

**Einfluß von Strukturparametern auf die Interaktion von  
Aminosäure- und Peptidderivaten mit dem  
intestinalen H<sup>+</sup>/Peptidsympporter PEPT1**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Dipl.-Chem. Volker Börner  
geb. am 15.10.1966 in Jessen/E.

Gutachter:

- 1 Prof. Dr. K. Neubert, MLU Halle-Wittenberg
- 2 Prof. Dr. H. Daniel, TU München
- 3 PD Dr. habil. M. Brandsch, Biozentrum der MLU Halle-Wittenberg

Tag der Verteidigung: 28.02.2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000003855**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003855>]

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Zielstellung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Theoretischer Teil</b>	<b>2</b>
2.1	Die Dünndarmmucosa als Resorptionsbarriere	2
2.2	Transportmechanismen	3
2.3	Das tertiär aktive Transportsystem PEPT1	5
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
3.1	Die Caco-2-Zelllinie	9
3.2	Grundlagen zur Synthese der Aminosäurederivate und Peptide	10
3.3	Mathematische Methoden	11
3.3.1	Berechnung der Aufnahmegeschwindigkeit radioaktiv markierter Substrate	11
3.3.2	Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes	11
3.3.3	Bestimmung des K <sub>I</sub> -Wertes	12
3.3.4	Statistische Auswertung	12
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>13</b>
4.1	Untersuchungen zur Substrataffinität	13
4.1.1	Aminosäurederivate	13
4.1.2	Dipeptide	27
4.1.3	Einfluß von Schutzgruppen	28
4.1.3.1	Blockierung des N-Terminus	28
4.1.3.2	Blockierung des C-Terminus	30
4.1.3.3	Blockierung von Seitenketten	31
4.1.4	Einbau von ω-Aminocarbonsäuren	33
4.1.5	Isoeptidbindung	36
4.1.6	Backbone- und Seitenkettencyclisierung	37
4.2	Affinitäten verzweigter Peptide	39
4.3	Affinitätsstudien mit biologisch relevanten Verbindungen	46
4.4	Stabilitäten einiger ausgewählter Verbindungen	48
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>55</b>
6.1	Zellspezifische Methoden	55
6.1.1	Kultivierung und Subkultivierung von Caco-2	55
6.1.2	Medien und Lösungen für die Zellzucht	56
6.1.3	Puffer zur Bestimmung der Aufnahme von Substraten in Caco-2	57
6.1.4	Untersuchungen der Substratstabilität auf der Zelloberfläche	57
6.1.5	Untersuchungen der Substratstabilität im Cytosol	57
6.1.6	Transwelltechnik zur Bestimmung des transepithelialen Fluxes	58

6.1.7	Transportstudien in Caco-2 Monolayern	59
6.1.8	Konzentrationsbestimmung mittels Flüssigkeits-Szintillation	59
6.1.9	Bestimmung des Proteingehaltes	59
6.2	Synthese der Substanzen	60
6.2.1	Allgemeine Bemerkungen	60
6.2.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	62
6.2.2.1	Synthese von Aminosäure- und Peptidderivaten	62
6.2.2.1.1	Einführung von $\alpha$ -Aminoschutzgruppen	62
6.2.2.1.2	Synthese von Aminosäuremethylestern	62
6.2.2.1.3	Die Mischanhydrid-Methode	63
6.2.2.1.4	Die Aktivester-Methode	63
6.2.2.1.5	Darstellung von Z-Ala-nitroaniliden und -fluoraniliden mittels $\text{POCl}_3$ und Pyridin	64
6.2.2.1.6	Uroniumsalz-Methode	64
6.2.2.2	Deblockierung des N-Terminus	64
6.2.2.2.1	Abspaltung der Boc-Schutzgruppe	64
6.2.2.2.2	Abspaltung der Z-Schutzgruppe	65
6.2.2.3	Deblockierung des C-Terminus	65
6.2.3	Spezielle Synthesen	66
6.2.3.1	Darstellung von 2-Cyclohexylethylamin * HCl	66
6.2.3.2	Darstellung von 3-Aminobiphenyl * HCl	67
6.2.3.3	Darstellung von L-Alanin-ethanolamid	67
6.3	Charakterisierung der Substanzen	68
6.3.1	Aminosäureamide	68
6.3.1.1	Aminosäureamide mit aliphatischen Resten	68
6.3.1.2	Aminosäurederivate mit cyclischen nichtaromatischen Resten	69
6.3.1.3	Aminosäurearylamide	70
6.3.2.	Dipeptide und Dipeptidderivate	73
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>85</b>
	Übersicht der Substanzen	1 – 30 85
	Übersicht der Substanzen	31 – 55 86
	Übersicht der Substanzen	56 – 98 87
	Übersicht der Substanzen	99 – 139 88
	Übersicht der Substanzen	140 – 165 89
	Übersicht der Substanzen	166 – 180 90
	Übersicht der Substanzen	181 – 189 91
	Hemmkurven	92
	$^1\text{H-NMR}$ – Daten	101

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Die verwendeten Abkürzungen für die Aminosäure- und Peptidderivate stimmen mit der Empfehlung der IUPAC-IUB Kommission für die biochemische Nomenklatur überein.

[*Eur. J. Biochem.*, **53**, 1-14 (1975); *Eur. J. Biochem.*, **138**, 9-37 (1984)]

Abu	(S)-2-Aminobuttersäure
Ac	Acetyl-
AcOH	Essigsäure
Aib	2-Amino-isobutansäure (Aminoisobuttersäure)
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl-
CAIBE	Chlorameisensäure-iso-butylester
DIPE	Diisopropylether
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
EEDQ	1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolin
EtOH	Ethanol
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
IC <sub>50</sub>	Halbhemmkonzentration
K <sub>i</sub>	Hemmkonstante
MEM	Zellkulturmedium, minimum essential medium
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
min	Minute
NEAA	Kulturmediumzusatz; non essential amino acids
NEM	N-Ethylmorpholin
Nle	(S)-2-Amino-capronsäure, L-Norleucin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
Pip	(S)-Piperidin-2-carbonsäure, L-Pipecolinsäure
pNA	<i>para</i> -Nitroanilin bzw. <i>para</i> -Nitroanilid
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
TEA	Triethylamin
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilan
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Z	Benzyloxycarbonyl-

## 1. Einleitung und Zielstellung

Peptide als endogene Regulatoren gewinnen in Verbindung mit der Erhöhung ihrer enzymatischen Abbaustabilität eine zunehmende Bedeutung als Leitstrukturen für die Entwicklung von Peptidwirkstoffen/Peptidmimetika. Dabei ist die Ausnutzung vorhandener, körpereigener Transportsysteme zur Verbesserung ihrer Bioverfügbarkeit (*drug delivery*) ein weiterer, wichtiger Aspekt.

