

2. Material und Methoden

2.1. NMR-Spektroskopie

Die Peptide cyclo(RRWWRF), cyclo(KKWWKF), cyclo(RRYYRF), cyclo(RRNalNalRF), cyclo(RRWWFR) und cyclo(RRWFWR) wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Margitta Dathe (FMP Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Peptide wurden in H₂O/D₂O (9:1) gelöst und eine SDS-Stammlösung zugegeben, so dass die Peptidkonzentration 2,5 mM, die SDS-Konzentration 25 mM und der pH-Wert 4,5 betragen. In gleicher Weise wurden die Proben vorbereitet, die protoniertes (Avanti Polar Lipids, USA) und perdeutertes DPC (Cambridge Isotope Laboratories, USA) in einer Konzentration von 50 mM und einem pH von 6,3 enthielten. Auch die NMR-Proben der synthetisierten Analoga wurden in gleicher Weise vorbereitet.

Alle NMR-Spektren wurden an einem Bruker DRX600 aufgenommen. DQF-COSY [127], TOCSY [128] (14 ms, 28 ms, 56 ms und 128 ms Mischzeit), NOESY [129] (Mischzeit 80 ms) und ROESY [130] (80 ms) wurden bei einer Temperatur von 300 K aufgenommen. J-Kopplungskonstanten wurden mittels eines inphase-COSY, basierend auf dem HNHA-Experiment bestimmt [131]. Die Unterdrückung des Wassersignals wurde durch Anwendung einer WATERGATE-Sequenz erreicht [132]. Die Zahl der Datenpunkte betrug in der F₂-Dimension 4096 und in der F₁-Dimension 512 Datenpunkte. Die Spektren wurden unter der Verwendung von XWIN-NMR (Bruker, Karlsruhe) mit einer quadratischen Kosinusfunktion multipliziert und auf 4K × 2K prozessiert.

Um den Kontakt der mizellgebundenen Peptide bzw. synthetisierten Analoga mit Wasser zu untersuchen, wurden longitudinale Relaxationszeiten (T_1) in An- und Abwesenheit von Gd-(III)-DTPA [133] untersucht. Eine Stammlösung des

Gd-(III)-DTPA (50 mM) wurde durch Lösen von DTPA (Sigma, 1,02 eq.) in 150 mM NaOH, gefolgt von der Zugabe von Gd-(III)-Cl₃ (Sigma, 1 eq.), hergestellt. Die Stammlösung wurde den Proben in einer Endkonzentration von 0,3 mM zugesetzt. Es wurde ein Satz von 25 1D-¹H-Experimenten mit einem vorangehenden 180°-Puls und einer Evolutionszeit von 5 ms bis 2 s aufgenommen, zur Wasserunterdrückung diente die WATERGATE-Sequenz. Anschließend wurden unter Verwendung von Kaleidagraph 3.51 (Synergy Software, USA) Relaxationsfunktionen an die Daten angepasst.

2.2. Strukturrechnung

Zur Auswertung der 2D NMR-Spektren wurde das Programm SPARKY benutzt [134]. NOESY-Kreuzsignale wurden durch das Fitten einer Gaußfunktion integriert und die Interprotonabstände wurden aus den Signalvolumina berechnet. Obere und untere Abstandsgrenzen wurden durch Festlegen einer Toleranz von $\pm 0,3 \text{ \AA}$ bzw. $\pm 0,7 \text{ \AA}$ für SDS- und DPC-gebundene Peptide erhalten. Für Pseudoatomzuordnungen wurden die Abstandsgrenzen entsprechend korrigiert. Prochirale Zuordnungen für β -Protonen wurden erhalten, indem Kopplungskonstanten zwischen α - und β -Protonen sowie die NOEs zwischen HN und den β -Protonen verglichen wurden [135]. Die Strukturrechnungen wurden mit Amber 6.0 durchgeführt [136]. Das Simulated-Annealing-Protokoll wurde mit einem Hochtemperaturschritt zur Randomisierung der Ausgangsstruktur begonnen. Die Abstandsgrenzen wurden in einem weiteren Hochtemperaturschritt eingeführt. H^N-H^α -J-Kopplungskonstanten wurden direkt als Restraints eingesetzt, indem die Karpluskoeffizienten auf $A = 9,5$, $B = -1,4$ und $C = 0,3$ gesetzt wurden [137]. Abgeschlossen wurde das Simulated-Annealing-Protokoll durch einen Abkühlungsschritt und eine Energieminimierung. Von 100 Läufen wurden die 10 Läufe mit den niedrigsten Energien als Endstrukturen ausgewählt. Zur Strukturanalyse wurde das Programm MOLMOL verwendet [138]. Die mittlere Struktur der 10 ausge-

wählten Strukturen wurde berechnet und diejenige mit dem geringsten RMSD zu ihr wurde als repräsentative Struktur ausgewählt. Das lipophile Potential wurde unter Verwendung von Sybyl 6.9 (Tripos, USA) generiert. Für einige Peptide wurden sowohl Strukturen als auch die NMR Daten in der „Protein Data Base“ (PDB) und in der „Biomagnetic Resonance Database“ (BMRB) abgelegt. Die PDB-Kodes sind in Tabelle 5 aufgeführt.

2.3. Membransimulationen

Für die im folgenden beschriebenen Membransimulationen wurde das Moleküldynamikprogramm Gromacs 3.1 verwendet [139, 140]. Bei den simulierten Systemen handelte es sich um Dipalmitoylphosphatidylcholin-Membranen (DPPC), bestehend aus 128 Lipiden, ca. 5780 SPC-Wassermolekülen (für „simple point charge“) [141] und einer unterschiedlichen Anzahl Chloridionen als Gegenionen. Die Startkonformation der DPPC-Membranen stammt von der Webseite von D.P. Tieleman (<http://moose.bio.ucalgary.ca/>) [119]. Es wurden drei solcher Membransysteme simuliert, die jeweils keine, 2 bzw. 12 c-RW-Peptide enthielten (im Folgenden 0/128-, 2/128- bzw. 12/128-Simulation genannt), wobei letztere jeweils mit und ohne NMR-Abstandsgrenzen simuliert wurden. Die Rechnungen unter Verwendung der Abstandsgrenzen wurden ausgeführt, um zu zeigen, dass die NMR-Strukturrechnungen im Vakuum auch an einer Lipid-Wasser-Grenzfläche Gültigkeit besitzen. Dabei wurden für die Startkonformationen der Peptide die NMR-Strukturen gewählt. Um eine erneute zeitaufwändige Äquilibrierung der Systeme zu vermeiden, wurden als Startstrukturen der Simulationen ohne NMR-Abstandsgrenzen die Endkonformationen der Simulationen mit NMR-Abstandsgrenzen verwendet. Die Simulationszeiten sind für jede Rechnung in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Rechenzeit betrug ungefähr 35 Stunden pro Nanosekunde auf Dual-Intel-Pentium-IV-Prozessoren mit einer Taktung von 3,0 GHz.

