 1) versetzt mit 2 Tropfen Diethylamin. Das lösungsmittelfreie Produkt wird in Isopropanol angelöst und in Pentan kristallisiert.

Summenformel:

 $C_{11}H_{19}F_3N_2O_3S$

Molmasse:

316,34 Da

Ausbeute:

84,3 %

DC R_f -Wert (System):

0,18 (A); 0,63 (B); 0,75 (C)

HPLC:

Retentionszeit: 6,6 min, Serva 250-4 RP-18, $\lambda = 220$ nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0,1 % TFA)

Retentionszeit: 2,4 min, LiChrosper 100 RP-8, $\lambda = 220$ nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0,1 % TFA)

Retentionszeit: 13,2 min, Nucleosil 7 C_8 , $\lambda = 220$ nm, Flußrate 5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0,1 % TFA)

 1H -NMR (DMSO- d_6) δ_H :

0,8-0,9 (3H, dd, 7 Hz, 16 Hz, H_6); 0,9-1,0 (3H, d, 7 Hz, H_4); 1,4-1,6 (2H, m, H_5); 1,8-1,9 (1H, m, H_3); 3,0-3,1 (2H, dt, 6 Hz, 23 Hz, H_8); 3,2-3,5 (2H, br, NH_2); 3,5-3,7 (1H, m, H_1); 4,0-4,1 (2H, m, H_9); 4,4-4,8 (2H, ddd, 10 Hz, 80 Hz, 110 Hz, H_7)

 ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ_C :

55,3 (C_1); 166,9 (C_2); 23,5 (C_3); 14,5 (C_4); 39,5 (C_5); 11,1 (C_6); 47,9 (C_7); 30,6 (C_8); 49,0 (C_9)

MALDI-TOF-MS m/z:

203,3 Da ($M+H^+$)

Elektrospray-MS m/z:

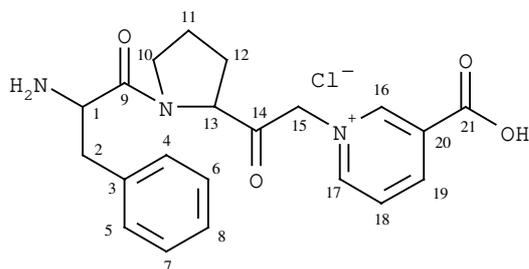
203,4 Da ($M+H^+$)

Elementaranalyse (%):

ber.:	C 41,77	H 6,05	N 8,86
gef.:	C 42,05	H 6,32	N 8,39

H-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-o-COOH / Cl⁻ *HBr

Strukturformel:



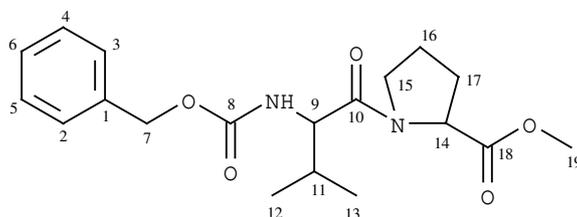
Darstellung:

Die Z-Schutzgruppe wird von Z-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-o-COOH / Cl⁻ nach Methode F in 5minütiger Reaktionszeit abgespalten. Die Verbindung konnte nicht mittels HPLC gereinigt werden, da es zu weiteren Zerfallsreaktionen am Säulenmaterial kam.

Summenformel: C₂₁H₂₅N₃O₄ClBr
 Molmasse: 498,80 Da
 Ausbeute: 98 % roh
 MALDI-TOF-MS m/z: 382,6 Da (M+H⁺)

Z-Val-Pro-OMe

Strukturformel:



Darstellung:

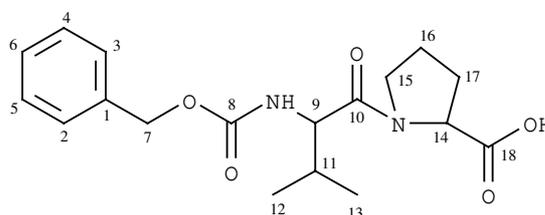
Z-Val-OH wird nach der Mischanhydridmethode (Methode A) mit H-Pro-OMe gekuppelt.

Summenformel: C₁₉H₂₆N₂O₅
 Molmasse: 362,42 Da
 Ausbeute: 82,4 % d. Th.
 DC R_f-Wert (System): 0,91 (A); 0,82 (B); 0,78 (C)
 HPLC: Retentionszeit: 8,2 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4);
 λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ_{H} :	0,8-1,0 (6H, ddd, H_{12} u. H_{13}); 1,7-1,9 (3H, m, H_{11} u. H_{16}); 1,8-2,0 (2H, m, H_{17}); 3,3-3,5 (2H, m, H_{15}); 3,6 (3H, d, H_{19}); 3,7-3,9 (1H, m, H_9) 4,0-4,1 (1H, d, H_{14}); 4,9-5,1 (2H, m, H_7); 7,2-7,4 (6H, m, H_2 - H_6 , NH)			
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ_{C} :	137,0 (C_1); 127,7 (C_2 , C_3); 127,6 (C_4 , C_5); 128,3 (C_6); 65,4 (C_7); 156,1 (C_8); 58,4 (C_9); 170,3 (C_{10}); 29,8 (C_{11}); 18,6 (C_{12} , C_{13}); 57,8 (C_{14}); 46,8 (C_{15}); 24,6 (C_{16}); 28,6 (C_{17}); 172,2 (C_{18}); 51,6 (C_{19})			
MALDI-TOF-MS m/z:	363,3 Da ($\text{M}+\text{H}^+$)			
Elementaranalyse (%):	ber.:	C 62,97	H 7,23	N 7,73
	gef.:	C 62,69	H 7,56	N 7,91

Z-Val-Pro-OH

Strukturformel:

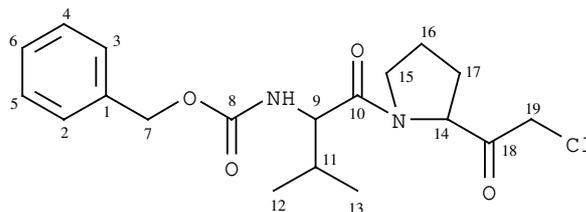


Darstellung: Die Hydrolyse des Z-Val-Pro-Methylesters wird nach Methode B durchgeführt.

Summenformel:	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$
Molmasse:	348,40 Da
Ausbeute:	79,5 % d. Th.
DC R_f -Wert (System):	0,54 (A); 0,90 (B); 0,80 (C)
HPLC:	Retentionszeit: 4,9 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4); $\lambda = 220$ nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0,1 % TFA)
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ_{H} :	0,7-0,9 (6H, m, H_{12} , H_{13}); 1,6-1,9 (3H, m, H_{11} , H_{16}); 2,0-2,2 (2H, m, H_{17}); 3,2-3,4 (2H, m, H_{15}); 3,6-3,8 (1H, m, H_9); 3,9-4,2 (1H, m, H_{14}); 4,8-5,0 (2H, m, H_7); 7,1-7,3 (6H, m, H_2 - H_6 , NH); 12,2 (1H, s, br, OH)
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ_{C} :	137,1 (C_1); 127,8 (C_2 , C_3); 127,6 (C_4 , C_5); 128,3 (C_6); 65,5 (C_7); 156,2 (C_8); 58,6 (C_9); 170,3 (C_{10}); 30,0 (C_{11}); 18,8 (C_{12} , C_{13}); 57,8 (C_{14}); 46,9 (C_{15}); 24,6 (C_{16}); 28,7 (C_{17}); 173,3 (C_{18})
MALDI-TOF-MS m/z:	349,5 Da ($\text{M}+\text{H}^+$)

Z-Val-Pro-CH₂Cl

Strukturformel:



Darstellung:

Z-Val-Pro-OH wird nach Methode C mittels Diazomethan zum Z-Val-Pro-Chlormethylketon umgesetzt. Auf eine gründliche Aufarbeitung wird verzichtet. Die Verbindung wird unmittelbar in die Folgereaktion eingesetzt.

Summenformeln:

C₁₉H₂₅N₂O₄Cl

Molmasse:

380,87 Da

Ausbeute:

94,3 % d. Th. Rohprodukt

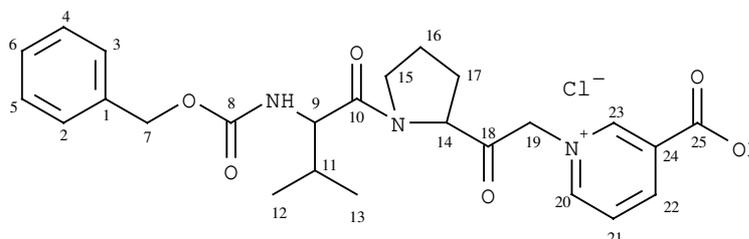
HPLC:

Retentionszeit: 18,0 min, LiChrospher 250 RP-18 (250*4);
λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 40 % Acetonitril in
H₂O (0,1 % TFA)

MALDI-TOF-MS m/z:

381,6 Da (M+H⁺)Z-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-m-COOH / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

Sowohl 10 mmol Z-Val-Pro-Chlormethylketon als auch 20 mmol Nicotinsäure werden in je 15 ml DMSO gelöst und die beiden Lösungen bei 25 °C zusammengegeben. Es wird 5 Tage bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in einem Aceton-Ethanol-Gemisch (1:1 Vol.) suspendiert. Die bei 0 °C ausfallende Nicotinsäure wird über eine Fritte abgetrennt. Das Filtrat wird über 20 g Kieselgel (Chloroform/Methanol) gereinigt. Im Eluat wird anfangs das Chlormethylketon und mit zunehmender Polarität des Eluenten das Produkt aufgefangen. N-(Z-Val-Pro-CH₂-)Nicotinsäure wird abschließend einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Summenformeln:

C₂₅H₃₀N₃O₆Cl

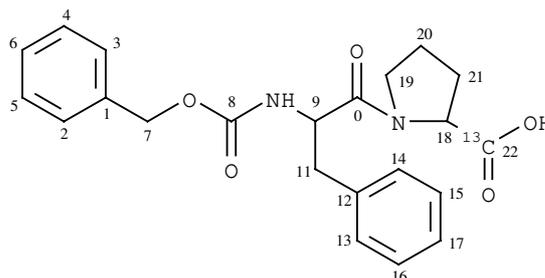
Molmasse:

503,98 Da

Ausbeute:	45,8 % d. Th.
DC R _f -Wert (System):	0,30 (A); 0,37 (B); 0,37 (C)
HPLC:	Retentionszeit: 4,7 min, LiChrosper 100 RP-18, λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H ₂ O (0,1 % TFA) Retentionszeit: 16,6 min, Nucleosil 7 C ₈ , λ = 220 nm, Flußrate 8 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H ₂ O (0,1 % TFA)
¹ H-NMR (DMSO-d ₆) δ _H :	0,7-0,9 (6H, m, H ₁₂ , H ₁₃); 1,7-2,0 (3H, m, H ₁₁ , H ₁₆); 2,0-2,2 (2H, m, H ₁₇); 3,6 (2H, m, H ₁₅); 3,7-3,8 (1H, m, H ₉); 4,0-4,1 (1H, m, H ₁₄); 4,1 (1H, m, H ₂₀); 4,2 (1H, m, H ₂₃); 4,9-5,1 (2H, m, H ₇); 5,9-6,1 (2H, m, H ₁₉); 7,2-7,4 (9H, m, H ₂ -H ₆ , H ₂₁ -H ₂₂ , NH)
¹³ C-NMR (DMSO-d ₆) δ _C :	137,3 (C ₁); 127,1 (C ₂ -C ₆ , C ₂₁); 65,5 (C ₇); 156,4 (C ₈); 58,6 (C ₉); 170,5 (C ₁₀); 29,8 (C ₁₁); 18,3 (C ₁₂); 18,7 (C ₁₃); 62,6 (C ₁₄); 46,8 (C ₁₅); 24,6 (C ₁₆); 30,4 (C ₁₇); 197,3 (C ₁₈); 72,3 (C ₁₉); 154,1 (C ₂₀ , C ₂₂ , C ₂₃); 131,0 (C ₂₄); 163,1 (C ₂₅)
MALDI-TOF-MS m/z:	469,4 Da (M+H ⁺ , ohne Chloridanion)

Z-Phe-[¹³C]Pro-OH

Strukturformel:



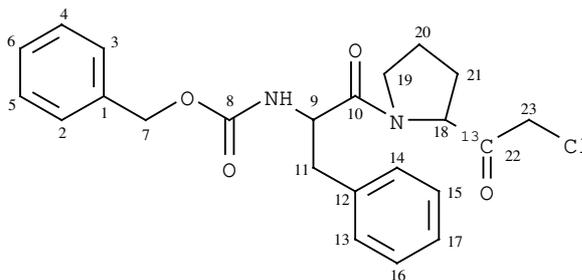
Darstellung: 10 mmol [¹³C]-Prolin (Promochem, Wesel) und 20 mmol NaHCO₃ werden in 30 ml Wasser gelöst. Die in 20 ml THF gelösten 10 mmol Z-Phe-OSu werden bei 23 °C zugetropft. Die Suspension läßt man 8 Stunden rühren, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Der THF-Anteil wird am Rotationsverdampfer abgetrennt und der wässrige Rückstand auf pH 2-3 eingestellt. Das Produkt wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Auszüge werden mit KHSO₄ und Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wird nach dem Einengen weiter eingesetzt.

Summenformeln:	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₅
Molmasse:	397,44 Da
Ausbeute:	84,4 % d. Th.
DC R _f -Wert (System):	0,81 (A); 0,93 (B); 0,88 (C)
HPLC:	Retentionszeit: 9,5 min, LiChroCART 125-4, 100 RP-18, λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 40 % Acetonitril in H ₂ O (0,1 % TFA)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ_{H} :	1,8-2,0 (4H, m, H_{20} , H_{21}); 2,7-3,0 (2H, m, H_{11}); 3,5-3,7 (2H, m, H_{19}); 4,2-4,4 (2H, m, H_{18} , H_9); 4,9 (2H, d, H_7); 7,1-7,4 (10H, m, H_2 - H_6 , H_{13} - H_{17}); 7,6-7,7 (1H, d, NH); 12,4 (1H, s, OH);
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ_{C} :	174,8 (^{13}C -Carbonyl am Prolin)
MALDI-TOF-MS m/z:	398,0 Da ($\text{M}+\text{H}^+$)
Elektrospray-MS m/z:	398,3 Da ($\text{M}+\text{H}^+$)

Z-Phe- ^{13}C Pro- CH_2Cl

Strukturformel:

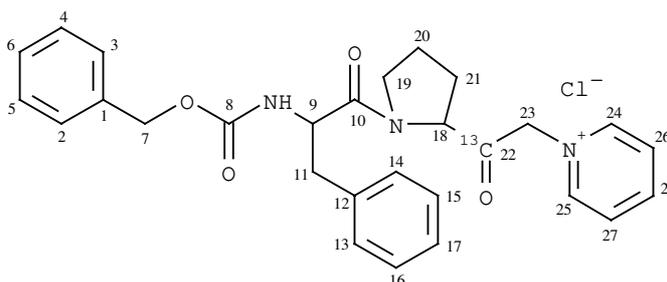


Darstellung: Z-Phe- ^{13}C Pro-OH wird nach Methode C mittels Diazomethan zum Z-Phe- ^{13}C Pro-Chlormethylketon umgesetzt. Auf eine gründliche Aufarbeitung wird verzichtet. Die Verbindung wird unmittelbar in die Folgereaktion eingesetzt.

Summenformen:	$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cl}$
Molmasse:	429,91 Da
Ausbeute:	87,3 % d. Th. Rohprodukt
DC R_f -Wert (System):	0,94 (B); 0,78 (C)
HPLC:	Retentionszeit: 16,8 min, LiChroChart 125-4, 100 RP-18, $\lambda = 220$ nm, Flußrate 1,0 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0,1 % TFA) Retentionszeit: 25,6 min, Nucleosil 7 C_8 , $\lambda = 220$ nm, Flußrate 8 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H_2O (0,1 % TFA)
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ_{C} :	202,2 (^{13}C -Carbonyl am Prolin)
MALDI-TOF-MS m/z:	430,1 Da ($\text{M}+\text{H}^+$)
Elektrospray-MS m/z:	430,3 Da ($\text{M}+\text{H}^+$)

Z-Phe- ^{13}C Pro- CH_2 -($\text{N}^+\text{C}_5\text{H}_5$) / Cl^-

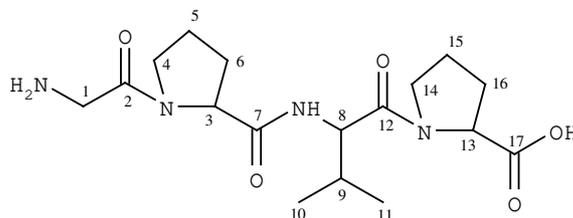
Strukturformel:



Darstellung:	10 mmol Z-Phe-[¹³ C]Pro-Chlormethylketon werden mit 2 ml Pyridin versetzt. Es wird 4 Tage bei 23 °C gerührt. Das überschüssige Pyridin wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Z-Phe-[¹³ C]Pro-Pyridinium-Methylketon wird abschließend einer HPLC-Reinigung unterzogen.
Summenformen:	C ₂₈ H ₃₀ N ₃ O ₄ Cl
Molmasse:	509,01 Da
Ausbeute:	53,4 % d. Th.
DC R _f -Wert (System):	0,34 (A); 0,73 (B); 0,67 (C)
HPLC:	Retentionszeit: 22,2 min, LiChrosorb RP 8 (Hibar); λ = 220 nm, Flußrate 8,0 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H ₂ O (0,1 % TFA) in 30 min Retentionszeit: 5,6 min, LiChroCART RP-18 (125*4); λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H ₂ O (0,1 % TFA) Retentionszeit: 22,8 min, Nucleosil 7 C ₈ , λ = 220 nm, Flußrate 8 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H ₂ O (0,1 % TFA)
¹³ C-NMR (DMSO-d ₆) δ _C :	201,9 (¹³ C-Carbonyl am Prolin)
MALDI-TOF-MS m/z:	472,9 Da (M+H ⁺ , ohne Chloridanion)
Elektrospray-MS m/z:	472,9 Da (M+H ⁺ , ohne Chloridanion)

H-Gly-Pro-Val-Pro-OH

Strukturformel:



Darstellung: Die Verbindung wird unter Verwendung von Wang-Harz (Beladung: 1,1 mmol/g) mittels Fmoc-Strategie dargestellt. Die externe Kupplung von Prolin ans Harz erfolgt nach Methode E. Die weiteren Aminosäuren Valin, Prolin und Glycin werden nach Methode D gekuppelt. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt mit 20 ml einer 50 %igen TFA-Lösung in DCM.

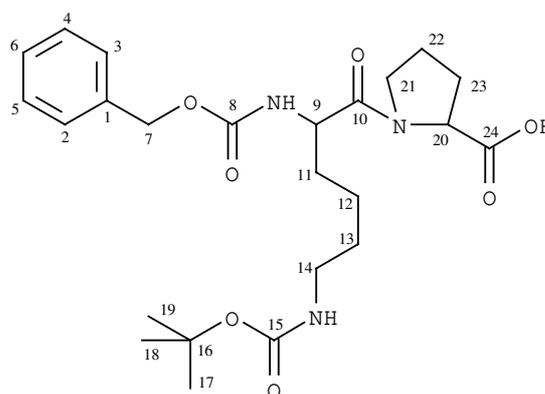
Summenformen:	C ₁₇ H ₂₈ N ₄ O ₅
Molmasse:	368,43 Da
Ausbeute:	26,4 % Rohprodukt d. Th.
DC R _f -Wert (System):	0,09 (A); 0,47 (B); 0,38 (C)
HPLC:	Retentionszeit: 2,3 min, LiChroCART 100 RP-18 (125-4); λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, 50 % isokratisch Acetonitril in H ₂ O (0,1 % TFA)

Retentionszeit: 10,7 min, Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm,
Flußrate 5 ml/min, 50 % isokratisch Acetonitril in H₂O (0,1 %
TFA)

MALDI-TOF-MS m/z: 368,9 Da (M+H⁺)

Z-Lys(Boc)-Pro-OH

Strukturformel:



Darstellung:

10 mmol Prolin und 20 mmol NaHCO₃ werden in 30 ml Wasser gelöst. Die in 20 ml THF gelösten 10 mmol Z-Lys(Boc)-OSu werden bei 23 °C zugetropft. Die Suspension läßt man 8 Stunden rühren, bis sich eine klare Lösung bildet. Der THF-Anteil wird am Rotationsverdampfer abgetrennt und der wässrige Rückstand auf pH 1 eingestellt. Das Produkt wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Auszüge mit KHSO₄ und Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wird nach dem Einengen weiter eingesetzt.