Seit längerem ist bekannt, daß es für die Absorption von Di- und Tripeptiden spezielle Transportsysteme im Darm und in der Niere gibt. <sup>[1-4]</sup> Während das Darmepithel nur über einen Peptidtransporter (PEPT1) verfügt, existieren in den Epithelzellen des Nierentubulus sowohl der nierenspezifische Peptidtransporter PEPT2, als auch der intestinale PEPT1-Typ. Die Funktion von PEPT2 liegt in der Resorption kleiner Peptide aus dem Primärfiltrat zurück in den Blutkreislauf. <sup>[5]</sup>

Von speziellem Interesse für die vorliegende Arbeit war der intestinale tertiär-aktive H<sup>+</sup>/Peptidsympporter. Bei PEPT1 handelt es sich um einen Transporter vom „*low affinity, high capacity*“-Typ, der neben Di- und Tripeptiden auch  $\beta$ -Lactamantibiotika <sup>[6]</sup>, THR <sup>[7,8]</sup>, Bestatin <sup>[9]</sup> und ACE-Inhibitoren <sup>[10,11]</sup> als Substrate akzeptiert.

Die daraus resultierende strukturelle Vielfalt deutet darauf hin, daß der Transporter eine breite Substratspezifität besitzt. Somit könnte das PEPT1-Transportsystem für eine orale Applikation niedermolekularer Pharmaka mit peptidischer Grundstruktur genutzt werden. <sup>[12]</sup>

Aus den bisherigen Untersuchungen können kaum exakte Aussagen zur Substratspezifität des intestinalen H<sup>+</sup>/Peptidsympportsystems abgeleitet werden. Ursachen dafür sind, daß die in der Literatur beschriebenen Transportstudien oft an unterschiedlichen Modellen, an unterschiedlichen Spezies und Organen und an zufällig ausgewählten Substraten durchgeführt wurden.

Die Zielstellung der Arbeit war es, durch die systematische Untersuchung einer breiten Palette strukturmodifizierter Aminosäure- und Peptidderivate, die strukturellen Erfordernisse für den aktiven Transport dieser Verbindungen zu charakterisieren. Die Aufgabe umfaßte sowohl die Synthese der Substrate, als auch die Affinitätsbestimmung der einzelnen Verbindungen zu PEPT1. In Kompensationsexperimenten wurden dazu mit Hilfe der humanen Colonicarcinomzelllinie Caco-2 die IC<sub>50</sub>- bzw. die K<sub>1</sub>-Werte bestimmt. Mit den sich anschließenden Struktur-Wirkungs-Untersuchungen sollten erste Betrachtungen zur Optimierung der Substratstruktur vorgenommen werden.

## 2. Theoretischer Teil

### 2.1 Die Dünndarmmucosa als Resorptionsbarriere

Die systematische Zerkleinerung der Nahrung durch mechanische, chemische, enzymatische und bakterielle Einflüsse beginnt bereits während der Aufnahme. Der Großteil der Proteinspaltung erfolgt jedoch im Duodenum und Jejunum durch Exo- und Endopeptidasen bis hin zu Aminosäuren und Oligopeptiden. Die Oligopeptide werden durch büstensaumständige Peptidasen weiter zu Di- und Tripeptiden und Aminosäuren zerlegt. Dann beginnt die Resorption der Inhaltsstoffe. Der Dünndarm ist wegen seiner großen Fläche (ca. 200 m<sup>2</sup>), der relativ langen Passagezeit (ca. 6-8 h) und der starken Vaskulierung das Hauptresorptionsorgan im Körper. Bevor die Inhaltsstoffe in das Blut gelangen, haben sie eine natürliche Barriere, die Biomembran der Dünndarmmucosa, zu überwinden.

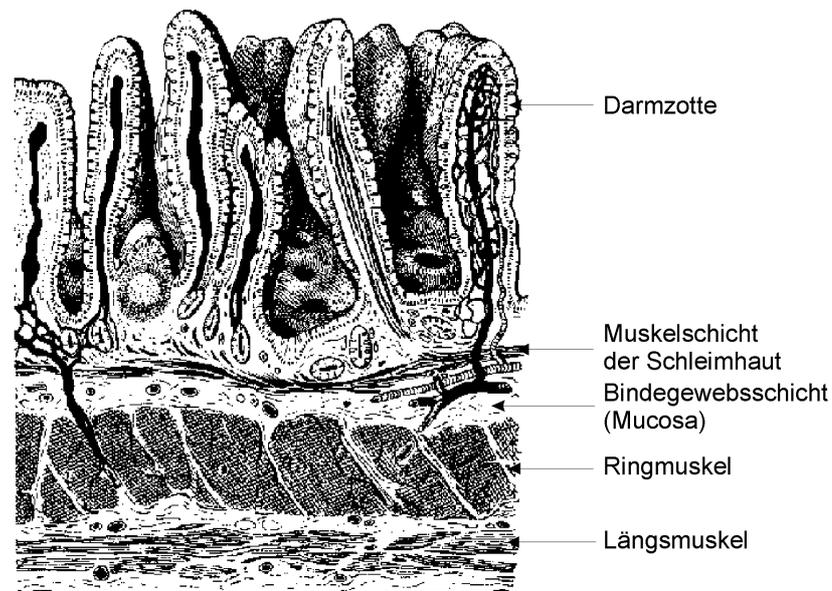


Abb. 1 Schematischer Aufbau der Dünndarmmucosa <sup>[13]</sup>

Generell läßt sich feststellen, daß die verschiedenen Teilchen die biologische Membran verschieden schnell durchdringen und diese somit die Rolle eines selektiven Filters spielt. Trotz ihrer geringen Schichtdicke von etwa 5 nm stellt sie für die hydrophilen und ionisierten Stoffe ein nahezu unüberwindliches Hindernis dar. Etwa 90% der luminalen Oberfläche werden durch Enterozyten und die restlichen 10% durch endokrine und M-Zellen (flache Zellen mit membranartigen Falten zum Darmlumen hin) gebildet. Die Zellen sind durch Schlußleisten (*tight junctions*) miteinander verbunden. (siehe Abb. 2)

Das erste Resorptionshindernis ist die der Luminalmembran der Enterozyten aufgelagerte hydrophile Schleimschicht (*unstirred water-layer*) mit einem pH-Wert von 6.0. <sup>[14]</sup> Durch die Anreicherung von Protonen in der Schleimschicht entsteht ein niedrigerer pH-Wert als im

Dünndarmlumen. Der aktive Transport kleiner Peptide und einiger Pharmaka ( $\beta$ -Lactam-antibiotika) ist an den daraus resultierenden, nach innen gerichteten pH-Gradienten gebunden. Biomembranen und Schlußleisten werden als intraepitheliale Barriere zusammengefaßt.