2.3.1. Die 0/128-Simulation

Es wurden eine Reihe von Simulationen reiner DPPC-Membranen ohne Peptide (die 0/128- und 0/64-Systeme) durchgeführt, um die Eignung der angewandten Simulationsbedingungen zu bewerten. Die Systeme wurden äquilibriert, bis die Deuteriumordnungsparameter und die Fläche pro Lipid in einem Zeitraum von 5 ns konstant blieben (zusammengefasst in Tabelle 6). Diese sind vergleichbar mit denen anderer Simulationen und sind in Übereinstimmung mit experimentellen Werten. Des Weiteren wurde das System weder durch Erhöhung der Zeitinkremente von 2 fs auf 5 fs noch durch Vergrößerung von 64 auf 128 Lipide beeinflusst.

2.3.2. Die 2/128-Simulation

Um möglichst rasch einen Gleichgewichtszustand zu erreichen, wurden mit dem Gromacs-Programm „HOLE“ [142] Kavitäten von der Form der Peptidoberfläche in den Grenzflächen der 0/128 Simulation erzeugt, in welche die Peptide eingesetzt werden konnten. Daher kann die Struktur, Position und Orientierung der Peptide, in Bezug auf die Lipiddoppelschicht, als von den NMR-Experimenten abgeleitet betrachtet werden. Die Peptide wurden so ausgerichtet, dass die aromatischen Seitenketten in den hydrophoben Kern der Membran zeigten und die polare Seite, bestehend aus Peptidrückgrat und den Argininseitenketten, dem Wasser zugewandt war. Die Ebene, die durch das Peptidrückgrat gebildet wird, wurde parallel zur Membranoberfläche ausgerichtet und in der Nähe der Phosphocholingroupen der Lipide platziert. Danach wurden sechs Chloridionen hinzugefügt, um das System ladungsneutral zu halten. Nach der Äquilibrierung des Systems unter Verwendung der NMR-Abstandsgrenzen wurde das System für weitere 20 ns mit den Abstandsgrenzen simuliert, gefolgt von einer weiteren Simulationsperiode von 80 ns, bei der keine Abstandsgrenzen verwendet wurden. Die Äquilibrierung war nach 8 ns

abgeschlossen, was sich durch die Konvergenz der Zahl der Peptid-Lipid-Wasserstoffbrücken, der Deuteriumordnungsparameter der Lipide und der Fläche pro Lipid zeigte.

2.3.3. Die 12/128-Simulation

Die Startstruktur dieses Systems wurde erzeugt, indem das Wasser und die Ionen von der 2/128-Simulation entfernt und je fünf Peptide im Vakuum über den Oberflächen der Membran hinzugefügt wurden. Auch hier wurde die oben erwähnte Orientierung beibehalten. Danach wurde das Wasser über bzw. unter den Peptide eingebracht und mit 36 Chloridionen Ladungsneutralität hergestellt. Das System wurde auf eine Dichte von 1 g/cm^3 eingestellt, indem es vorsichtig in einer Simulation mit konstantem Druck komprimiert wurde.

2.3.4. Simulationsbedingungen

Alle Systeme wurden unter Anwendung periodischer Randbedingungen als NPT-Ensemble mit getrennter Druckkontrolle für die x -, y - und z -Komponenten der Zelle simuliert. Die Skalierung der Temperatur und des Druckes wurden mit dem Berendsen-Thermostat und -Barostat erreicht, mit $\tau_T = 0,1 \text{ ps}$ und $\tau_p = 1,0 \text{ ps}$ [143]. Es wurden getrennte Thermostaten für Lipide, für Peptide und für Wasser und Ionen verwendet, deren Temperatur jeweils auf 323 K gesetzt war. Um den Einfluss einer höheren Temperatur zu untersuchen, wurden ebenfalls Simulationen für die 0/128- und 12/128-Systeme bei 353 K ausgeführt. Die Nachbarliste, für Atome innerhalb des 10-\AA -cut-off, wurde alle 10 Schritte aktualisiert. Dieser „cut-off“ wurde für die Lennard-Jones-Wechselwirkungen und die kurzen Coulombschen Wechselwirkungen verwendet. Die weitreichenden elektrostatischen Wechselwirkungen wurden durch „particle-mesh-Ewald-Summation“ berechnet [144]. Schnelle Vibrationen kovalenter Wechselwirkungen wurden durch den LINCS-Algorithmus eingeschränkt [145, 146]. Diese Bedingungen wurde bereits getestet und für zuverlässig befunden

[120] und ergaben vergleichbare Ergebnisse in den vorliegenden Simulationen. Für die DPPC-Moleküle wurde ein OPLS-basiertes Modell (für „optimized potential for liquid simulations“) verwendet [147] und für die Peptide wurde das Standard-Gromacs-Kraftfeld („united atoms“) [148] verwendet. In diesem Kraftfeld werden Wasserstoffatome, die an aliphatische Kohlenstoffatome gebunden sind, implizit simuliert, während alle anderen Wasserstoffatome explizit behandelt werden. Es wurden statt der implizit behandelten Wasserstoffatome „dummy“-Atome eingeführt, um die jeweiligen NMR-Abstandsgrenzen anwenden zu können. Zur Simulation der wässrigen Phase wurde das starre SPC-Wassermodell verwendet [141]. In allen Simulationen mit Peptiden wurde ein Zeitschritt von 2 fs verwendet, da die expliziten Wasserstoffatome bei längeren Zeitschritten nicht stabil sind. Zur Überprüfung wurden reine Membranen bei 2 fs und 5 fs simuliert und es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Lipideigenschaften beobachtet.

2.3.5. Auswertung der Simulation

Die Trajektorien wurden mit Programmen des Gromacs-Pakets bezüglich Deuteriumordnungsparameter, partiellen Dichten, lateraler Diffusion und Membranoberfläche analysiert. Standardabweichungen wurden durch Aufteilen der Trajektorien in je fünf Teile und Berechnung der Größen und anschließender Bildung der Standardabweichung für die einzelnen Teile erhalten. Ein neues Auswerteverfahren wurde angewendet, um eine statistische Aussage über Lipideigenschaften in der Nähe des Peptides zu erhalten. Das Peptidkoordinatensystem (x, y, z) (Abbildung 10) wurde für jeden Zeitschritt in der Trajektorie berechnet, indem die beste Ebene aller $C\alpha$ -Atome als x - y -Ebene gewählt wurde und die x -Koordinate in Richtung des ersten „ β -Faltblattes“ (von $C\alpha$ -R2 zu $C\alpha$ -R4) definiert wurde. Dann wurde anhand der besten Ebene der C_{G2} -Atome der Lipide (Abbildung 10) ein weiteres Koordinatensystem (x', y', z') eingeführt, mit der Normalen als z' -Achse und der Projektion von x als x' -Achse.