Summenformeln: C₂₄H₃₅N₃O₇

Molmasse: 477,55 Da

Ausbeute: 86,7 % d. Th.

DC R_f-Wert (System): 0,96 (A); 0,86 (B); 0,85 (C)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H: 1,3 (13H, s, H₁₂, H₁₃ u. H₁₇-H₁₉); 1,5-1,8 (4H, m, H₂₂ u. H₂₃); 1,9 (2H, s, H₁₁); 2,9 (2H, m, H₁₄); 3,2-3,8 (1H, br, OH); 3,6-3,7 (2H, m, H₂₁); 3,9 (1H, m, H₂₀); 4,2 (1H, m, H₉); 5,0 (2H, d, 7 Hz, H₇); 6,7 (1H, s, NH_{Lys-Seitenkette}); 7,3-7,4 (5H, m, H₂-H₆); 7,4-7,5 (1H, dd, 25 Hz, 6 Hz, NH_{Lys-Hauptkette})

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C: 137,6 (C₁); 128,4 (C₂, C₃); 128,2 (C₄, C₅); 128,9 (C₆); 65,8 (C₇); 156,2 (C₈); 52,7 (C₉); 171,1 (C₁₀); 29,5 (C₁₁); 23,2 (C₁₂); 29,3 (C₁₃); 30,8 (C₁₄); 156,8 (C₁₅); 77,9 (C₁₆); 28,6 (C₁₇, C₁₈, C₁₉); 58,9 (C₂₀); 45,3 (C₂₁); 24,9 (C₂₂); 28,9 (C₂₃); 174,5 (C₂₄)

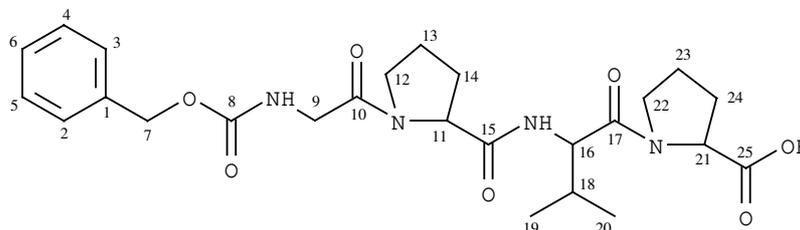
MALDI-TOF-MS m/z: 478,8,0 Da (M+H⁺); 422,4 Da (M-Fragment ohne Bu^t); 378,8 Da (M-Fragment ohne Boc)

Darstellung: An Fmoc-Gly-Sasrin-Harz wird Glycin und Nicotinsäure im halbautomatischen Festphasen-Peptidsynthesizer (Methode D) gekuppelt. Das Harz wird nun gründlich gewaschen, getrocknet und mit 2 eq. Z-Lys(Boc)-Pro-Chlormethylketon in DMF versetzt. Nach Zugabe einer katalytische Menge NaJ wird 3-6 Tage gerührt. Die Reaktion wird mittels MALDI-TOF-MS verfolgt. Nach Reaktionsende wird das Harz mit DCM und Diethylether gründlich gewaschen. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt mit 20 ml einer 10 %igen TFA-Lösung in DCM. Die Reaktionslösung wird eingengt und das Rohprodukt noch 5 mal mit 10 ml DCM versetzt und erneut eingengt. Das Produkt wird mittels HPLC gereinigt.

Summenformen: $C_{30}H_{39}N_6O_8Cl$
Molmasse: 647,12 Da
Ausbeute: 72,3 % d. Th.
DC R_f-Wert (System): 0,10 (A); 0,46 (B); 0,35 (C)
HPLC: Retentionszeit: 7,8 min, 125-4 LiChrospher, $\lambda = 220$ nm, Flußrate 1 ml/min, 10 - 100 % Gradient Methanol in H₂O (0,1 % TFA) in 30 min
MALDI-TOF-MS m/z: 612,6 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

Z-Gly-Pro-Val-Pro-OH

Strukturformel:

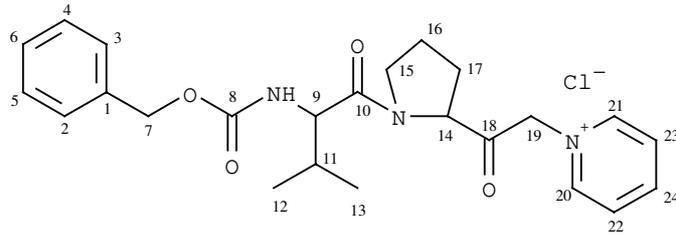


Darstellung: Z-Gly-Pro-Val-Pro-OH wird unter Verwendung von Wang-Harz (Beladung: 1,1 mmol/g) mittels Fmoc-Strategie dargestellt. Die externe Kupplung von Prolin ans Harz erfolgt nach Methode E. Die weiteren Aminosäuren Valin, Prolin und Z-Glycin werden nach Methode D gekuppelt,

Summenformen: $C_{25}H_{34}N_4O_7$
Molmasse: 502,56Da
Ausbeute: 37,8 % Rohprodukt d. Th.
DC R_f-Wert (System): 0,02 (A); 0,45 (B); 0,33 (C)
HPLC: Retentionszeit: 9,8 min, LiChrospher 250 RP-18 (250*4); $\lambda = 220$ nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 70 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)
MALDI-TOF-MS m/z: 503,7 Da (M+H⁺)

Z-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

Sowohl 10 mmol Z-Val-Pro-Chlormethylketon werden in Pyridin gelöst und bei 25 °C 5 Tage gerührt. Das überschüssige Pyridin wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Das Z-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon wird abschließend einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Summenformen:

C₂₄H₃₀N₃O₄Cl

Molmasse:

459,97 Da

Ausbeute:

45,8 % d. Th.

DC R_f-Wert (System):

0,16 (A); 0,81 (B); 0,79 (C)

HPLC:

Retentionszeit: 2,3 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4);
λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

Retentionszeit: 19,3 min, Nucleosil 7 C₈, λ = 220 nm,
Flußrate 8 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ_H:

0,8-1,0 (6H, m, H₁₂ u. H₁₃); 1,8-2,1 (3H, m, H₁₁ u. H₁₆); 2,2-2,4 (2H, m, H₁₇); 3,4-3,7 (2H, m, H₁₅); 3,7-4,1 (2H, m, H₂₀ u. H₂₁); 4,3-4,5 (1H, dd, 5 Hz, 8 Hz, H₉); 4,8-5,1 (2H, m, H₇); 5,8-6,2 (3H, m, H₁₄, H₁₉); 7,2-7,5 (5H, m, H₂-H₆); 8,2-8,3 (2H, m, H₂₂ u. H₂₃); 8,6-8,7 (1H, m, H₂₄); 8,8-9,0 (1H, d, 6 Hz, NH)

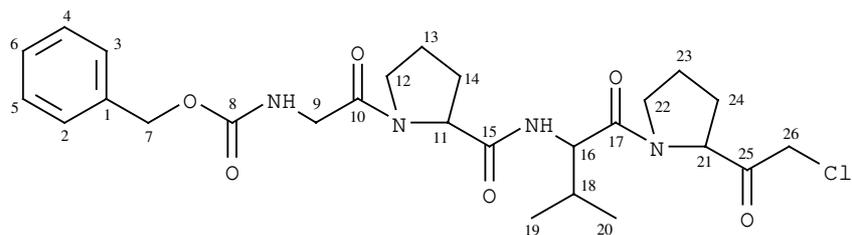
¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C:

136,8 (C₁); 127,9 (C₂, C₃); 127,8 (C₄, C₅); 128,4 (C₆); 66,7 (C₇); 156,3 (C₈); 57,9 (C₉); 170,8 (C₁₀); 29,7 (C₁₁); 18,5 (C₁₂, C₁₃); 63,7 (C₁₄); 47,2 (C₁₅); 25,1 (C₁₆); 27,9 (C₁₇); 200,3 (C₁₈); 71,1 (C₁₉); 146,1 (C₂₀, C₂₁); 128,3 (C₂₂, C₂₃); 146,4 (C₂₄)

MALDI-TOF-MS m/z:

424,6 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)Z-Gly-Pro-Val-Pro-CH₂Cl

Strukturformel:



Darstellung: Z-Gly-Pro-Val-Pro-OH wird nach Methode C mittels Diazomethan zum Z-Gly-Pro-Val-Pro-Chlormethylketon umgesetzt. Auf eine gründliche Aufarbeitung wird verzichtet. Die Verbindung wird unmittelbar in die Folgereaktion eingesetzt.

Summenformen: C₂₆H₃₅N₄O₆Cl

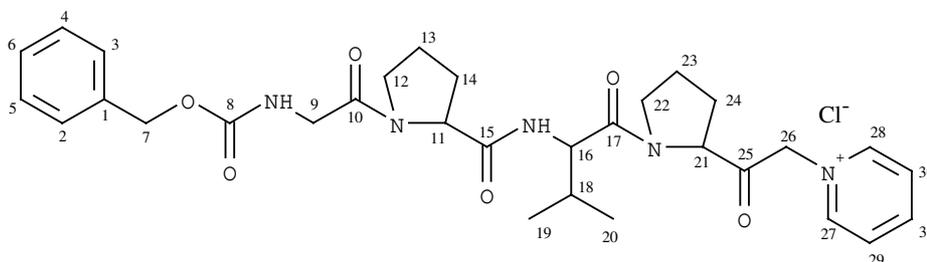
Molmasse: 535,04 Da

HPLC: Retentionszeit: 3,6 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4); λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

MALDI-TOF-MS m/z: 538,7 Da (M+H⁺)

Z-Gly-Pro-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung: 10 mmol Z-Gly-Pro-Val-Pro-Chlormethylketon werden mit 2 ml Pyridin versetzt. Es wird 4 Tage bei 23 °C gerührt. Das überschüssige Pyridin wird bei 2 mbar Vakuum abdestilliert. Z-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon wird abschließend einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Summenformen: C₃₁H₄₀N₅O₆Cl

Molmasse: 614,14 Da

HPLC: Retentionszeit: 17,4 min, LiChrosorb RP 8 Hibar, λ = 220 nm, Flußrate 8 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

Retentionszeit: 5,4 min, LiChroCART 100 RP-18 (250-4); λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