## 2.2 Transportmechanismen

Der Stofftransport durch ein Epithel ist grundsätzlich auf zwei Wegen möglich. Er kann parazellulär oder transzellulär erfolgen. Beim transzellulären Weg muß die apikale und basolaterale Zellmembran der Enterozyten überwunden werden. Der parazelluläre Weg hingegen verläuft über den Interzellularraum, der bei Epithelien durch die Schlußleiste (*tight junction*) abgedichtet ist. Die Schlußleiste ist frei durchgängig für Substanzen bis zu einem Durchmesser von 0,8 nm, d.h. sphärisch geformte Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 150 g/mol und kettenförmige Moleküle bis 400 g/mol können, in Abhängigkeit von ihren hydrophoben Eigenschaften, frei hindurch diffundieren. <sup>[15]</sup>

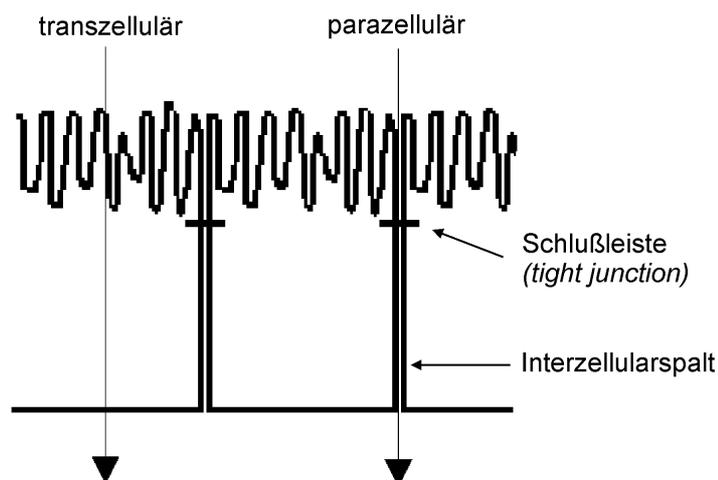
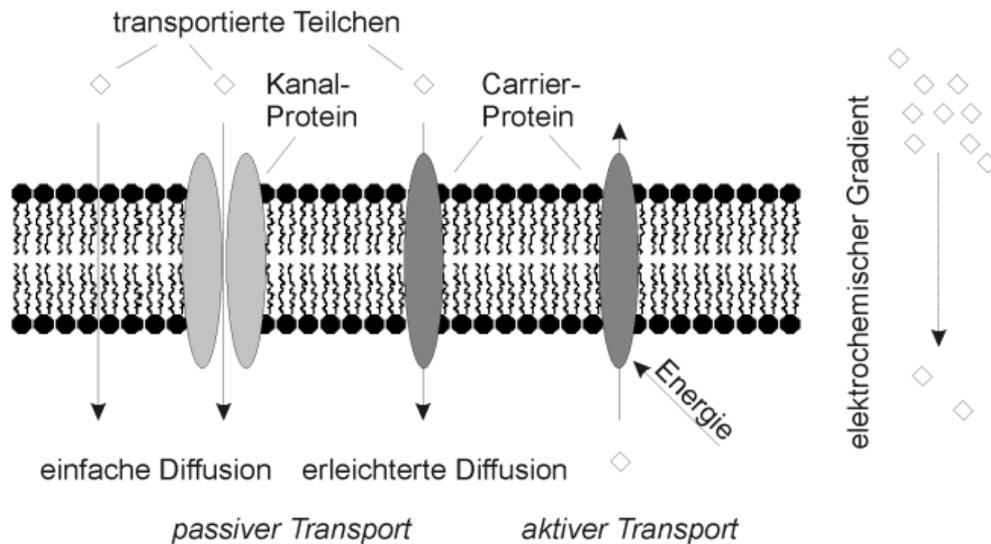


Abb. 2 Stofftransport durch die epitheliale Barriere <sup>[16]</sup>

Der transzelluläre Transport kann aktiv oder passiv erfolgen. Der passive Transport verläuft ohne Energieaufwand entsprechend dem vorhandenen Gradienten. Bei der Diffusion ist der Konzentrationsgradient, bei der Elektrodifusion der elektrische Gradient und bei der Filtration der hydrostatische Druckgradient die treibende Kraft. Die Diffusion wird durch das 1. Fick'sche Gesetz beschrieben. Demnach ist die pro Zeiteinheit diffundierende Stoffmenge proportional zum Konzentrationsgradienten, zur wirksamen Membranfläche und umgekehrt proportional zur Membranfläche. Man unterscheidet zwischen einfacher und erleichterter Diffusion.

Die einfache Diffusion erfolgt ohne Beteiligung eines Transportproteins durch die Phospholipid-Doppelschicht der Membran. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist vom Verteilungskoeffizienten zwischen Membranmaterial und umgebender Flüssigkeit abhängig.

Mit dem Begriff „erleichterte Diffusion“ wird der Transport durch die Membran durch Transportsysteme (*Carrier*) beschrieben. Sie stellt eine Sonderform der Diffusion dar. Membranständige Transportproteine binden das Substrat reversibel, wodurch eine Konformationsänderung des Carriers hervorgerufen wird. Die Passage des Substrats durch die Membran verläuft ebenfalls ohne Energieaufwand, ist jedoch hemm- und sättigbar. <sup>[17]</sup>



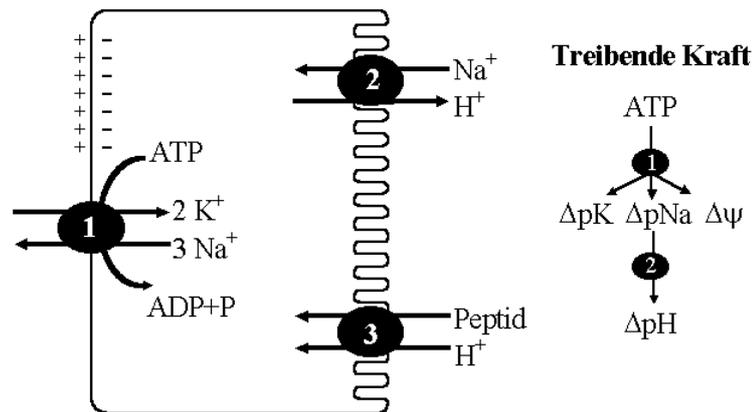
**Abb. 3** Schematische Darstellung des passiven und aktiven Transport durch die Zellmembran <sup>[13]</sup>

Der aktive Transport erfolgt unter Energieaufwand und kann entgegen einem Konzentrations- und/oder Spannungsgradienten verlaufen. Er ist durch Substratspezifität und Sättigungskinetik gekennzeichnet. Man unterscheidet zwischen primär, sekundär und tertiär aktivem Transport.