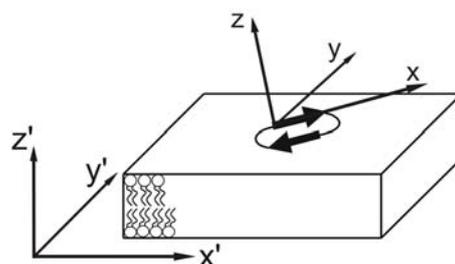


Abbildung 10: Skizze des verwendeten Koordinatensystems. Das (x, y, z) Koordinatensystem orientiert sich an der besten Ebene der Peptid-C α -Atome mit x in der Richtung vom R2- zum W4- Ca. Das Koordinatensystem (x', y', z') wird durch die Normale der Lipiddoppelschicht-Ebene (z') und der Projektion (x') von x auf die Membran gebildet.

Danach wurden die Populationen ausgewählter Lipid- und Peptidatome in einem Raster mit einem Abstand von 1 \AA in der x' - und y' -Ebene ausgewertet und in einem Histogramm aufgetragen. Man erhält somit einen Überblick über die statistische Verteilung der Lipid- und Peptidatome, projiziert auf die x' - y' -Ebene. Ebenso wurde die Membranoberfläche untersucht, indem in einem Raster von 1 \AA die durchschnittliche Entfernung des am weitesten von der Membranzentralebene entfernten Atoms aufgetragen wurde. Dies wurde jeweils von der Trajektorie der 2/128-Simulation ohne Abstandsgrenzen berechnet, die aus 8000 Schritten über 80 ns bestand.

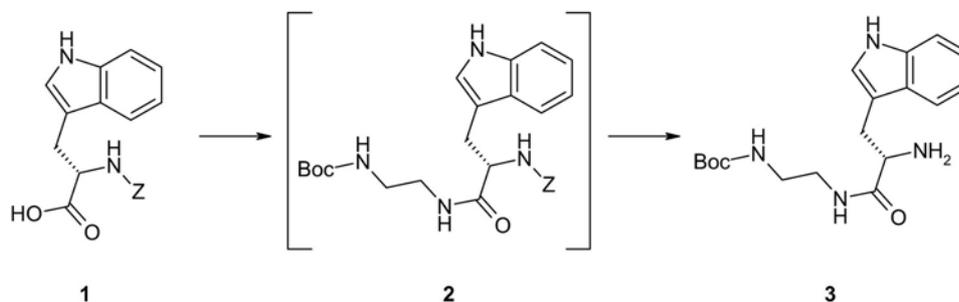
2.4. Synthese der Analoga

2.4.1. Chemikalien und Geräte

Es wurden handelsübliche Chemikalien verwendet, die von den Firmen Sigma, Aldrich und Fluka bezogen wurden. Lediglich Verbindung **10** wurde von der Firma Asca (Berlin) zur Verfügung gestellt, die Synthese wird hier aber ebenfalls beschrieben.

NMR-Spektroskopie	Bruker DRX 600, Bruker AV 300 (Bruker, Karlsruhe).
ESI-MS	Agilent 1100 MSD/SL, API-ES (Agilent, USA).
HPLC-ESI-MS	Agilent 1100 mit MSD/SL-Massendetektor (Agilent, USA), Säule: Zorbax SB-C18 Rapid Resolution 2,1 × 30 mm 3,5 μm, UV/VIS-Detektion: 254 nm.
präparative HPLC	ÄKTA (AmershamPharmacia, Schweden); Detektion: UV/VIS 280 nm; Säule: Nucleosil 300-7 C18, 250 × 10 mm ID, Macherey-Nagel (Düren).

2.4.2. {2-[(S)-2-Amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-propionylamino]-ethyl}-carbaminsäure-*tert*-butylester (3)



2,77 g (8,2 mmol) *Z*-L-Tryptophan **1** und 1,1 g (8,2 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol-Monohydrat wurden in 25 ml Dichlormethan suspendiert und *N,N*-Dimethylformamid zugegeben (ca. 3 ml), bis die Feststoffe gelöst waren. Anschließend wurde bei Raumtemperatur 1,26 g (10 mmol) *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid zugegeben und 3 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C abgekühlt und mit 0,94 g (6,3 mmol) *N*-Boc-1,2-diaminoethan (Boc-DAE) versetzt, 1 h bei 0 °C und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde i. V. eingengt, der Rückstand in 150 ml Diethylether aufgenommen, anschließend mit 1 M Natronlauge (3 × 150 ml) und mit gesättigter Kochsalzlösung (2 × 150 ml) extrahiert. Ein Teil des Zwischen-

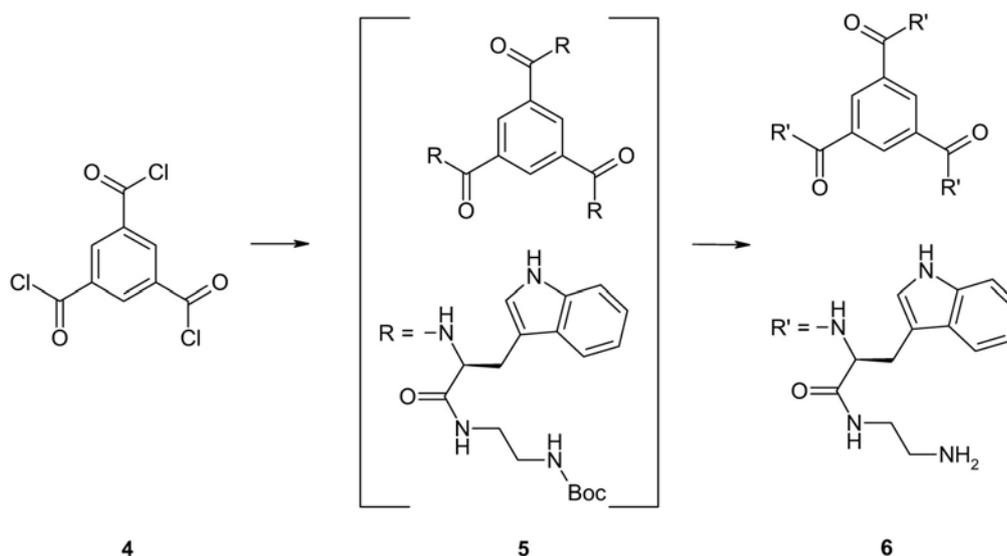
produktes **2** (2,0 g) fiel während der Extraktion aus und wurde mit Diethylether gewaschen und getrocknet. Die verbliebene organische Phase wurde, nach Trocknen mit Magnesiumsulfat, i. V. eingengt und lieferte weitere 0,74 g des Zwischenproduktes **2** (Ausbeute des Zwischenproduktes: 92%). **2** wurde in 100 ml Methanol gelöst, mit 300 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) versetzt, und für 1,5 h bei 5 Bar hydriert. Es wurde über Celite filtriert und i. V. eingengt. Man erhielt 1,80 g (5,2 mmol, 82 % bezogen auf *N*-Boc-1,2-Ethandiamin) des Produktes **3** als weißen Feststoff.