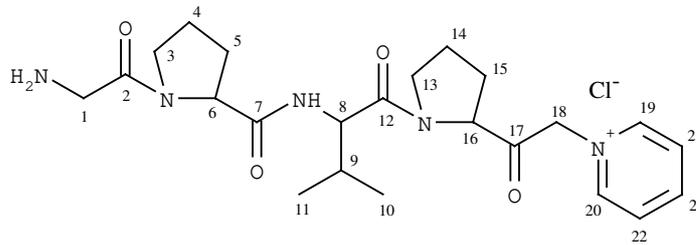
Retentionszeit: 17,7 min, Nucleosil 100 7 C₈, λ = 220 nm, Flußrate 5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ_C: 134,4 (C₁); 128,9 (C₂, C₃); 128,2 (C₄, C₅); 129,8 (C₆); 65,3 (C₇); 157,2 (C₈); 39,0 (C₉); 165,7 (C₁₀); 56,0 (C₁₁); 41,6 (C₁₂); 24,6 (C₁₃); 29,0 (C₁₄); 170,5 (C₁₅); 52,1 (C₁₆); 171,9 (C₁₇); 30,3 (C₁₈); 18,6, 19,3 (C₁₉, C₂₀); 58,9 (C₂₁); 47,2 (C₂₂); 25,0 (C₂₃); 29,4 (C₂₄); 196,5 (C₂₅); 65,8 (C₂₆); 137,9 (C₂₇, C₂₈); 129,1 (C₂₉, C₃₀); 146,5 (C₃₁)

MALDI-TOF-MS m/z: 579,7 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

H-Gly-Pro-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

Die Schutzgruppe wird von Z-Gly-Pro-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon nach Methode F in 5minütiger Reaktionszeit abgespalten. Die Verbindung konnte nicht mittels HPLC gereinigt werden, da es in Lösung zu weiteren Zerfallsreaktionen kommt.

Summenformen:



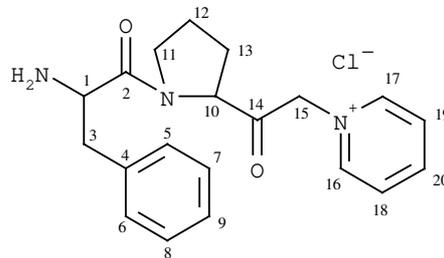
Molmasse:

480,0 Da

MALDI-TOF-MS m/z:

443,9 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)H-Phe-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

Die Z-Schutzgruppe wird von Z-Phe-Pro-Pyridinium-Methylketon nach Methode F in 5minütiger Reaktionszeit abgespalten. Die Verbindung konnte nicht mittels HPLC gereinigt werden, da es in Lösung zu weiteren Zerfallsreaktionen kommt.

Summenformen:



Molmasse:

373,88 Da

Ausbeute:

98 % d. Th.

DC R_F-Wert (System):

0,10 (A); 0,71 (B); 0,25 (C)

HPLC:

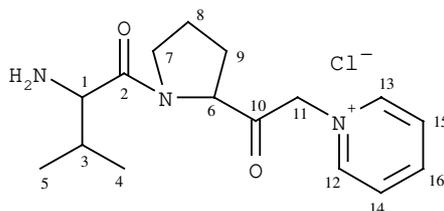
Retentionszeit: 6,9 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4);
λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in H₂O (0,1 % TFA)

MALDI-TOF-MS m/z:

337,2 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion)

H-Val-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung:

Die Z-Schutzgruppe wird von Z-Val-Pro-Pyridinium-Methylketon nach Methode F in 5minütiger Reaktionszeit abgespalten. Die Verbindung konnte nicht mittels HPLC gereinigt werden, da es in Lösung zu weiteren Zerfallsreaktionen kommt.

Summenformen:

C₁₆H₂₄N₃O₂Cl

Molmasse:

325,84 Da

Ausbeute:

97,7 % d. Th.

DC R_f-Wert (System):

0,15 (A); 0,59 (B); 0,38 (C)

HPLC:

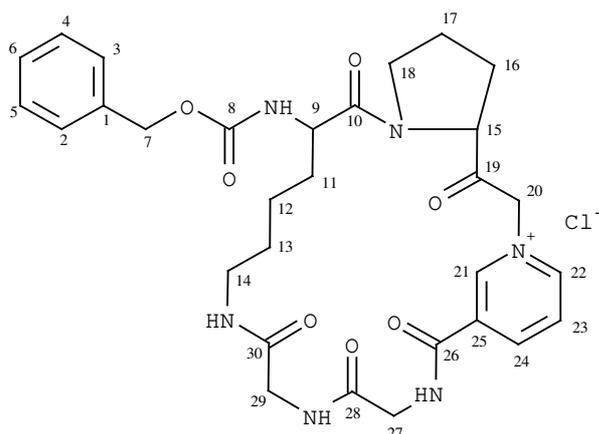
Retentionszeit: 7,4 min, LiChrosper 100 RP-18 (125-4);
λ = 220 nm, Flußrate 0,5 ml/min, isokratisch 50 % Acetonitril in
H₂O (0,1 % TFA)

MALDI-TOF-MS m/z:

291,2 Da (M+H⁺, ohne Chloridanion); 272,3 Da (M - H₂O); 193
(M - H₂O u. Pyridin)

γ-cyclo(Z-Lys-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₅)-m-CO-Gly₂-) / Cl⁻

Strukturformel:



Darstellung :

0,07 mmol Z-Lys-Pro-CH₂-(N⁺C₅H₄)-m-CO-Gly₂-OH wird in 2 ml DMF gelöst und mit 40 ml DCM weiter verdünnt. Der Lösung werden 1 Eq. NMM zugegeben und nach 5 Minuten 1 Eq. DCC, gelöst in 20 ml DCM, und 1 ml DMF, langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird nach 2 Tagen eingeeengt und das Produkt mittels HPLC gereinigt.

Summenformen: $C_{30}H_{37}N_6O_7Cl$
Molmasse: 629,11 Da
DC R_f -Wert (System): 0,06 (A); 0,57 (B); 0,33 (C)
MALDI-TOF-MS m/z: 593,2 ($M+H^+$, ohne Chloridanion)

5. Literaturverzeichnis

1. Yaron, A., Naider, F., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1993, 28, 31 - 81
2. Neurath, H., *Trends in Biochem. Sci.*, 1989, 14, 268 - 271
3. Walter, R., Simmons, W. H., Yoshimoto, T., *Mol. Cell. Biochem.*, 1980, 30, 111 - 127
4. Yaron, A., *Biopolymers*, 1987, 26, 215 - 222
5. Mentlein, R., *FEBS-Lett.*, 1988, 243, 251 - 256
6. Demuth, H.-U., Heins, J., in *Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) in metabolism and the immune response*, Fleischer, B. (Ed.) Springer-Verlag, Heidelberg, 1995, 1 - 35
7. Heins, J., Welker, P., Schönlein, C., Born, I., Hartrodt, B., Neubert, K., Tsuru, D., Barth, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 954, 161 - 169
8. Schneider, F., *Angew. Chemie*, 1978, 90, 616 - 625
9. Fastrez, J., *Eur. J. Biochem.*, 1983, 135, 339 - 341
10. Deslongchamps, P., *Tetrahedron*, 1975, 31, 2463 - 2490
11. Fischer, G., Heins, J., Barth, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 742, 452 - 462
12. Lin, L.-N., Brandts, J. F., *Biochemistry*, 1983, 22, 4480 - 4485
13. Brandts, J. F., Lin, L.-N., *Methods Enzymol.*, 1986, 131, 107 - 126
14. Polgar, L., *Methods Enzymol.*, 1995, 244, 188 - 200
15. Weidhase, R., Welker, P., Dove, S., Neubert, K., Yoshimoto, T., Tsuru, D., Barth, A., *Pharmazie*, 1984, 39, 835 - 837
16. Lasch, J., Koelsch, R., Steinmetzer, T., Neumann, U., Demuth, H.-U., *FEBS-Lett.*, 1988, 227, 171 - 174
17. Fleischer, B., *Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) in metabolism and the immune response*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1995, 1 - 199
18. Walter, R., Slank, H., Glass, J. D., Schwartz, I. L., Kerenyi, T. D., *Science*, 1971, 173, 827 - 829
19. Yoshimoto, T., Walter, R., Tsuru, D., *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 4786 - 4792
20. Szwajcer-Dey, E., Rasmus, J., Meldac, M., Breddam, K., *J. Bacteriol.*, 1992, 8, 2454 - 2459
21. Yoshimoto, T., Sattar, A. K. M. A., Hirose, W., Tsuru, D., *J. Biochem.*, 1988, 104, 622 - 627
22. Rawlings, N. D., Barrett, A. J., *Methods Enzymol.*, 1994, 244, 19 - 61
23. Kuwabara, T., *FEBS-Lett.*, 1990, 300, 127 - 130
24. Schönlein, C., Heins, J., Barth, A., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1990, 371, 1159 - 1164

25. Krishna, S. K., Ortwerth, B. J., *Exp. Eye Res.*, 1994, 59, 107 - 116
26. Kalwant, S., Porter, G., *Biochem. J.*, 1991, 276, 973 - 975
27. Demuth, H.-U., Schlenzig, D., Schierhorn, A., Grosche, G., Chapot-Chartier, M.-P., Gripon, J.-C., 1993, 320, 23 - 27
28. Andrews, P. C., Hines, C. M., Dixon, J. E., *Biochemistry*, 1980, 19, 5494 - 5500
29. Yoshimoto, T., Simmons, W. H., Kita, T., Tsuru, D., *J. Biochem.*, 1981, 90, 325 - 334
30. Yoshimoto, T., Nishimura, T., Kita, T., Tsuru, D., *J. Biochem.*, 1983, 94, 1179 - 1190
31. Landgraf, G., Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 1996
32. Yoshimoto, T., Orlowski, R. C., Walter, R., *Biochemistry*, 1977, 16, 2942 - 2948
33. Heymann, E., Mentlein, R., *Klin. Wochenschrift*, 1984, 62, 2 - 10
34. Checler, F., Amar, S., Kitabgi, P., Vincent, J. P., *Peptides*, 1986, 7, 1071 - 1077
35. O'Leary, R. M., O'Connor, B., *Eur. J. Biochem.*, 1995, 227, 277 - 283
36. Yoshimoto, T., Kanatani, A., Shimoda, T., Inaoka, T., Kokubo, T., Tsuru, D., *J. Biochem.* 1991, 110, 873 - 878
37. Chevallier, S., Goeltz, P., Thibault, P., Banville, D., Gagnon, J., *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 8192 - 8199
38. Diefenthal, T., Dargatz, H., Witte, V., Reipen, G., Svendsen, I., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, 40, 90 - 97
39. Kanatani, A., Yoshimoto, T., Kitazono, A., Kokubo, T., Tsuru, D., *J. Biochem.*, 1993, 113, 790 - 796
40. Rennex, D., Hemmings, B. A., Hosteenge, J., Stone, S. R., *Biochemistry*, 1991, 30, 2195 - 2203
41. Vanhoof, G., Goossens, F., Hendriks, L., De Meester, I., Hendriks, D., Vriend, G., Van Broeckhoven, C., Scharpe, S., *Gene*, 1994, 149, 363 - 366
42. Polgar, L., in *Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases*, in Barrett, A. J. (Ed.), Academic Press, San Diego, 1994, 188 - 200
43. Polgar, L., *Eur. J. Biochem.*, 1991, 197, 441 - 447
44. Polgar, L., *Biochemistry*, 1992, 31, 7729 - 7735
45. Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Yoshida, S., Sasakawa, S., Tamura, M., Umezawa, H., *Biochem. Int.*, 1989, 18, 383 - 389
46. Shirasawa, Y., Osawa, T., Hirashima, A., *J. Biochem.*, Tokyo, 1994, 115, 724
47. Plaut, A.G., *ICOP Newsletters*, 1991, 8, 4
48. Tsuru, D., *Yakugaku Zasshi - J. pharmac. Soc. Jap.*, 1993, 113, 683 - 697
49. Brenner, S., *Nature*, 1988, 334, 528 - 530