Der primär aktive Transport erfolgt unter unmittelbarem Verbrauch von ATP. Ein bekanntes Beispiel ist die in der Membranen von Epithelien lokalisierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, die pro ATP-Molekül 3  $\text{Na}^+$  gegen 2  $\text{K}^+$  austauscht (Antiport). Die dadurch erzeugte Spannung trägt mit 5 bis 10 mV zum Membranpotential bei.

Unter sekundär aktivem Transport versteht man einen carriervermittelten Cotransport (Sym- oder Antiport) dessen treibende Kraft ein Ionengradient ist, der durch einen primär aktiven Transport aufrechterhalten wird.

Der tertiär aktive Transport wird durch einen vom sekundär aktiven Transport gelieferten Gradienten angetrieben. Ein Beispiel dafür ist der  $\text{H}^+$ /Peptid-Symporter, der u.a. in der apikalen Membran des Dünndarms zu finden ist. (vgl. 2.3) Dieser Transporter weist eine hohe Affinität zu Di- und Tripeptiden auf, die gegen den elektrochemischen Gradienten in die Zelle aufgenommen werden können, solange ein zelleinwärts gerichteter  $\text{H}^+$ -Gradient besteht. Dieser Gradient wird durch einen ebenfalls in der apikalen Membran befindlichen sekundär aktiven  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter aufrechterhalten, der seinerseits von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase angetrieben wird.



**Abb. 4** Abhängigkeiten des Peptidtransports in der Bürstensaummembran <sup>[18]</sup>  
 (1)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, (2)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher, (3) Peptidtransporter;  
 $\Delta\text{pNa}$ ,  $\Delta\text{pH}$  und  $\Delta\text{pK}$  beschreiben die chemischen Transmembrangradienten für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$   
 und  $\text{K}^+$ ;  $\Delta\psi$  stellt das Membranpotential dar

Die Nutzung des pH-Gradienten schließt eine mögliche Konkurrenz zwischen Aminosäuren und Oligopeptiden um die treibende Kraft des Transporters aus. Die  $\text{Na}^+$ -getriebenen Aminosäure-Transportsysteme und das Peptid/ $\text{H}^+$ -Cotransportsystem arbeiten parallel und unabhängig voneinander. So ist eine optimale Absorption an den verschiedenen Epithelien gegeben. <sup>[19]</sup>

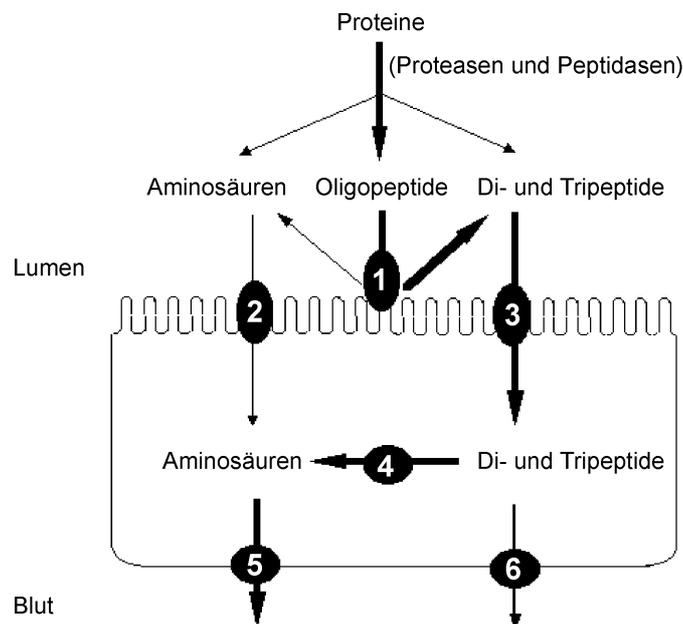
### 2.3 Das tertiär aktive Transportsystem PEPT1

Zusätzlich zu den Transportmechanismen, die den Transport von Aminosäuren ermöglichen, bietet die Aufnahmen kurzkettiger Peptide für die Zelle einen effizienten und ökonomischen Weg der Aminosäureaufnahme. Seit vielen Jahren ist in Bakterien und Hefen ein an Protonen gekoppelter Peptidtransport bekannt, der zu Beginn der achtziger Jahre auch in der apikalen Membran von Zellen des Dünndarmepithels (PEPT1) und im proximalen Tubulus der Niere (PEPT2) nachgewiesen wurde. Bei Wirbeltieren waren bis zu diesem Zeitpunkt vergleichbare aktive Transportmechanismen für Peptide nur als  $\text{Na}^+$ -gekoppelte Cotransportsysteme bekannt. Deswegen stellt die Tatsache, daß der Peptidtransporter einen Protonengradienten zur Aufnahme in die Zelle nutzt, eine neue Variante gekoppelter Transportsysteme dar. <sup>[20]</sup> Nachgewiesen ist dieser Transportmechanismus auch in Epithelen anderer Organe, wie in der Lunge und Plazenta <sup>[21]</sup>, im Gehirn <sup>[22,23]</sup>, sowie bei der Pflanzengattung *Arabidopsis* <sup>[24]</sup>. Bisher sind nur diese zwei Subtypen von Peptidtransportern beschrieben und teilweise charakterisiert worden. Basierend auf den Erkenntnissen der vergleichenden, elektrophysiologischen Untersuchung von PEPT1 und PEPT2 zeigten sich charakteristische Unterschiede im Aufbau, der Substrataffinitäten, und in den pH- und Potentialabhängigkeiten. Der auf Chromosom 13 codierte humane PEPT1 besteht aus 708 Aminosäureestern und ist

vom „*low affinity, high capacity*“-Typ. Demgegenüber ist PEPT2 aus 729 Aminosäurestern aufgebaut, ist auf Chromosom 3 codiert und ist vom „*high affinity, low capacity*“-Typ.

Eine Überblick hierzu und weiterführende Hinweise sind bei GANAPATHY et al. [4], DANIEL et al. [25], NUSSBERGER et al. [26] und TSUJI [27] zu finden.