¹H-NMR (d₆-DMSO): 1,38 (s, 9H, Boc-H), 1,65 (s, 2H, Trp-HN), 2,73 (m, 1H, Trp-Hβ2), 2,96-3,08 (m, 5H, DAE-Hα, DAE-Hβ, Trp-Hβ3), 3,42 (m, 1H, Trp-Hα), 6,78 (s, 1H, DAE-Hγ [Boc-geschütztes HN]), 6,96 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, Trp-Hζ3), 7,06 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H, Trp-Hη2), 7,14 (s, 1H, Trp-Hδ1), 7,34 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, Trp-Hζ2), 7,55 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, Trp-Hε3), 7,92 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H, DAE-HN), 10,85 (s, 1H, Trp-Hε1). (DAE - Diaminoethan).

¹³C-NMR (d₆-DMSO): 28,3 (Boc-CH₃), 31,1 (Trp-Cβ), 55,5 (Trp-Cα), 77,6 (Boc-Cq), 110,7 (Trp-Cγ), 111,3 (Trp-Cζ2), 118,1 (Trp-Cε3), 118,4 (Trp-Cζ3), 120,8 (Trp-cη2), 123,6 (Trp-Cδ1), 127,4 (Trp-Cδ2), 136,2(Cε2), 155,6 (Boc-C), 174,9 (Trp-C), DAE-C vermutlich unter DMSO-Signal. (DAE - Diaminoethan).

ESI-MS: C₁₈H₂₆N₄O₃ (346,4); *m/z* ber.: [M+H]⁺ 347,44; gef.: 347,3.

2.4.3. CAB1 - Benzol-1,3,5-tricarbonsäure-*tris*-{[(*S*)-1-(2-aminoethylcarbamoyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-ethyl]-amid} (6)



Es wurden 565 mg des Amins **3** (1,49 mmol) und 215 mg *N,N*-Diisopropylethylamin (1,66 mmol) in einer Mischung aus 5 ml Dichlormethan und 2 ml *N,N*-Dimethylformamid suspendiert. Anschließend wurden 109 mg Trimesinsäurechlorid **4** (0,41 mmol) zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde i. V. eingengt, in 100 ml Essigsäureethylester aufgenommen und mit 1 M HCl (5 × 50 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und i. V. eingengt. Das so erhaltene Zwischenprodukt **5** (450 mg, Ausbeute: 92 %) wurde in 10 ml Dichlormethan gelöst und 1,5 ml Trifluoressigsäure zugesetzt. Nach 30 min wurde das Reaktionsgemisch mit 1 M HCl (3 × 30 ml) extrahiert und das Produkt **6**, durch Zugabe von NaOH bis zum Erreichen von pH > 10 und kühlen auf 4 °C für 2 h, ausgefällt. Es wurde bei 4000 g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert und das Sediment mit 0,01 % NH₄OH (2 × 15 ml) gewaschen und erneut zentrifugiert. Durch Lyophilisieren wurde das Produkt **6** (246 mg, Ausbeute: 61 % bezogen auf Trimesinsäurechlorid **4**) als weißer Feststoff erhalten. Für biologische Versuche wurden 30 mg des Produktes **6** mittels HPLC gereinigt und lyophilisiert.

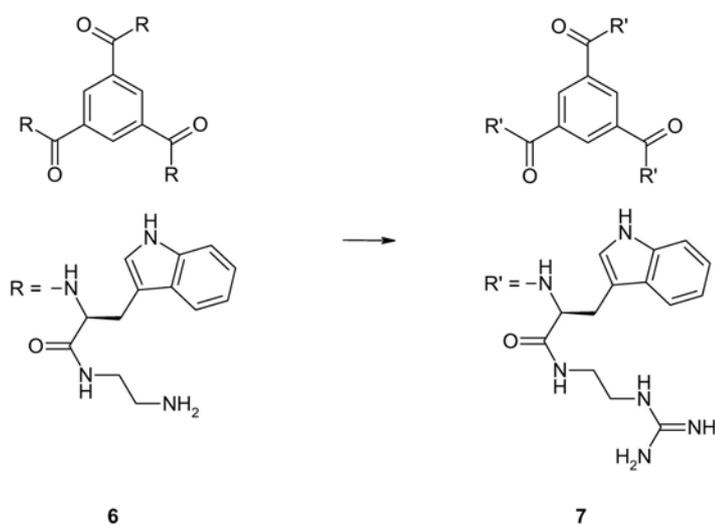
Bedingungen für die präparative HPLC: Gradient (A: H₂O, 0,1 % TFA; B: 85 % ACN, 0,1 % TFA) 20 % B → 55 % B in 27 min, R_t = 17,38 min.

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1): 2,87 (s, 6H, DAE-Hβ), 3,38 (m, 6H, Trp-Hβ), 3,39 (m, 6H, DAE-Hα), 4,79 (Trp-Hα aus DQF-COSY), 7,05 (t, J = 7,6 Hz, 3H, Trp-Hζ3), 7,17 (t, J = 7,7 Hz, 3H, Trp-Hη2), 7,29 (s, 3H, Trp-Hδ1), 7,46 (d, J = 8,2 Hz, 3H, Trp-Hζ2), 7,53 (bs, 3H, DAE-Hγ), 7,61 (d, J = 8,2 Hz, 3H, Trp-Hε3), 7,94 (s, 3H, TMA-H), 8,28 (t, J = 5,8 Hz, 3H, DAE-HN), 8,56 (d, J = 6,4 Hz, 3H, Trp-HN), 10,13 (s, 3H, Trp-Hε1). (DAE - Diaminoethan).