-
50. Pederson, R.A. (1994) *Gut Peptides*, Walch, J.H. and Dochray, G.J. eds. Raven Press, New York., 217 - 259
 51. Polgar, L., Szabo, E., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1992, 373, 361 - 366
 52. Pauly, R.P., Demuth H.-U., Rosche, F., Schmidt, J., White, H.A., McIntosh, C.H.S., Pederson, R. A., submitted
 53. Moriyama, A., Nakanishi, M., Takenaka, O., Sasaki, M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 956, 151 - 155
 54. Goosens, F., De Meester, I., Vanhoof, G., Hendriks, D., Vriend, G., Scharpe, S., *Eur. J. Biochem.*, 1995, 233, 432 - 441
 55. Mantle, D., Falkous, G., Ishiura, S., Blanchard, P. J., Perry, E. K., *Clin. Chim. Acta*, 1996, 249, 129 - 139
 56. Ratner, S., Clarke, H. T., *J. Am. chem. Soc.*, 1937, 59, 200 - 206
 57. Schutkowski, M., Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1991
 58. Nomura, K., *FEBS-Lett.*, 1986, 209, 235 - 237
 59. Jakob, M., Diplom, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1994
 60. Aoyagi, T., Wada, T., Nagai, M., Kojima, F., Harada, S., Takeuchi, T., Takahashi, H., Hirokawa, K., Tsumita, T., *Chem. Pharm. Bull.*, 1990, 38, 1748 - 1749
 61. Welches, W. R., Brosnihan, K. B., Ferrario, C. M., *Life. Sci.*, 1993, 52, 1461 - 1480
 62. Moriyama, A., Nakanishi, M., Sasaki, M., *J. Biochem.*, 1988, 104, 112 - 117
 63. Hartrodt, B., Neubert, K., Fischer, G., Demuth, H.-U., Yoshimoto, T., Barth, A., *Pharmazie*, 1982, 37, 72 - 73
 64. Atack, J. R., Suman-Chauhan, N., Dawson, G., Kulagowski, J. J., *Eur. J. Pharmacol.*, 1991, 205, 157 - 163
 65. Miura, N., Shibata, S., Watanabe, S., *Neurosci. Lett.*, 1995, 196, 128 - 130
 66. Portevin, B., Benoist, A., Remond, G., Herve, Y., Vincent, M., Lepagnol, J., De Nanteuil, G., *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 2379 - 2391
 67. Friedman, T. C., Wilk, S., *J. Neurochem.*, 1986, 46, 1231 - 1239
 68. Friedman, T. C., Wilk, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, 132, 787 - 794
 69. Checler, F., Emson, P. C., Vincent, J. P., Kitabgi, P., *J. Neurochem.*, 1984, 43, 1295 - 1301
 70. Canet, I., Meddour, A., Courtieu, J., Canet, J. L., Salalün, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 2155 - 2156
 71. Frick, L., Wolfenden, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 829, 311 - 318

-
72. Angelucci, L., Calvisi, P., Catini, R., Cosentino, U., Cozzolino, R., De Witt, P., Ghirardi, O., Giannessi, F., Giuliani, A., Guaraldi, D., Misiti, D., Ramacci, M. T., Scolastico, C., Tinti, M. O., *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 1511 - 1519
 73. Kamei, H., Ueki, T., Obi, Y., Fukagawa, Y., Oki, T., *Japan. J. Pharmacol.*, 1992, 60, 377 - 380
 74. Toide, K., Iwamoto, Y., Fujiwara, T., Abe, H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1995, 274, 1370 - 1378
 75. Ishiura, S., Tsukahara, T., Tabira, T., Shimizu, T., Arahata, K., Sugita, H., *FEBS-Lett.*, 1990, 260, 131 - 134
 76. Fukunari, A., Kato, A., Sakai, Y., Yoshimoto, T., Ishiura, S., Suzuki, K., Nakajima, T., *Neurosci. Lett.*, 1994, 176, 201 - 204
 77. Aoyagi, T., Wada, T., Nagai, M., Kojima, F., Harada, S., Takeuchi, T., Takahashi, H., Hirokawa, K., Tsumita, T., *Experientia*, 1990, 46, 94 - 97
 78. Gibson, A. M., Edwardson, J. A., Mc Dermott, J. R., *Neurosci. Res. Commun.*, 1991, 9, 73 - 81
 79. Kowall, N. W., Beal, M. F., Busciglio, J., Duffy, L. K., Yankner, B. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, 88, 7247 - 7251
 80. Nakajima, T., Ono, Y., Kato, A., Maeda, J.-I., Ohe, T., *Neuroscience Lett.*, 1992, 141, 156 - 160
 81. Ishiura, S., *J. Neurochem.*, 1991, 56, 363 - 369
 82. Yashida, K., Nakajima, S., Ootani, T., Saito, A., Amano, N., Takano, K., Uchiyama, Y., Haruki, E., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 1996, 21, 227 - 235
 83. Dr. Mönning, pers. Mitteilung, Schering AG, Berlin
 84. Ohmori, T., Nakagami, T., Tanaka, H., Maruyama, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 202, 809 - 815
 85. Shoji, S., Imazumi, K., Yamaoka, T., Funakoshi, T., Tanaka, J., Kambara, T., Ueki, H., Kubota, Y., *Biochem. Int.*, 1989, 18, 1183 - 1192
 86. Yamakawa, N., Shimeno, H., Soeda, S., Nagamatsu, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1037, 302 - 306
 87. Fransen, M., Brees, C.A., de Bethune, B., Van Veldhoven, P.P., Mannaerts, G.P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, 1201, 157 - 164
 88. Maes, M., Goosens, F., Scharpe, S., Meltzer, H.Y., D`Hondt, P., Cosyns, P., *Biol. Psychiatry*, 1994, 35, 545 - 552

-
89. Maes, M., Goossens, F., Scharpe, S., Calabrese, J., Desnyder, R., Meltzer, H. Y., *Psychiatry Res.*, 1995, 58, 217 - 225
 90. Welches, W. R., Santos, R. A. S., Chappell, M. C., Brosnihan, K. B., Greene, L. J., Ferrario, C. M., *J. Hypertension*, 1991, 9, 631 - 638
 91. Wilk, S., Orłowski, M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1979, 90, 1 - 6
 92. Mentlein, R., Heymann, E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982, 217, 748 - 750
 93. Hudlicky, M., *J. Org. Chem.*, 1980, 45, 5377 - 5378
 94. Pederson, R.A., Schubert, H.E., Brown, J.C., *Diabetes.*, 1975, 24, 1050 - 1056
 95. Medeiros, M. S., Turner, A. J., *Biochimie*, 1994, 76, 283 - 287
 96. Mentlein, R., Dahms, P., Grandt, D., Krüger, R., *Regul. Pept.*, 1993, 49, 133 - 144
 97. Heymann, E., Mentlein, R., *FEBS Lett.*, 1978, 91, 360 - 364
 98. Wang, L., Ahmad, S., Benter, I. F., Chow, A., Mizutani, S., Ward, P. E., *Peptides*, 1991, 12, 1357 - 1364
 99. Ahmad, S., Wang, L., Ward, P. E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992, 260, 1257 - 1261
 100. Hartrodt, B., Neubert, K., Fischer, G., Schulz, H., Barth, A., *Pharmazie*, 1982, 37, 165 - 169
 101. Hoffmann, T., Faust, J., Neubert, K., Ansorge, S., *FEBS-Lett.*, 1993, 336, 61 - 64
 102. Mentlein, R., Gallwitz, B., Schmidt, W. E., *Eur. J. Biochem.*, 1993, 214, 829 - 835
 103. Kieffer, T. J., McIntosh, C. H. S., Pederson, R. A., *Endocrinology*, 1995, 136, 3585 - 3597
 104. Pauly, R. P., Rosche, F., Wermann, M., McIntosh, C. H. S., Pederson, R. A., Demuth, H.-U., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 23222 - 23229
 105. Hopsu-Havu, V. K., Glenner, G. G., *Histochemie*, 1966, 7, 197 - 201
 106. Yoshimoto, T., Tsuru, D., *J. Biochem.*, 1982, 91, 1899 - 1906
 107. Zevaco, C., Monnet, V., Gripon, J.-C., *J. Appl. Bacteriol.*, 1990, 68, 357 - 366
 108. Stano, J., Kovacs, P., Nemeč, P., Neubert, K., *Biologia*, 1994, 49, 905 - 910
 109. Bordallo, C., Schwenke, J., Rendueles, M. S., *FEBS-Lett.*, 1984, 173, 199 - 203
 110. Kreil, G., Haiml, L., Suchanek, G., *Eur. J. Biochem.*, 1980, 111, 49 - 58
 111. Barth, A., Schulz, H., Neubert, K., *Acta biol. med. germ.*, 1974, 32, 157 - 174
 112. Ikehara, Y., Ogata, S., Misumi, Y., *Meth. Enzymol.*, 1994, 244, 215 - 227
 113. Lojda, Z., *Histochemistry*, 1977, 54, 299 - 309
 114. Püschel, G., Mentlein, R., Heymann, E., *Eur. J. Biochem.*, 1982, 126, 359 - 365