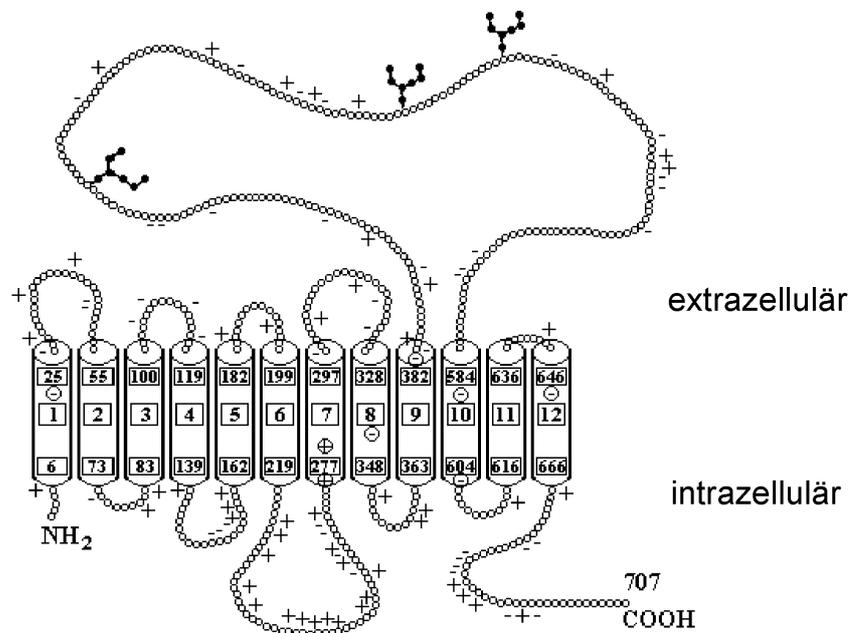
Während der Passage des Speisebreis durch den Gastrointestinaltrakt werden die Nahrungseiweiße enzymatisch zu Oligopeptiden und freien Aminosäuren abgebaut. Der Transport von Di- und Tripeptiden erfolgt über den Oligopeptidtransporter PEPT1, der in der Luminalmembran der Enterozyten lokalisiert ist. [15]



**Abb. 5** Verdauung und Resorption von Proteinen im Dünndarm; (1) apikale Peptidasen, (2) apikale Aminosäuretransportsysteme, (3) apikale Peptidtransportsystem(e), (4) cytoplasmatische Peptidasen, (5) basolaterale Aminosäuretransportsysteme, (6) basolaterale(s) Peptidtransportsystem(e) [15]

Über die Art des Transportmechanismus in der basolateralen Membran existieren widersprüchliche Angaben. Einige weitgehend stabile Peptide (z.B. Gly-Pro, Gly-Sar, Peptide mit D-Aminosäuren) können im Cytosol nur schwer enzymatisch gespalten werden. Nach MEREDITH et al. [21] erfolgt der Transport dann in Form des intakten Peptids über einen elektroneutralen Anionentransporter in der basolateralen Membran gegen Bicarbonat. Andere Arbeitsgruppen postulieren eine Protonen-Abhängigkeit des basolateralen Transportmechanismus, vergleichbar mit dem Oligopeptidtransporter der apikalen Membran [19,28,29], oder charakterisieren einen Transport der wenig abhängig vom Umgebungs-pH und nur entlang eines Konzentrationsgefälles stattfindet. [30] Es wird hierbei auf einen passiven Mechanismus in Form von erleichterter Diffusion geschlossen.

Nicht alle Aspekte des Peptidtransporters sind bekannt. Die molekulare Struktur wurde 1994 aufgeklärt. <sup>[31]</sup> Die Sequenz umfaßt, je nach Spezies, zwischen 707 und 710 Aminosäuren. Auffällig sind die 12 membrandurchspannenden Domänen und die große extrazellulär gelegene hydrophile Schleife zwischen den Domänen 9 und 10. Obwohl der Sequenzunterschied zu PEPT2 hier am größten ist (nur 21% Übereinstimmung), scheint die Schleife nicht essentiell für den Transport und die Substraterkennung zu sein. Über die Chimärentechnik (PEPT1/PEPT2 und PEPT2/PEPT1) wurde versucht, das aktive Zentrum des Transportproteins näher zu bestimmen. In der 1996 erschienenen Arbeit von DÖRING et al. <sup>[32]</sup> konnten die entscheidenden Transportfunktionen in der N-terminalen Hälfte (Domänen 1-9) des Proteins lokalisiert werden. Durch FEI et al. <sup>[33]</sup> wurde 2 Jahre später eine weitere Spezifizierung beschrieben. Danach liegen alle relevanten Funktionen zwischen den Domänen 7 bis 9.



**Abb. 6** Modell des humanen Peptidtransporters PEPT1 <sup>[31]</sup>

Nach GANAPATHY et al. <sup>[34]</sup> ist PEPT1, wie erwähnt, ein tertiär aktives Transportsystem, das bei einem pH-Wert von 6.0 sein Optimum besitzt. <sup>[35]</sup> PEPT1 ist sättigbar und transportiert Di- und Tripeptide zusammen mit Protonen gegen ein Konzentrationsgefälle. <sup>[3]</sup> Die treibende Kraft ist unter physiologischen Bedingungen ein nach innen gerichteter Protonengradient. <sup>[14]</sup> Ein einwärts gerichteter Gradient führt zu einer Erhöhung der Maximalgeschwindigkeit <sup>[36]</sup>, während ein nach außen gerichteter Protonengradient den Transport inhibiert. <sup>[37]</sup> Der Hill-Koeffizient wurde von DANIEL <sup>[3]</sup> mit 1 bestimmt. (vgl. 3.3.2) Nach MACKENZIE et al. <sup>[38]</sup> läuft der Transport nach einem geordneten Mechanismus ab, d.h. bevor es zu einer Substratbindung kommt muß das Proton gebunden werden.

---

Untersuchungen am Nierenepithel durch Daniel et al. <sup>[39]</sup> belegen, daß es sich bei der Substrat-Transporter-Interaktion um eine kompetitive Hemmung handelt. Es ist anzunehmen, daß bei PEPT1 der gleiche Hemmtyp vorherrscht.

Untersuchungen zur Stöchiometrie (Proton:Substrat-Verhältnis) ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Nach Auffassung von STEEL et al. <sup>[40]</sup> weisen neutrale und basische Dipeptide ein 1:1 und saure Dipeptide ein Proton:Substrat-Verhältnis von 2:1 auf. Demnach erfolgt der Transport der sauren Dipeptide in protonierter Form. Demgegenüber lassen Untersuchungen von AMASHEH et al. <sup>[41]</sup> den Schluß zu, daß der Transport neutraler Dipeptide nur von Membranpotential, nicht aber vom pH-Wert abhängt.

Die Unterschiede zum nierenspezifischen PEPT2-System werden einmal mehr durch die kürzlich erschienenen Arbeit von CHEN et al. <sup>[42]</sup> deutlich. Hier wurde nachgewiesen, daß eine  $H^+$ :Substrat-Stöchiometrie für neutrale Peptide von 2:1, für anionische Dipeptide von 3:1 und für positiv geladenen Dipeptide (H-Phe-Lys-OH) von 1,4:1 vorherrscht.