¹³C-NMR (H₂O/D₂O 9:1): 26,6 (Trp-Cβ), 36,4 (DAE-Cβ), 38,4 (DAE-Cα), 55,4 (Trp-Cα), 108,5 (Trp-Cγ), 111,5 (Trp-Cζ2), 117,8 (Trp-Cε3), 118,9 (Trp-Cζ3), 121,5 (Trp-Cη2), 124,2 (Trp-Cδ1), 126,4 (Trp-Cδ2), 128,8 (TMA-Cβ), 133,6 (TMA-Cα), 135,7 (Trp-Cε2), 168,1 (TMA-C), 174,5 (Trp-C). (DAE - Diaminoethan).

HPLC-ESI-MS: Gradient (A: H₂O, 0,1 % TFA; B: ACN, 0,1 % TFA) 0 % B → 100 % B in 20 min, R_t = 7,69 min; Reinheit: 97,3 %; C₄₈H₅₄N₁₂O₆ (895,0); m/z ber.: [M+H]⁺ 896,03; [M+2H]²⁺ 448,52; [M+3H]³⁺ 299,35; gef.: 895,6 (30 %); 448,4 (53 %); 299,2 (100 %).

2.4.4. CAB2 - Benzol-1,3,5-tricarbonsäure-tris-[[*(S)*-1-(2-guanidinoethylcarbamoyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-ethyl]-amid] (7)

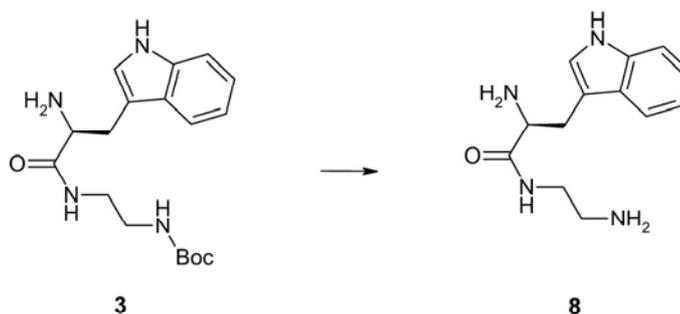


Es wurden 42,6 mg des Amins **6** (47,5 μmol) und 19,8 mg *N,N*-Diisopropylethylamin (153 μmol) in 0,25 ml *N,N*-Dimethylformamid gelöst und 28,9 mg 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidinhydrochlorid (197 μmol) zugegeben. Es wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und durch Zugabe von 10 ml Diethylether das Produkt **7** ausgefällt. Nach präparativer HPLC und Lyophilisieren erhielt man 35,4 mg (34,7 μmol , Ausbeute 71 %) des Produktes **7** als weißen Feststoff. Bedingungen für die präparative HPLC: Gradient (A: H_2O , 0,1 % TFA; B: 85 % ACN, 0,1 % TFA) 20 % B \rightarrow 48 % B in 27 min, $R_t = 20,8$ min.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1): 3,05 (s, 6H, GEA-H β), 3,23 (m, 6H, GEA-H α_2), 3,34 (m, 9H, GEA-H α_3 , Trp-H β), 4,79 (Trp-H α aus DQF-COSY), 6,66 (bs, 6H, GEA-H ϵ), 6,86 (bt, 3H, GEA-H γ), 7,04 (t, $J = 7,7$ Hz, 3H, Trp-H ζ_3), 7,15 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H, Trp-H η_2), 7,26 (s, 3H, Trp-H δ_1), 7,43 (d, $J = 8,1$ Hz, 3H, Trp-H ζ_2), 7,59 (d, $J = 8,2$ Hz, 3H, Trp-H ϵ_3), 7,95 (s, 3H, TMA-H), 8,14 (t, $J = 6,2$ Hz, 3H, GEA-HN), 8,51 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H, Trp-HN), 10,10 (s, 3H, Trp-H ϵ_1). (GEA - Guanidinoethylamin).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1): 26,7 (Trp-C β), 37,6 (GEA-C α), 40,1 (GEA-C β), 55,4 (Trp-C α), 108,5 (Trp-C γ), 111,5 (Trp-C ζ_2), 117,8 (Trp-C ϵ_3), 118,9 (Trp-C ζ_3), 121,4 (Trp-c η_2), 124,1 (Trp-C δ_1), 126,4 (Trp-C δ_2), 128,7 (TMA-C β), 133,5 (TMA-C α), 135,7 (Trp-C ϵ_2), 156,5 (GEA-C δ), 167,9 (TMA-C), 174,5 (Trp-C). (GEA - Guanidinoethylamin).

HPLC-ESI-MS: Gradient (A: H_2O , 0,1 % TFA; B: ACN, 0,1 % TFA) 0 % B \rightarrow 100 % B in 20 min, $R_t = 8,00$ min; Reinheit: 98,7 %; $\text{C}_{51}\text{H}_{60}\text{N}_{18}\text{O}_6$ (1021,2); m/z ber.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1022,17; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 511,59; $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 341,40; gef.: 1022,4 (7 %); 511,4 (34 %); 41,2 (100 %).

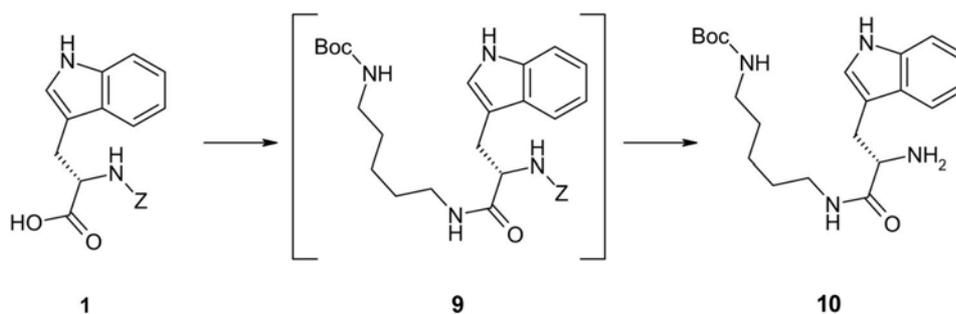
2.4.5. (S)-2-Amino-N-(2-aminoethyl)-3-(1H-indol-3-yl)-propionamid (8)

Es wurden 20,0 mg des Boc-geschützten Amins **3** (57,7 μmol) in 1 ml Dichlormethan gelöst und 150 μl Trifluoressigsäure zugegeben. Nach 30 min wurde das Reaktionsgemisch i.V. eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 12,5 mg (50,8 μmol , Ausbeute 88 %) des Produktes **8** als braunes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1): 2,78 (s, 2H, DAE-H β), 3,26-3,40 (m, 4H, Trp-H β , DAE-H α), 7,18 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, Trp-H ζ 3), 7,27 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, Trp-H η 2), 7,32 (s, 1H, Trp-H δ 1), 7,53 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Trp-H ζ 2), 7,60 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Trp-H ϵ 3), 8,25 (bt, 1H, DAE-HN), 10,26 (s, 1H, Trp-H ϵ 1). (DAE - Diaminoethan).