-
115. Küllertz, G., Fischer, G., Schönberner, H., Barth, A., in *Dipeptidyl peptidase IV – Chemie, Biochemie und physiologische Aspekte*, Küllertz, G., Oehme, P., Barth, A. (Eds.), Akademie-Industrie-Komplex Arzneimittelforschung, Berlin, 1981, 61
 116. Kabashima, T., Yoshida, T., Ito, K., Yoshimoto, T., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, 320, 123 - 128
 117. Mayo, B., Kok, J., Venema, K., Bockelmann, W., Teuber, M., Reinke, H., Venema, G., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57, 38 - 44
 118. Marguet, D., Bernard, A.-M., Vivier, I., Darmoul, D., Naquet, P., Pierres, M., *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 2200 - 2208
 119. Ogata, S., Misumi, Y., Ikehara, Y., *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 3596 - 3601
 120. Tanaka, T., Camerini, D., Seed, B., Torimoto, Y., Dang, N. H., Kameoka, J., Dahlberg, H. N., Schlossman, S. F., Morimoto, C., *J. Immunol.*, 1992, 149, 481 - 486
 121. Misumi, Y., Hayashi, Y., Arakawa, F., Ikehara, Y., *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1131, 333 - 336
 122. Wolf, B., Fischer, G., Barth, A., *Acta biol. med. germ.*, 1978, 37, 409 - 420
 123. Küllertz, G., Fischer, G., Barth, A., *Acta biol. med. germ.*, 1978, 37, 559 - 567
 124. Duke-Cohan, J. S., Morimoto, C., Rocker, J. A., Schlossman, S. F., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 14107 - 14114
 125. Duke-Cohan, J. S., Morimoto, C., Rocker, J. A., Schlossman, S. F., *J. Immunol.*, 1996, 156, 1714 - 1721
 126. Medrano, F. J., Alonso, J., Garcia, J. L., Romero, A., Bode, W., Gomis-Rüth, F. X., *The EMBO Journal*, 1998, 17, 1 - 9
 127. Kreisel, W., Hildebrandt, H., Mossner, W., Tauber, R., Reutter, W., *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 1993, 374, 255 - 263
 128. Löster, K., Zeilinger, K., Schuppan, D., Reutter, W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, 217, 341 - 348
 129. Brandt, W., Ludwig, O., Thondorf, I., Barth, A., *Eur. J. Biochem.*, 1996, 236, 109 - 114
 130. Bernhard, A.-M., Mattei, M.-G., Pierres, M., Marguet, D., *Biochemistry*, 1994, 33, 15204 - 15214
 131. Rawlings, N. D., Polgar, L., Barrett, A. J., *Biochem. J.*, 1991, 279, 907 - 911
 132. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1992, 373, 353 - 360
 133. Miyamoto, Y., Ganapathy, V., Leibach, F. H., *Contr. Nephrol.*, 1988, 68, 1 - 5

-
134. Tiruppathi, C., Miyamoto, Y., Ganapathy, V., Roesel, R. A., Whitford, M., Leibach, F. H., *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 1476 - 1483
 135. Tiruppathi, C., Ganapathy, V., Leibach, F., *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 2048 - 2053
 136. Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S.F., Morimoto, C., *Science*, 1993, 261, 466 - 469
 137. Rahfeld, J., Schutkowski, M., Faust, J., Neubert, K., Barth, A., Heins, J., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1991, 372, 313 - 318
 138. Bongers, J., Lambros, T., Ahmad, M., Heimer, E. P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1122, 147 - 153
 139. Heins, J., Neubert, K., Barth, A., Canizaro, P. C., Behal, F. J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 785, 30 - 35
 140. Brandt, W., Lehmann, T., Thondorf, I., Born, I., Schutkowski, M., Rahfeld, J.-U., Neubert, K., Barth, A., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1995, 46, 494 - 507
 141. Demuth, H.-U., Habilitation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1988
 142. Heins, J., Habilitation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1988
 143. Yabe, Y., Guillaume, D., Rich, D. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 4043 - 4044
 144. Hegen, M., Niedobitek, G., Klein, C.E., Stein, H., Fleischer, B., *J. Immunol.*, 1990, 144, 2908 - 2912
 145. Scott, A. I., Mackenzie, N. E., Malthouse, J. P. G., Primrose, W. U., Fagerness, P. E., Brisson, A., Le Zong Qi, Bode, W., Carter, C. M., Yi Jin Jang, *Tetrahedron*, 1986, 42, 3269 - 3276
 146. Dupré, J., Ross, S.A., Watson, D., Brown, J.C., *J. Clin. Endocrinol. Meta.*, 1973, 37, 826 - 828
 147. Ansorge, S., Schön, E., Kunz, D., *Biomed. Biochim. Acta*, 1991, 50, 799
 148. Torimoto, Y., Dang, N. H., Vivier, E., Tanaka, T., Schlossman, S. F., Morimoto, C., *J. Immunol.*, 1991, 147, 2514-2517
 149. De Meester, I., Vanham, G., Kestens, L., Vanhoof, G., Bosmans, E., Gigase, P., Scharpe, S., *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 566 - 570
 150. Gutheil, W.G., Subramanyam, M., Flentke, G.R., Sanford, D.G., Munoz, E., Huber, B.T., Bachovchin, W.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 6594 - 6598
 151. Hanski, C., Huhle, T., Reuter, W., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1985, 366, 1169 - 1176
 152. Piazza, G. A., Callanan, H. M., Mowery, J., Hixon, D. C., *Biochem. J.*, 1989, 262, 327 - 334

-
153. Löster, K., Zeilinger, K., Schuppan, D., Reutter, W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, 217, 341 - 348
 154. Kettner, C. A., Bone, R., Agard, D. A., Bachovchin, W. W., *Biochemistry*, 1988, 27, 7682 - 7688
 155. Callebaut, C., Krust, B., Jacotot, E., Hovanessian, A. G., *Science*, 1993, 262, 2045 - 2050
 156. Morimoto, C., Lord, C. I., Zhang, C., Duke - Cohan, J. S., Letvin, N. L., Schlossman, S. F., *Immunology*, 1994, 91, 9960 - 9964
 157. Werner, A., Mattern, T., Ulmer, A. J., Flad, H. D., Kurth, R., Baier, M., *AIDS*, 1994, 8, 1348 - 1349
 158. Broder, C. C., Nussbaum, O., Gutheil, W. G., Bachovchin, W. W., Berger, E. A., *Science*, 1994, 264, 1156 - 1159
 159. Dalglish, A., *Nature Medicine*, 1995, 1, 881 - 882
 160. Oravec, T., Roderiques, G., Koffi, J., Wang, J., Ditto, M., Bou-Habib, D. C., Lusso, P., Norcross, M. A., *Nature Medicine*, 1995, 1, 919 - 926
 161. Lazaro, I., Nanche, D., Signoret, N., Bernhard, A.-M., Marguet, D., Klatzmann, D., Dragic, T., Alizon, M., Sattentau, Q., *J. Virol.*, 1994, 68, 6535 - 6546
 162. Bachovchin, W. W., Plaut, A. G., Flentke, G. R., Lynch, M., Kettner, C. A., *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 3738 - 3743
 163. Reinhold, D., Wrenger, S., Bank, U., Bühling, F., Hoffmann, T., Neubert, K., Kraft, M., Frank, R., Ansorge, S., *Immunobiology*, 1996, 195, 119 - 128
 164. Hoffmann, T., Reinhold, D., Kähne, T., Faust, J., Neubert, K., Frank, R., Ansorge, S., *J. Chromatogr. A*, 1995, 716, 355 - 362
 165. Wrenger, S., Reinhold, D., Hoffmann, T., Kraft, M., Frank, R., Faust, J., Neubert, K., Ansorgen, S., *FEBS-Lett.*, 1996, 383, 145 - 149
 166. Subramanyam, M., Gutheil, W. G., Bachovchin, W. W., Huber, B. T., *J. Immunol.*, 1993, 150, 2544-2553
 167. Brown, J.C., Dahl, M., Kwawk, S., McIntosh, C.H.S., Otte, S.C. and Pederson, R.A. *Peptides*, 1981, 2, 241
 168. Schmidt, W.E., Siegel, E.G., Gallwitz, B. Kummel, H., Ebert, R. and Creutzfeldt, W., *Diabetologia*, 1986, 29, 591A
 169. Adelhorst, K., Hedegaard, B.B., Knudsen, L.B. and Kirk, O., *J. Biol. Chem.*, 1994, 296, 6275
 170. Fischer, G., *Nat. Prod. Rep.*, 1988, 5, 465 - 495

-
171. Demuth, H.-U., Neumann, U., *Pharmazie*, 1989, 44, 1 - 11
 172. Demuth, H.-U., *J. Enzyme Inhibition*, 1990, 3, 249 - 278
 173. Kenny, A. J., Booth, A. G., Macnair, R. D. C., *Acta biol. med. germ.*, 1977, 36, 1575 - 1585
 174. Kovach, I. M., Larson, M., Schowen, R. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 5490 - 5495
 175. Schellenberger, A., VEB Gustav Fischer, Jena, 1989
 176. Demuth, H.-U., McIntosh, C.H.S., Rosche F., Pauly R.P., Pederson R.A., Schmidt J., patent application 19616486.9 (1996)
 177. Rahfeld, J. U., Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1989
 178. Demuth, H.-U., Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 1981
 179. Fittkau, S., *J. für prakt. Chemie*, 1973, 315, 1037 - 1044
 180. Fittkau, S., Jahreis, G., Peters, K., *J. Für prakt. Chemie*, 1986, 328, 529 - 538
 181. Abeles, R. H., Maycock, A. L., *Acc. of chem. Research*, 1976, 9, 313 - 319
 182. White, E. H., Roswell, D. F., Politzer, I. R., Branchini, B. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 2290 - 2291
 183. White, E. H., Jelinski, L. W., Politzer, I. R., Brachini, B. R., Roswell, D. F., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 4231 - 4239
 184. Krafft, G. A., Katzenellenbogen, J. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 5459 - 5466
 185. Fischer, G., Demuth, H.-U., Barth, A., *Pharmazie*, 1983, 38, 249 - 250
 186. Brömme, D., Schierhorn, A., Kirschke, H., Wiederanders, B., Barth, A., Fittkau, S., Demuth, H.-U., *Biochem. J.*, 1989, 263, 861 - 866
 187. Brömme, D., Demuth, H.-U., *Methods Enzymol.*, 1994, 244, 671 - 685
 188. Zerner, D., Bond, R. P. M., Bender, M. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86, 3674 - 3679
 189. Fink, A. L., *Enzyme Mechanisms*, Page, M. I., Williams, A., Universities Press, Belfast, 1987, 159 - 177
 190. Zimmerman, M., Morman, H., Mulrey, D., Jones, H., Franksuhn, R., Ashe, B. M., *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 9848 - 9851
 191. Ashe, B. M., Clark, R. C., Jones, H., Zimmerman, M., *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 11603 - 11606
 192. Wilk, S., Orłowski, M., *J. Neurochem.*, 1983, 41, 69 - 75
 193. Imperiali, B., Abeles, R. H., *Biochemistry*, 1986, 25, 3760 - 3767
 194. Imperiali, B., Abeles, R. H., *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 135 - 138
 195. Trianor, D. A., Bergeson, S. H., Schwartz, J. A., Stein, M. A., Wildonger, R. A., Edwards, P. D., Shaw, A., Wolanin, D., *Eur. Pat. Appl. 0189305 A2*, 1986