Einen wichtigen Beitrag zur Substraterkennung wird Tyrosin- und Histidin-Resten zugesprochen, welche in der Nähe der extrazellulären Schleife liegen.<sup>[43]</sup> Der Imidazolring in der Histidinseitenkette dient häufig als Protonenakzeptor oder -donator. Eine Blockierung mit Diethylpyrocarbonat führt zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität von PEPT1 <sup>[44,45]</sup> und zu einer Reduzierung der Maximalgeschwindigkeit. <sup>[3]</sup> Diese Passivität kann allerdings mit einem Substratüberschuß wieder aufgehoben werden. <sup>[46-48]</sup> Die ortsgerichtete Mutagenese von drei konservierten Histidinreste (His-57, His-124, His-260) ergab, daß His-57 für das Transportgeschehen von PEPT1 essentiell ist, während der Austausch der anderen 2 Histidinreste keine Wirkung zeigt. <sup>[49]</sup> Infolge dessen wurde vermutet, daß die  $\alpha$ -Aminogruppe des Peptids oder des Cephalosporins direkt mit dem Histidinrest interagiert und dies Bestandteil des Substraterkennungsmechanismus ist. <sup>[47,50]</sup>

Auf der substratbindenden Seite gelegene Thiol-Gruppierungen besitzen ebenfalls einen erheblichen Einfluß. Auch ihre Blockierung mit Thiol-spezifischen Reagenzien führt zu einer Abnahme der Aktivität des Transporters. <sup>[51]</sup>

In den letzten Jahren ist durch *molecular modeling*-Studien versucht worden, die strukturellen Anforderungen für die PEPT1/Substrat - Interaktion zu erfassen. Als Modellsubstrate erwiesen sich die relativ starren Cephalosporine als geeignet, wobei der Untersuchung immer eine Korrelation zwischen der chemischen Struktur und der Affinität zu Grunde lag. <sup>[11,52,53]</sup> Erst durch DÖRING et al. <sup>[54]</sup> wurden auch andere Verbindungen ( $\omega$ -Aminofettsäuren) in die Betrachtung mit einbezogen. Demnach ist die Distanz zwischen den zwei geladenen Zentren ( $\alpha$ -Aminogruppe und Carboxyfunktion) von entscheidender Bedeutung. Liegt sie in einem Bereich zwischen 500-630 pm, resultieren daraus gute Transporteigenschaften der Substrate. Interessanterweise wurde für die untersuchten  $\alpha$ -Amino-Cephalosporine eine ähnliche Abhängigkeit festgestellt. Hier erwies sich der Abstand, zwischen der C7  $NH_2$ -Gruppe und

der COOH-Gruppe am C4 Atom des Cephalosporangerüsts, von 550 pm als optimal für die Substraterkennung. Bei einer Distanz zwischen 700 pm und 900 pm resultiert eine niedrigere Affinität, ist sie größer als 900 pm, geht sie völlig verloren.

Ebenso wurde versucht, die Anordnung der zwölf Transmembrandomänen vom PEPT1 zu simulieren. <sup>[55,56]</sup> Nach den neusten Untersuchungen von LEE et al. <sup>[57]</sup> konnte auf der Basis vorangegangener Studien zur Struktur von PEPT1, der zellularen Beschaffenheit und der Einbeziehung von Milieufaktoren erstmals ein theoretisches Abbild der Anordnung aller 12 Domänen erzeugt werden. Aus der Simulation ergibt sich ein Kanal, der groß genug ist, um sich der molekularen Größe eines Dipeptidmoleküls anzupassen. Die entscheidenden Faktoren für die Substraterkennung werden in dem von den Domänen 7-10 gebildeten *half-channel* vermutet. Grundlage für diese Annahme sind die einwärts gerichteten polaren Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren Arginin (R-282) und Asparginsäure (D-341).

Das Modell läßt allerdings keine Rückschlüsse auf die oben beschriebene Bedeutung von His-57 (Transmembrandomäne 2) bei der Substraterkennung zu.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Die Caco-2-Zelllinie

Die humane Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 wurde 1974 aus dem Dickdarmtumor eines männlichen, 72 Jahre alten Patienten isoliert <sup>[58,59]</sup>. Bei der Kultivierung auf impermeablen Oberflächen (Plastik) wachsen die Zellen zu Monolayern heran, mit allen charakteristischen Eigenschaften für transportierende, polarisierte Epithelien, wie z.B. der Ausbildung von Domen. <sup>[60]</sup>

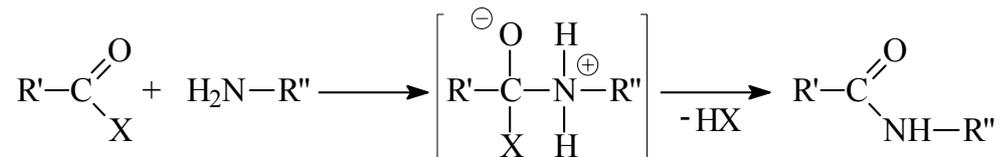
Caco-2 ist ein anerkanntes Modellsystem für Transport- und Aufnahmeuntersuchungen. <sup>[61]</sup> Diese Zelllinie exprimiert verschiedene Transporter. Beschrieben werden konnte u.a. der Glukose-Transport <sup>[62]</sup>, der Aminosäure-Transport <sup>[63]</sup>, der Peptid-Transport <sup>[64]</sup>, der Transport von Vitamin B<sub>12</sub> <sup>[65]</sup> und der Transport verschiedener Arzneistoffe. <sup>[64,66]</sup> Mehrere Studien zeigten, daß bei Einhaltung definierter Kulturbedingungen durch Flux-Messungen am *in vitro* Permeationsmodell mit Caco-2 die *in vivo* Resorption von Substraten im Menschen vorausgesagt werden kann. <sup>[60,67,68]</sup>

Die bei der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Weiterführende Angaben zur Kultivierung der Caco-2 Zelllinie, den Versuchsbedingungen und der Meßmethodik sind im Experimentellen Teil zu finden.