ESI-MS: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}$ (246,3); m/z ber.: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 247,32; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 124,16; gef.: 247,2 (100 %); 124,2 (33 %).

2.4.6. {5-[(S)-2-Amino-3-(1*H*-indol-3-yl)-propionylamino]-pentyl}- carbaminsäure-*tert*-butylester (10)



Die Verbindung **10** wurde von Dr. Fritz Theil (Asca, Berlin) zur Verfügung gestellt. Sie wurde wie folgt synthetisiert [149].

Eine Lösung von 3,38 g Z-L-Tryptophan (10 mmol) **1** und 1,62 g 1-Hydroxybenzotriazol (12 mmol) in wasserfreiem *N,N*-Dimethylformamid (30 mL) wurde mit 2,30 g 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (12 mmol) versetzt und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt, mit *N*-Boc-1,5-pentandiamin (2,00 g, 10 mmol) versetzt und noch 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde i. V. eingengt, der Rückstand wiederholt in Toluol (3 × 10 mL) aufgenommen und jeweils wieder eingengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (100 mL) gelöst, die Lösung mit Wasser (100 mL) und dann mit 5 % wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und i. V. eingengt. Der Rückstand (4,64 g) wurde durch Flashchromatographie (100 g, 20 × 4,0 cm) mit Ethylacetat / Cyclohexan (3:2) gereinigt und es wurden 2,2 g des Zwischenproduktes **9** (Ausbeute: 42 %) als weißer Feststoff erhalten. (Anmerkung von Dr. Fritz Theil: „Die Ausbeute in dieser Stufe sollte sich erhöhen lassen. Entweder waren die Bildung des aktivierten Esters (HOBt-Ester) oder die Amidbildung nicht vollständig.“ [149].) Das in Methanol (110 mL) gelöste Zwischenprodukt **9**

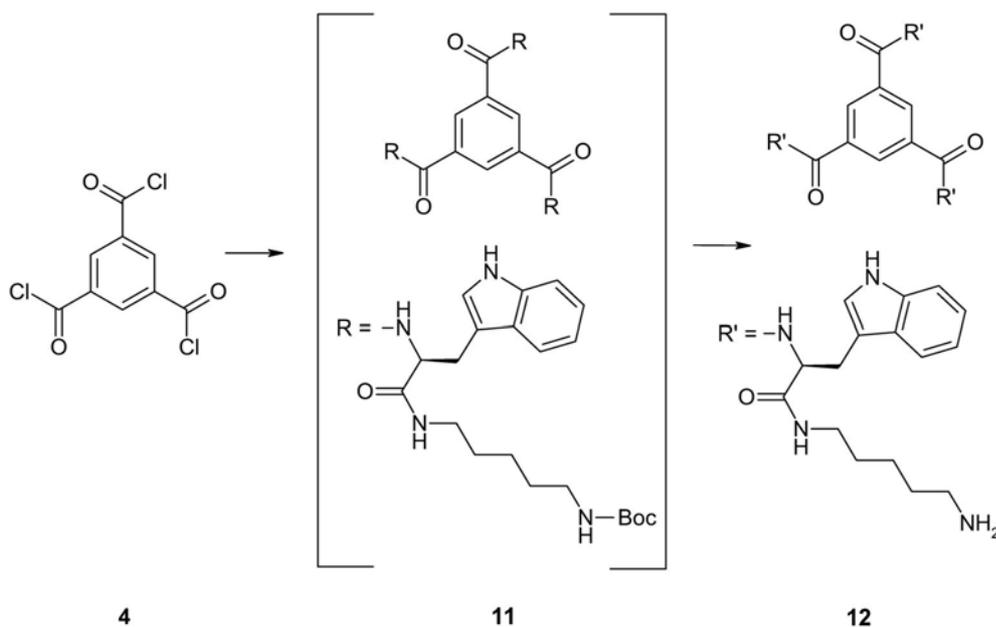
wurde mit 10 % Palladium auf Aktivkohle (230 mg) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur und 3 bar hydriert. Die Umsetzung war vollständig (DC-Kontrolle). Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat i. V. eingengt. Man erhielt 1,53 g des Produktes **10** (3,9 mmol, 39 % bezogen auf *N*-Boc-1,2-Pentandiamin) als weißen Feststoff. Schmelzpunkt: 42–48 °C (Methanol).

¹H-NMR (d₆-DMSO): 1,15 (m, 2H, DAP-H_γ), 1,33 (m, 4H, DAP-H_β, DAP-H_δ), 1,37 (s, 9H, Boc-H), 1,80 (s, 2H, Trp-HN), 2,73 (m, 1H, Trp-H_{β2}), 2,87 (m, 2H, DAP-H_ε), 2,98–3,05 (m, 3H, DAP-H_α, Trp-H_{β3}), 3,41 (m, 1H, Trp-H_α), 6,75 (s, 1H, DAP-H_ζ [Boc-geschütztes HN]), 6,96 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, Trp-H_{ζ3}), 7,05 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H, Trp-H_{η2}), 7,13 (s, 1H, Trp-H_{δ1}), 7,33 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, Trp-H_{ζ2}), 7,54 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Trp-H_{ε3}), 7,78 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, DAP-HN), 10,82 (s, 1H, Trp-H_{ε1}). (DAP - Diaminopentan).

¹³C-NMR (d₆-DMSO): 23,7 (DAP-C_γ), 28,3 (Boc-C_β), 28,9–29,2 (DAP-C_β, DAP-C_δ), 31,3 (Trp-C_β), 38,3 (DAP-C_α), 55,5 (Trp-C_α), 77,4 (Boc-C_α), 110,7 (Trp-C_γ), 111,3 (Trp-C_{ζ2}), 118,2 (Trp-C_{ε3}), 118,6 (Trp-C_{ζ3}), 120,8 (Trp-c_{η2}), 123,7 (Trp-C_{δ1}), 127,5 (Trp-C_{δ2}), 136,3 (Trp-C_{ε2}), 155,6 (Boc-C), 174,5 (Trp-C). (DAP - Diaminopentan).