-
196. Triantor, D. A., *Trends in Pharm. Science*, 1987, 8, 303 - 307
 197. Thompson, R. C., *Biochemistry*, 1973, 12, 47 - 51
 198. Tsuru, D., Yoshimoto, T., Koriyama, N., Furukawa, S., *J. Biochem.*, 1988, 104, 580 - 586
 199. Koehler, K. A., Lienhard, G. E., *Biochemistry*, 1971, 10, 2477 - 2483
 200. Kettner, C. A., Shenvi, A. B., *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 15106 - 15114
 201. Gutheil, W. G., Bachovchin, W. W., *Biochemistry*, 1993, 32, 8723 - 8731
 202. Coutts, S. J., Kelly, T. A., Snow, R. J., Kennedy, C. A., Barton, R. W., Adams, J., Krolukowski, D. A., Freeman, D. M., Campbell, s. J., Ksiazek, J. F., Bachovchin, W. W., *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 2087 - 2094
 203. Sudmeier, J. L., Gunther, U. L., Gutheil, W. G., Coutts, S. J., Snow, R. J., Barton, R. W., Bachovchin, W. W., *Biochemistry*, 1994, 33, 12427 - 12438
 204. Kelly, T. A., Adams, J., Bachovchin, W. W., Barton, R. W., Campbell, S. J., Coutts, S. J., Kennedy, C. A., Snow, R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 12637 - 12638
 205. Yoshimoto, T., Fischl, M., Orłowski, R. C., Walter, R., *J. Biol. Chem.*, 1977, 253, 3708 - 3716
 206. Tanaka, T., Saitoh, M., Hashimoto, M., Higuchi, N., *Eur. Pat. Appl. EP 201742 A2*, 1986
 207. Higuchi, N., Saitoh, M., Hashimoto, M., Fukami, H., Tanaka, T., *Eur. Pat. Appl. EP 224272*, 1987
 208. Schönlein, C., Dissertation A, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1989
 209. Born, I., Faust, J., Heins, J., Barth, A., Neubert, K., *Eur. J. Cell Biol. Suppl.*, 1994, 40, 23 - 27
 210. Li, J., Wilk, E., Wilk, S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, 323, 148 - 154
 211. Ashworth, D. M., Atrash, B., Baker, G. R., Baxter, A. J., Jenkins, P. D., Jones, D. M., Szelke, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, 6, 1163 - 1166
 212. Steinmetzer, T., Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1991
 213. Deacon, F.C., Johnsen, A.H., Holst, J. J., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995, 80, 952 - 957
 214. Nishikata, M., Yokosawa, H., Ishii, S.-I., *Chem. Pharm. Bull.*, 1986, 34, 2931 - 2936
 215. Fischer, G., Habilitation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1978
 216. Bakker, A. V., Jung, S., Spencer, R. W., Vinick, F. J., Faraci, W. S., *Biochem. J.*, 1990, 271, 359 - 362

-
217. Gupton, B. F., Carroll, D. L., Tuhy, P. M., Kam, C.-M., Powers, J. C., *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 4279 - 4287
 218. Powers, J. C., Boone, R., Carroll, D. L., Gupton, B. F., Kam, C.-M.; Nishino, N., Sakamoto, M., Tuhy, P. M., *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 4288 - 4294
 219. Demuth, H.-U., Neumann, U., Barth, A., *Advances in Biosciences*, 1987, 65, 181 - 188
 220. Neumann, U., Steinmetzer, T., Barth, A., Demuth, H.-U., *J. Enzym. Inhib.*, 1991, 4, 213 - 226
 221. Shaw, E., Green, G. D. J., *Meth. in Enzymol.*, 1981, 80, 820 - 826
 222. Green, G. D. J., Shaw, E., *Arch. Biochem Biophys.*, 1983, 225, 331 - 337
 223. Demuth, H.-U., Diplom, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1977
 224. Bachovchin, W. W., Wong, W. Y. L., Farr-Jones, S., Shenvi, A. B., Kettner, C. A., *Biochemistry*, 1988, 27, 7689 - 7697
 225. Curtius, T., *Ber. dt. chem. Gesell.*, 1894, 27, 778 - 784
 226. Lossen, W. *Liebigs Ann. Chem.*, 1875, 175, 271 - 304
 227. Demuth, H.-U., Baumgrass, R., Schaper, C., Fischer, G., Barth, A., *J. Enzyme Inhibition*, 1988, 2, 129 - 142
 228. Demuth, H.-U., Neumann, U., Barth, A., *J. Enzyme Inhibition*, 1989, 2, 239 - 248
 229. Shaw, E., *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 2768 - 2772
 230. Zumbrunn, A., Stone, S., Shaw, E., *Biochem. J.*, 1988, 256, 989 - 994
 231. Rauber, P., Walker, B., Stone, S., Shaw, E., *Biochem. J.*, 1988, 250, 871 - 876
 232. Steinmetzer, T., Silberring, J., Mrestani-Klaus, C., Fittkau, S., Barth, A., Demuth, H.-U., *J. Enz. Inhib.*, 1993, 7, 77 - 85
 233. Boduszek, B., Oleksyszyn, J., Kam, C.-M., Selzler, J., Smith, R. E., Powers, J. C., *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 3969 - 3976
 234. Lambier, A.-M., Borloo, M., De Meester, I., Belyaev, A., Augustyns, K., Hendriks, D., Scharpe, S., Heamers, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1290, 76 - 82
 235. Wakselman, M., Nguyen, C., Mazaleyrat, J.-P., Callebaut, C., Blanco, J., Jacoto, E., Krust, B., Hovanessian, A. G., *24th Eur. Pept. Symp.*, 1996, P44
 236. Aoyagi, T., Nagai, M., Ogawa, K., Kojima, F., Okada, M., Ikeda, T., Hamada, M., Takeuchi, T., *J. Antibiot.*, 1991, 44, 949 - 955
 237. Nagai, M., Ogawa, K., Muraoka, Y., Naganawa, H., Aoyagi, T., Takeuchi, T., *J. Antibiot*, 1991, 44, 956 - 961
 238. Toda, S., Obi, Y., Numata, K.-I., Hamagishi, Y., Tomita, K., Komiyama, N., Kotake, C., Furumai, T., Oki, T., *J. Antibiot.*, 1992, 45, 1573 - 1579

-
239. Toda, S., Kotake, C., Tsuno, T., Narita, Y., Yamasaki, T., Konishi, M., *J. Antibiot.*, 1992, 45, 1580 - 1586
240. Yoshimoto, T., Tsukumo, K., Takatsuka, N., Tsuru, D., *J. Pharmacobio. Dyn.*, 1982, 5, 734 - 740
241. Soeda, N. T., Yamakawa, N., Ohyama, M., Shimeno, H., Nagamatsu, A., *Chem. Pharm. Bull.*, 1985, 33, 2445 - 2451
242. Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1987, 3. Auflage, Seite 70
243. Weygand, C., Hilgetag, G., *Organisch Chemische Experimentierkunst*, J. A. Barth, Leipzig, 1970, 459 - 473
244. Houben-Weyl, *Methoden der organischen Chemie*, Band XI/2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, 591 - 640
245. Autorenkollektiv, *Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin, 1984
246. Kröhnke, F., *Angew. Chem.*, 1953, 65, 605 - 626
247. Ikeda, S., Ashley, I. A., Wirsching, P., Janda, K. D., *J. Am. chem. Soc.*, 1992, 114, 7604 - 7606
248. Gonzalez-Muniz, R., Dominguez, M. J., Garcia-Lopez, M. T., *Tetrahedron*, 1992, 48, 5191 - 5198
249. Meienhofer, J., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Academic Press, New York, 1975 - 1987, Vol. 1, Kap. 6
250. Jakubke H.-D., *Peptide*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996
251. Houben-Weyl, *Methoden der organischen Chemie*, Band XV/1 und 2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974
252. D'Ans, Lax, *Taschenbuch für Chemiker und Physiker*, 4. Auflage, Band II, organische Verbindungen Synowietz, C., Springer Verlag, Berlin 1983
253. King, L. C., Miller, F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, 70, 4154 - 4155
254. Sheeman, J. C., Hess, G. P., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1955, 77, 1067 - 1068
255. Kahyaoglu, A., Haghjoo, K., Kraicsovits, F., Jordan, F., Polgar, L., *Biochem. J.*, 1997, 322, 839 - 843
256. Karras, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F., *Int. J. Mass spectrom. Ion Proc.*, 1987, 78, 53 - 68
257. Stults, J. T., *Current Opinion in Structural Biology*, 1995, 5, 691 - 698
258. Karras, M., Hillenkamp, F., *Anal. Chem.*, 1988, 60, 2299 - 2301