### 3.2 Grundlagen zur Synthese der Aminosäurederivate und Peptide

Die zur Synthese der Säureamid-Bindung aus Carbonsäure und Amin führenden Reaktionen sind bimolekulare nucleophile  $S_N2$ -Substitutionen vom Addition-Eliminierungs-Mechanismus. Der entscheidende Schritt ist die Anlagerung des Stickstoffs mittels seines freien Elektronenpaares an das positiviert Kohlenstoffatom einer „polarisierten“ Carboxyl-Gruppe:



**Abb. 7** Allgemeines Syntheschema zur Darstellung einer Peptidbindung

Die Amin-Komponente kann daher nur als freie Base oder in Form eines Derivates reagieren, so daß die Addition mittels des freien Stickstoffelektronenpaares nicht beeinträchtigt wird. Bei der Synthese der Aminosäure-Derivate kommt erschwerend hinzu, daß (abgesehen von sterischen Einflüssen des Restes R'') das freie Elektronenpaar am Stickstoff durch Mesomerie beansprucht wird. Die Bereitschaft der freien Base zur aminolytischen Substitution läuft etwa parallel zu ihrer Basestärke. Sie ist am größten beim Benzylamin, gefolgt von primären aliphatische Aminen. Sekundäre Amine, wie z.B. Piperidin und schwach basischen Aniline stellen das Ende der Reihe dar. <sup>[69]</sup>



Noch stärker tritt die Mesomerie bei mehrfach substituierten Arylsystemen auf, so daß besonders bei der Umsetzung von 2,4-Dinitroanilin und den mehrfach flourierten Arylaminen recht drastischen Reaktionsbedingungen gewählt werden mußten.

Die Synthese der Dipeptide und Dipeptid-Derivate erfolgte nach den in der Peptidchemie üblichen Strategien und Taktiken.

Weiterführende Angaben zu den Reaktionsbedingungen und den physikalischen Daten der Verbindungen sind im Experimentellen Teil zu finden.

### 3.3 Mathematische Methoden

#### 3.3.1 Berechnung der Aufnahmegeschwindigkeit radioaktiv markierter Substrate

Die Berechnung der Aufnahmegeschwindigkeit  $v$  des Referenzsubstrates [ $^{14}\text{C}$ ]Gly-Sar erfolgte durch Gleichung (I):

$$v[\text{pmol}/(\text{mg Protein} \times 10 \text{ min})] = \frac{c_s[\mu\text{M}] \times V_{\text{St}}[\mu\text{L}] \times \text{Probe}[\text{dpm}]}{\text{Standard}[\text{dpm}] \times \text{Protein}[\text{mg}]} \quad (\text{I})$$

$c_s$	= Konzentration des radioaktiv markierten Substrates
$V_{\text{St}}$	= Volumen des Standards (entspricht 25 $\mu\text{l}$ )
Probe	= Radioaktivität der Probe
Standard	= Radioaktivität des Standards
Protein	= Proteingehalt pro Petrischale

#### 3.3.2 Bestimmung des $\text{IC}_{50}$ -Wertes

Zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes mußte zuerst die Aufnahmegeschwindigkeit  $v$  von [ $^{14}\text{C}$ ]Gly-Sar bei den entsprechenden Inhibitorkonzentrationen nach Gleichung (I) berechnet werden. Anschließend wurden diese prozentual auf den Kontrollwert (=  $v$  der Probe ohne Substratzusatz) bezogen. Diese prozentuale Hemmung (Y) wurde gegen die Konzentration des potentiellen Inhibitors (S) aufgetragen. Die Auswertung der konzentrationsabhängigen Hemmkurven erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Unter Verwendung der Logistikk-Gleichung für Dosis-Wirkungs-Beziehungen (allosterische Hill-Kinetik, Gleichung (II)) erfolgte die rechnergestützte Berechnung mit dem Programm Origin<sup>TM</sup> 5.0 der Firma Microcal<sup>TM</sup> (Northhampton, USA).

$$Y = \frac{\text{Min} + (\text{Max} - \text{Min})}{(1 + (\text{S} / \text{IC}_{50})^{-P})} \quad (\text{II})$$

Min	= Minimum; nicht sättigbarer Anteil (entspricht 10,68%)
Max	= Maximum; Anfangswert von Y (entspricht 100%)
P	= Hill-Koeffizient (=1) <sup>[3]</sup>
S	= Substratkonzentration

Der diffusible und anhaftende Anteil (Min) von 10,68% ergab sich aus der Mittlung aller durchgeführten Aufnahmehemmungen von [ $^{14}\text{C}$ ]Gly-Sar durch 31,6 mM Glycylsarkosin, da von einer maximalen Hemmung des aktiven Transportes durch sich selbst in einer

---

Konzentration ausgegangen werden kann, die die Halbhemmkonzentration mehr als das 30-Fache überschreitet. <sup>[70]</sup>

### 3.3.3 Bestimmung des $K_I$ -Wertes

Um eine Aussage über die Affinität des Hemmstoffes unabhängig vom Substrat und dessen Angebotskonzentration zu treffen, wurde der  $IC_{50}$ -Wert in die Hemmkonstante  $K_I$  bei kompetitiver Hemmung mit Gleichung (III) umgerechnet. <sup>[71]</sup>

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + S/K_t} \quad \text{(III)}$$

S = Substratkonzentration

$K_t$  = Michaelis-Menten-Konstante des Substrates

### 3.3.4 Statistische Auswertung

Jedes Experiment wurde als Duplikat durchgeführt und einmal wiederholt ( $n = 4$ ). In Einzelfällen erfolgte die Bestätigung durch weitere Experimente ( $n = 8-12$ ). Die erhaltenen Datenreihen wurden einzeln nach Gleichung (II) ausgewertet und die  $IC_{50}$ -Werte als Mittel mit Standardabweichung ( $\bar{x} \pm SE$ ) berechnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zur Substrataffinität

#### 4.1.1 Aminosäurederivate

Die Einbeziehung der Aminosäurederivate in die Affinitätsuntersuchungen erfolgte unter dem Aspekt der Minimierung der Substratstruktur. Ausgehend vom L-Alanin wurde eine Derivatisierung an der Carboxylfunktion vorgenommen.

Untersuchungen zum Transport von Aminosäuren am Caco-2 System wurden mehrfach beschrieben.<sup>[63,72,73]</sup> In allen Fällen ist der beobachtete Transport allerdings auf die Aminosäuretransportsysteme der Zellen zurückzuführen. Daher wurde unter den spezifisch für das Dipeptidtransportsystem PEPT1 gewählten Bedingungen kein Transport von Alanin (**1**) erwartet. Ein  $K_I$ -Wert von  $> 30$  mM bestätigte diese Annahme. Auch Aminosäurealkyl- bzw. -arylester, wie L-Alanin-methylester (**2**) und L-Alanin-*p*-nitrobenzylester (**4**) wurden vom Transportprotein nicht als Substrate erkannt.

Interessanterweise ist der über eine Esterbindung an Valin geknüpfte antivirale Wirkstoff Acyclovir (Valacyclovir) ein Substrat für PEPT1.<sup>[74-77]</sup> Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse sollte die Erkennung des Valacyclovirs durch den Transporter nicht allein auf die Wechselwirkungen mit dem Aminosäureteil der Verbindung beruhen. Möglicherweise sind beide Molekülteile der Verbindung an der Interaktion beteiligt.