ESI-MS: C₂₁H₃₂N₄O₃ (288,5); *m/z* ber.: [M+H⁺] 389,52; gef.: 389,3.

2.4.7. CAB3 - Benzol-1,3,5-tricarbonsäure-tris-[[*(S)*-1-(5-aminopentylcarbamoyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-ethyl]-amid] (12)



Es wurden 268 mg des Amins **10** (0,69 mmol) und 100 mg *N,N*-Diisopropylethylamin (0,77 mmol) in 5 ml Dichlormethan gelöst. Anschließend wurden 50,6 mg Trimesinsäurechlorid **4** (0,20 mmol) zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde i. V. eingengt, in 150 ml Essigsäureethylester aufgenommen und mit 1 M HCl (5 × 50 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Mg₂SO₄ getrocknet und i. V. eingengt. Das so erhaltene Zwischenprodukt **11** (221 mg, Ausbeute: 87 %) wurde in 10 ml Dichlormethan gelöst und 1,5 ml Trifluoressigsäure zugesetzt. Nach 30 min wurde das Reaktionsgemisch mit 1 M HCl (3 × 30 ml) extrahiert und das Produkt **12**, durch Zugabe von NaOH bis zum Erreichen von pH > 10 und kühlen auf 4 °C für 2 h, ausgefällt. Es wurde bei 4000 g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert und das Sediment mit 0,01 % NH₄OH (2 × 10 ml) gewaschen und erneut zentrifugiert. Durch Lyophilisieren wurde das Produkt **12** (110 mg, Ausbeute: 54 % bezogen auf Trimesinsäurechlorid **4**) als weißer Feststoff erhalten. Für biologische Versuche wurden 30 mg des Produktes **12** mittels HPLC

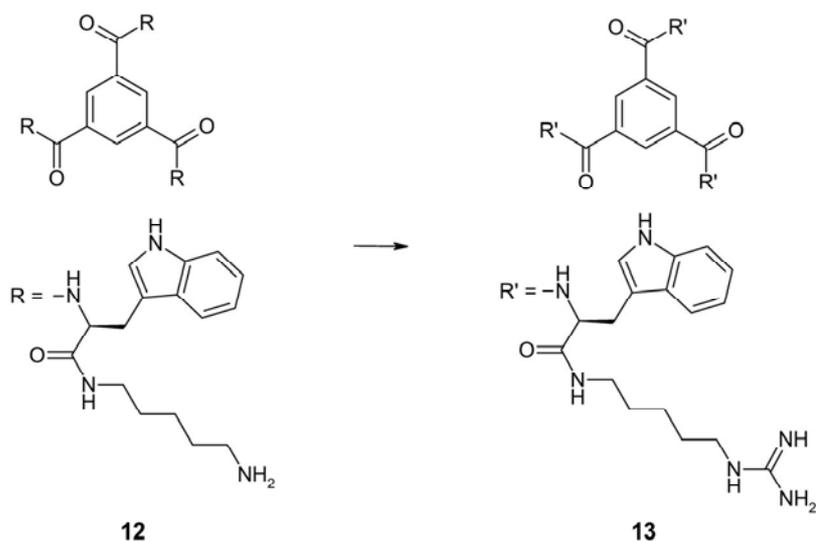
gereinigt und lyophilisiert. Bedingungen für die präparative HPLC: Gradient (A: H₂O, 0,1 % TFA; B: 85 % ACN, 0,1 % TFA) 20 % B → 55 % B in 27 min, R_t = 17,38 min.

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1): 1,00 (s, 6H, DAP-H_γ), 1,2 (s, 6H, DAP-H_β), 1,48 (s, 6H, DAP-H_δ), 2,84 (m, 6H, DAP-H_ε), 2,96 (m, 3H, DAP-H_{α2}), 3,14 (m, 3H, DAP-H_{α3}), 3,33 (m, 6H, Trp-H_β), 4,7 (Trp-H_α aus DQF-COSY), 7,08 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H, Trp-H_{ζ3}), 7,13 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H, Trp-H_{η2}), 7,2 (bs, 3H, DAP-H_ζ), 7,27 (s, 3H, Trp-H_{δ1}), 7,46 (d, *J* = 8,3 Hz, 3H, Trp-H_{ζ2}), 7,61 (d, *J* = 8,2 Hz, 3H, Trp-H_{ε3}), 7,99 (s, 3H, TMA-H), 7,94 (t, *J* = 5,5 Hz, 3H, DAP-HN), 8,51 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H, Trp-HN), 10,10 (s, 3H, Trp-H_{ε1}). (DAP - Diaminopentan).

¹³C-NMR (H₂O/D₂O 9:1): 22,2 (DAP-C_γ), 25,9 (DAP-C_δ), 26,8 (Trp-C_β), 27,0 (DAP-C_β), 38,4 (DAP-C_α), 39,0 (DAP-C_ε), 55,5 (Trp-C_α), 108,6 (Trp-C_γ), 111,4 (Trp-C_{ζ2}), 117,9 (Trp-C_{ε3}), 118,9 (Trp-C_{ζ3}), 121,4 (Trp-C_{η2}), 124,1 (Trp-C_{δ1}), 126,5 (Trp-C_{δ2}), 128,4 (TMA-C_β), 133,6 (TMA-C_α), 135,8 (Trp-C_{ε2}), 167,9 (TMA-C), 172,5 (Trp-C). (DAP - Diaminopentan).

HPLC-ESI-MS: Gradient (A: H₂O, 0,1 % TFA; B: ACN, 0,1 % TFA) 0 % B → 100 % B in 20 min, R_t = 8,29 min; Reinheit: 80,3 %; C₅₇H₇₂N₁₂O₆ (1021,3); *m/z* ber.: [M+H]⁺ 1022,30; [M+2H]²⁺ 511,66; [M+3H]³⁺ 341,44; gef.: 1021,6 (14 %); 511,4 (23 %); 341,4 (100 %).

2.4.8. CAB4 - Benzol-1,3,5-tricarbonsäure-*tris*-{[(*S*)-1-(5-guanidinopentylcarbamoyl)-2-(1*H*-indol-3-yl)-ethyl]-amid}
(13)



Es wurden 40,0 mg des Amins **12** (39,2 μmol) und 15,2 mg *N,N*-Diisopropylethylamin (118 μmol) in 0,5 ml *N,N*-Dimethylformamid gelöst und 17,6 mg 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidinhydrochlorid (120 μmol) zugegeben. Es wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und durch Zugabe von 10 ml Diethylether das Produkt **13** ausgefällt. Nach präparativer HPLC und Lyophilisieren erhielt man 32,8 mg (28,6 μmol , Ausbeute 73 %) des Produktes **13** als weißen Feststoff.