-
259. Börnsen, K. O., Schär, M., Widmer, H. M., *Chimia*, 1990, 44, 412 - 416
260. Karras, M., Bahr, U., Strupat, K., Hillenkamp, F., Tsarbopoulos, A., Pramanik, B. N., , *Anal. Chem.*, 1995, 67, 675 - 679
261. Hillenkamp, F., Karras, M., Beavis, R. C., Chait, B. T., *Anal. Chem.*, 1991, 63, 1193A - 1203A
261. Kaufmann, R., *J. Biotech.*, 1995, 41, 155 - 175
262. Zhu, Y. F., Lee, K. L., Tang, K., Allman, S. L., Taranenko, N. I., Chen, C. H., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1995, 9, 1315 - 1320
263. Buchan, A. M. J., Polak, J. M., Capella, C., Solcia, E., Pearse, A. G. E., *Histochem.*, 1978, 546, 37 - 44
264. Brown, J. C., Pederson, R. A., *Endocrinology (Proceedings of the Vth International Congress of Endocrinology)*, 1976, 2, 568 - 570
265. Duncan, M. W., Matanovic, G., Cerpa-Poljak, A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1993, 7, 1090 - 1094
266. Tang, K., Allman, S. L., Jones, R. B., Chen, C. H., *Anal. Chem.*, 1993, 65, 2164 - 2166
267. Harvey, D. J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1993, 7, 614 - 619
268. Nelson, R. W., McLean, M. A., Hutchens, T. W., *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1408 - 1415
269. Abell, D. C., Sporns, P., *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 2292 - 2296
270. Gusev, A. I., Wilkinson, W. R., Proctor, A., Hercules, D. M., *Anal. Chem.*, 1995, 67, 1034 - 1041
271. Jespersen, S., Niessen, W. M. A., Tjaden, U. R., van der Greef, J., *J. Mass Spectrom.*, 1995, 30, 357 - 364
272. Nicola, J. A., Gusev, A. I., Prostor, A., Jackson, E. K., Hercules, D. M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1995, 9, 1164 - 1171
273. Gusev, A. I., Wilkinson, W. R., Proctor, A., Hercules, D. M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 354, 455 - 463
274. Muddiman, D. C., Gusev, A. I., Martin L. B., Hercules, D. M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 354, 103 - 110
275. Tang, X., Sadeghi, M., Olumee, Z., Vertes, A., Braatz, J. A., McIlwain L. K., Dreifuss, P. A., *Anal. Chem.*, 1996, 68, 3740 - 3745
276. Yu, J., Butelman, E. R., Woods, J. H., Chait, B. T., Kreek, M. J., *J. Pharmacol. Experimental Therapeutics*, 1996, 279, 507 - 514
277. Sarracino, D., Richert, C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, 6, 2543 - 2548

-
278. Gusev, A. I., Muddiman, D. C., Proctor, A., Sharkey, A. G., Hercules, D. M., Tata, P. N. V. Venkataramanan, R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1996, 10, 1215 - 1218
279. Spickermann, J., Martin, K., Räder, H. J., Müllen, K., Schlaad, H., Müller, A. H. E., Krüger, R.-P., *Eur. Mass Spectrom.*, 1995, 2, 161 - 165
280. Berlin, K., Jain, R. K., Tetzlaff, C. Steinbeck, C., Richert, C., *Chemistry Biologie*, 1997, 4, 63 - 77
281. Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E., Sisodia, S. S., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 31894 - 31902
282. Nicola, A. J., Gusev, A. I., Hercules, D. M., *Appl. Spectroscopy*, 1996, 50, 1479 - 1482
283. Wilkinson, W. R., Gusev, A. I., Proctor, A., Houalla, M., Hercules, D. M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 357, 241 - 248
284. Goheen, S. C., Wahl, K. L., Campbell, J. A., Hess, W. P., *J. Mass Spectrom.*, 1997, 32, 820 - 828
285. Morrison, J., *Trends in Biochem. Sci.*, 1982, 7, 102 - 105
286. Morrison, J., Walsh, C.T., *Adv. Enzymol.*, J. Wiley & Sons, New York, 1988, 61, 201 - 301.
287. Szedlacsek, S. E., Duggleby, R. G., *Methods Enzymol.*, 1995, 249, 144 - 180
288. Sculley, M. J., Morrison, J. F., *Biochim Biophys Acta*, 1986, 874, 44 - 53
289. Brown, J. C., Pederson, R. A., *Scand. J. Gastroenterol.*, 1970, 5, 537 - 541
290. Rehse, P. H., Steinmetzer, T., Li, Y., Konishi, Y., Cygler, M., *Biochemistry*, 1995, 34, 11537 - 11544
291. Gordon, E. M., Natarajan, S., Pluscec, J., Weller, H. N., Godfrey, J. D., Rom, M. B., Sabo, E. F., Engebrecht, J., Cushman, D. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1984, 124, 148 - 155
292. Stennicke, H. R., Henriksen, D. B., Breddam, K., *Protein Peptide Lett.*, 1996, 3, 75 - 80
293. Wolfenden, R., Frick, L., *Enzyme Mechanisms*, Page, M. I., Williams, A., (Hrsg.), 1987, 97 - 122
294. Wolfenden, R., *Acc. Chem. Res.*, 1972, 5, 10 - 18
295. Wolfenden, R., *Nature*, 1969, 223, 704 - 705
296. Johne, S., Gröger, D., *Pharmazie*, 1977, 32, 1 - 15
297. Prasad, C., *Peptides*, 1995, 16, 151 - 164
298. Hendriks, D., DeMeester, I., Umiel, T., Vanhoof, G., van Sande, M., Scharpe, S., Yaron, A., *Clin. Chim. Acta*, 1991, 196, 87 - 96

-
299. Sattar, A. K. M. A. Yamamoto, N., Yoshimoto, T., Tsuru, D., *J. Biochem.*, 1992, 107, 256 - 261
300. Ogata, S., Misumi, Y., Tsuji, E., Takami, N., Oda, K., Ikehara, Y., *Biochemistry*, 1992, 31, 2582 - 2587
301. David, F., Bernhard, A.-M., Pierres, M., Marguet, D., *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 17247 - 17252
302. Schön, E., Jahn, S., Kiessig, S. T., Demuth, H.-U., Neubert, K., Barth, A., von Baehr, R., Ansorge, S., *Eur. J. Immunol.*, 1987, 17, 1821 - 1826
303. Flentke, G. R., Munoz, E., Huber, B. T., Plaut, G., Kettner, C. A., Bachovchin, W. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, 88, 1556 - 1559
304. Polgar, L., Asboth, B., *Struktur-Funktions-Beziehung in Proteasen und ausgewählten Proteinen*, Schellenberger, A., Schütte, H. R., (Hrsg.), 1985, 111 - 120
305. Demuth, H.-U., Schönlein, C., Barth, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, 996, 19 - 22
306. Demuth, H.-U., Fischer, G., Barth, A., Schowen, R. L., *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 5880 - 5883
307. Lienhard, G. E., *Science*, 1973, 180, 149 - 154
308. Pederson, R. A., Buchan, A. M. J., Zahedi-Asl, S., *Regul. Pept.*, 1982, 5, 53 - 63
309. Schlechter, I., Berger, A., *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 1967, 27, 157 - 162
310. Schmidt, J., Wermann, M., Rosche, F., Demuth, H.-U., *Protein Peptide Lett.*, 1996, 3, 385 - 392

6. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Hans-Knöll-Institut (Jena) auf Anregung und unter Anleitung von Dr. habil. Hans-Ulrich Demuth in den Räumen des Technologie- und Gründerzentrums in Halle an der Saale. An dieser Stelle möchte ich ihm für die allzeit freundliche Unterstützung, seine ständige Diskussionsbereitschaft, die hervorragenden instrumentellen Möglichkeiten und den gewährten Freiraum zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten ganz herzlich danken. Die Teilnahme an nationalen und internationalen Tagungen gaben mir Gelegenheit, unsere Arbeiten und Ergebnisse einem größeren wissenschaftlichen Publikum zur Diskussion zu stellen.

Da die Arbeitsgruppe keiner universitären Einrichtung angehört, wird diese Arbeit an der Universität Hannover eingereicht. Herrn Prof. Scheper danke ich für die großzügige und unkomplizierte Behandlung meines Promotionsgesuches.

Bedanken möchte ich mich auch für die Unterstützung meiner Arbeit durch meine Kolleginnen und Kollegen und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Dr. Fred Rosche analysierte viele meiner synthetisierten Verbindungen mittels Massenspektrometrie. Christina Gärtner unterstützte mich bei den praktischen Tätigkeiten im Labor. Kerstin Kühn-Wache, Christian Krüger, Dr. Torsten Hoffmann und Michael Wermann stellten die eingesetzte PEP bzw. DP IV durch unermüdliches Präparieren stets in ausreichender Menge zur Verfügung. Angela Rosche, André Niestroj, Dr. Fred Rosche, Dr. Torsten Hoffmann und Dr. Konrad Glund haben das Manuskript kritisch durchgesehen.

Die synthetisierten Verbindungen wurden durch Mitarbeiter der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg charakterisiert. Ihnen allen gilt mein Dank. Frau Bayer, Fachbereich Pharmazie, half durch ihre gewissenhafte Durchführung der Elementaranalysen. Das NMR-Team des Fachbereiches Chemie bewies viel Geduld beim Analysieren der Verbindungen, trotz oft geringer Substanzmengen. Die mechanistischen NMR-Untersuchungen (Kapitel 2.2.3.) erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Carmen Mrestani-Klaus vom Institut für Biochemie. Sie führte die NMR-Messungen durch und fand Zeit für die kritische Diskussion experimenteller Methoden und Ergebnisse.

Die Initiative von Dr. H.-U. Demuth und Robert Pauly führte zu einer äußerst interessanten wissenschaftlichen Arbeit (Senkung des Blutzuckerspiegels). Prof. Ray Pederson und Prof. Chris McIntosh gilt mein besonderer Dank für die erwiesene wissenschaftliche Förderung während meines Forschungsaufenthaltes an ihrer Einrichtung in Vancouver. Allen Mitarbeitern ihrer Forschungsgruppe, insbesondere Heather White und Robert Pauly sowie

vielen Kolleginnen und Kollegen des Departments of Physiology der University of British Columbia danke ich für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit, der Boehringer-Ingelheim-Stiftung für die finanzielle Unterstützung der Reise.

Zum Daumendrücken und Mitzittern gab es bei den zahlreichen Prüfungen während meiner Ausbildung sicher viele Gelegenheiten. Über die ermunternde Unterstützung meiner Eltern, meines Bruders Elmar sowie von Freunden und Bekannten, insbesondere Holger Müller, Judith Fieber, Ralf Neddermann, Kerstin Kühn-Wache, Nicole Jänisch und Jens Wittenberg habe ich mich sehr gefreut.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Dissertation wurde keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Halle, den 3. Juli 1998

(Jörn Schmidt)