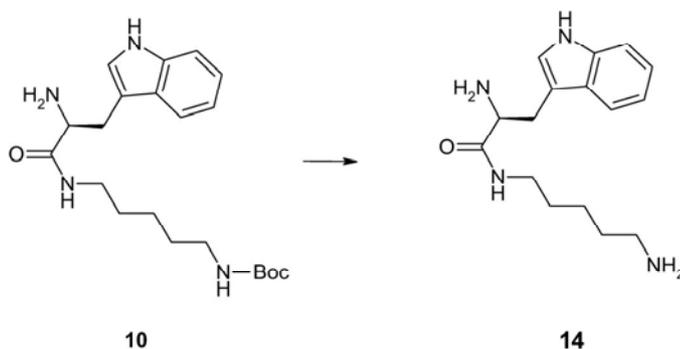
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1): 0,99 (m, 6H, GPA-H γ), 1,2 (m, 6H, GPA-H β), 1,38 (m, 6H, GPA-H δ), 2,96-2,98 (m, 9H, GPA-H α 2, GPA-H ϵ), 3,12 (m, 3H, GPA-H α 3), 3,28 (m, 6H, Trp-H β), 4,75 (Trp-H α aus DQF-COSY), 6,50 (bt, 3H, GPA-H ζ), 7,03 (t, $J = 7,9$ Hz, 3H, Trp-H ζ 3), 7,13 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, Trp-H η 2), 7,23 (s, 3H, Trp-H δ 1), 7,40 (d, $J = 8,2$ Hz, 3H, Trp-H ζ 2), 7,51 (d, $J = 8,3$ Hz, 3H, Trp-H ϵ 3), 7,93 (t, $J = 5,8$ Hz, 3H, GPA-HN), 7,99 (s, 3H, TMA-H), 8,44 (bs, 3H, Trp-HN), 10,10 (s, 3H, Trp-H ϵ 1). (GPA - Guanidinopentylamin).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1): 22,4 (GPA-C γ), 26,8 (Trp-C β), 26,9 (GPA-C δ), 27,1 (GPA-C β), 38,7 (GPA-C α), 40,5 (GPA-C ϵ), 55,3 (Trp-C α), 108,5 (Trp-C γ), 111,3 (Trp-C ζ 2), 117,8 (Trp-

Cε3), 118,7 (Trp-Cζ3), 121,3 (Trp-cη2), 123,9 (Trp-Cδ1), 126,4 (Trp-Cδ2), 128,6 (TMA-Cβ), 133,3 (TMA-Cα), 135,8 (Trp-Cε2), 156,3 (GPA-Cζ), 167,5 (TMA-C), 172,5 (Trp-C). (GPA - Guanidinopentylamin).

HPLC-ESI-MS: Gradient (A: H₂O, 0,1 % TFA; B: ACN, 0,1 % TFA) 0 % B → 100 % B in 20 min, R_t = 8,58 min; Reinheit: 99,1 %; C₆₀H₇₈N₁₈O₆ (1147,4); *m/z* ber.: [M+H]⁺ 1148,42; [M+2H]²⁺ 574,71; [M+3H]³⁺ 383,47; gef.: 1148,4 (5 %); 574,4 (23 %); 383,4 (100 %).

2.4.9. (S)-2-Amino-N-(5-aminopentyl)-3-(1H-indol-3-yl)-propionamid (14)



Es wurden 20,0 mg des Boc-geschützten Amins **10** (51,4 μmol) in 1 ml Dichlormethan gelöst und 150 μl Trifluoressigsäure zugegeben. Nach 30 min wurde das Reaktionsgemisch i. V. eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 13,7 mg (47,4 μmol, Ausbeute 92 %) des Produktes **14** als braunes Öl.

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1): 0,89 (m, 2H, DAP-H_γ), 1,09 (m, 2H, DAP-H_δ), 1,44 (m, 2H, DAP-H_β), 2,81 (m, 2H, DAP-H_ε), 2,87 (m, 1H, Trp-H_{β2}), 3,10 (m, 1H, Trp-H_{β3}), 3,28-3,40 (m, 2H, DAP-H_α) 7,17 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, Trp-H_{ζ3}), 7,26 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, Trp-H_{η2}), 7,29 (s, 1H, Trp-H_{δ1}), 7,51 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, Trp-H_{ζ2}), 7,61 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, Trp-H_{ε3}), 7,92 (bt, 1H, DAP-HN), 10,25 (s, 1H, Trp-H_{ε1}). (DAP - Diaminopentan).

ESI-MS: C₁₆H₂₄N₄O (288,4); *m/z* ber.: [M+H]⁺ 289,41; [M+2H]²⁺ 145,21; gef.: 289,2 (100 %), 145,2 (76 %).

2.5. Biologische Untersuchungen

2.5.1. Antimikrobielle Aktivität

Zur Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration wurden *Escherichia coli* (DH5 α) als Vertreter der Gramnegativen und *Bacillus subtilis* (subsp. *spizizenii*) als Vertreter der Grampositiven verwendet. Die Kulturen wurden in Luria-Bertani-Medium (LB) bei 37 °C herangezogen und in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,4 \pm 0,1$) zum Animpfen verwendet. Es wurden „96-well“ Mikrotiterplatten mit jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung (in 150 μ l LB-Medium) versehen und die zu untersuchenden Verbindungen in 1:2-Verdünnungsreihen, von 250 μ M bis 0,12 μ M Endkonzentration, zu einem Gesamtvolumen von 200 μ l zugegeben. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm (Safire, Tecan, Crailsheim) bestimmt. Als minimale inhibitorische Konzentration wurde die Konzentration bestimmt, bei der noch keine Trübung der Lösung festzustellen war.

2.5.2. Hämolytische Aktivität

Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurden humane Erythrozyten (B Rhneg., Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes, Berlin) verwendet. Die Erythrozyten wurden fünfmal mit Puffer (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7,4) gewaschen und jeweils anschließend bei 2000 g und 4 °C für 4 min abzentrifugiert. Es wurden $2,5 \times 10^8$ Zellen (in 0,2 ml) mit den zu untersuchenden Verbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml bei 37 °C und leichtem Schütteln für 3 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde nur in Puffer, als 100%-Kontrolle wurde in 0,5%iger NH_4OH -Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben auf Eis

gekühlt bei 2000 g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde 1:5 mit 0,5%igem NH_4OH verdünnt und die Absorption bei 540 nm (DU 520, Beckmann, USA) bestimmt.