**Tab. 1**  $K_I$ -Werte von L-Alanin und -estern

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
<b>1</b>	H-Ala-OH	$> 30$
<b>2</b>	H-Ala-O-CH <sub>3</sub> * HCl	$> 30$
<b>3</b>	H-Ala-O-  -NO <sub>2</sub> * HCl	zerfällt
<b>4</b>	H-Ala-O-CH <sub>2</sub> -  -NO <sub>2</sub> * HBr	$22 \pm 2$

In Analogie zu einer Peptidbindung wurde als weitere Strukturmodifikation eine C-terminale Säureamid-Funktion eingeführt. Aber auch die untersuchten Aminosäureamide H-Gly-NH<sub>2</sub> (**5**), H-Ala-NH<sub>2</sub> (**6**) und H-Phe-NH<sub>2</sub> (**7**) wiesen keinerlei Affinität zum Transportsystem auf.

Eine Substitution eines oder beider Wasserstoffatome am Amid-Stickstoff mit kurzen aliphatischen Resten (Methyl, Ethyl) ergab Verbindungen (**8-11**), die ebenfalls keine Affinität zu PEPT1 aufwiesen. Die Verlängerung der Alkylkette auf 12 Methylgruppen führte erstmals zu einer Verbindung (**12**), die ein Substrat von PEPT1 zu sein scheint. Wahrscheinlicher aber ist, daß durch den Anstieg der Hydrophobizität dieser Verbindung andere Transportmechanismen von Bedeutung sein könnten.

**Tab. 2** K<sub>I</sub>-Werte von Aminsäureamiden

Nr.	Verbindung	K <sub>I</sub> [mM]
<b>5</b>	H-Gly-NH <sub>2</sub> * HCl	> 30
<b>6</b>	H-Ala-NH <sub>2</sub> * HCl	> 30
<b>7</b>	H-Phe-NH <sub>2</sub> * HCl	> 30
<b>8</b>	H-Ala-NH-CH <sub>3</sub> * HCl	> 30
<b>9</b>	H-Ala-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * HCl	16 ± 2
<b>10</b>	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> * HCl	> 30
<b>11</b>	H-Ala-N(CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * HCl	> 30
<b>12</b>	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -CH <sub>3</sub> * HCl	0,9 ± 0,1

Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluß eine in ein Ringsystem integrierte Amidstruktur auf die Affinität besitzt.

Getestet wurde deshalb eine Reihe heterocyclischer L-Alaninamide, bei denen der Stickstoff entweder in ein Fünfring- oder in ein Sechsringsystem involviert ist. Als „Basisstruktur“ diente das L-Alaninpyrrolidid (**13**) beziehungsweise das L-Alaninpiperidid (**17**). Mit einem K<sub>I</sub>-Wert, der größer ist als 30 mM, stellen diese beiden Verbindungen keine Substrate für den Transporter dar. Dieser Befund überraschte, da das Dipeptid H-Ala-Pro-OH (**15**) als natürliches Substrat von PEPT1 mit hoher Affinität erkannt wird.

Tab. 3  $K_I$ -Werte von heterocyclischer L-Alaninamiden

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
13	H-Ala-N $\square$ * HCl	> 30
14	H-Phe-N $\square$ * HCl	> 30
15	H-Ala-N $\square$ H $\dashv$ COOH	0,11 $\pm$ 0,01
16	H-Ala-N $\square$ HOOC $\dashv$ H * HCl	15 $\pm$ 2
17	H-Ala-N $\square$ * HCl	> 30
18	H-Ala-N $\square$ H $\dashv$ COOH * HCOOH	1,6 $\pm$ 0,1
19	H-Ala-N $\square$ H $\dashv$ COOH * HCOOH	3,7 $\pm$ 0,3
20	H-Ala-N $\square$ H $\dashv$ COOH * HCl	0,06 $\pm$ 0,01

Ein Vergleich der  $K_I$ -Werte von Verbindung **11** und Verbindung **13** läßt den Schluß zu, daß ein Ringschluß allein nicht ausreichend ist, um eine Änderung des Inhibierungsvermögens zu bewirken. Vielmehr scheint der entscheidende Faktor für die Substraterkennung die  $\alpha$ -ständige Carboxylgruppe zu sein. Eine Variation der Position der COOH-Gruppe im Sechsringsystem führte zu unterschiedlichen Inhibierungskonstanten. Ein  $K_I$ -Wert von 0,06 mM weist H-Ala-Pip-OH (**20**) im Vergleich zu H-Ala-Pro-OH (**15**) als erstklassiges Substrat aus. Weniger gut toleriert wurden die entsprechenden *meta*- und *para*-Verbindungen (**18,19**).

Es läßt sich aus den bisherigen Untersuchungen feststellen, daß tertiäre Amid-Strukturen sich störend auf die Substrat-Transporter-Interaktion auswirken. Weder die beiden Dialkyl-Derivate (**9,11**) noch das L-Alaninpyrrolidid (**13**) und -piperidid (**17**) weisen eine Affinität zu PEPT1 auf.

Vergleichbare Effekte sind auch bei dem Dipeptid (vgl. 4.1.2; H-Ala-Sar-OH (**68**)) und bei dem in Tab. 4 aufgeführten H-Ala-N-methylanilid (**22**) zu beobachten. In beiden Fällen erweist sich die N-Methylgruppen als störend für die Substraterkennung.

Entscheidend für die Affinität scheint das molekulare Umfeld des Amidstickstoffs zu sein. So sollte eine freie –NH-Gruppierung zu Substanzen führen, die eine Interaktion mit dem Transportprotein begünstigen. Des weiteren ist festzustellen, daß Sechsringsysteme im allgemeinen besser von PEPT1 toleriert werden als Fünfringsysteme.

Unter der Berücksichtigung des positiven Einflusses einer Sechsringstruktur, eines Substituenten am Arylsystem und einer freien –NH-Gruppierung auf das Substrat-erkennungsverhalten des Transportproteins PEPT1 wurden im folgenden Verbindungen untersucht, die eine L-Alaninanilid-Grundstruktur aufweisen.

Bereits H-Ala-anilid (**21**) als einfachstes Aminosäurearylamide wird vom Peptidtransporter als Substrat akzeptiert. <sup>[78]</sup>

**Tab. 4**  $K_I$ -Werte von L-Alaninanilid und L-Alanin-N-methylanilid

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
<b>21</b>	H-Ala-NH-  * HCl	2,9 ± 0,2
<b>22</b>	H-Ala-N(CH <sub>3</sub> )-  * HCOOH	12 ± 2

Ausgehend von L-Alaninanilid (**21**) erfolgte die Einführung von Substituenten in *ortho*-, *meta*- und *para*-Stellung am Arylsystem. Ausgewählt wurden Substituenten mit unterschiedlichen mesomeren, induktiven und sterischen Eigenschaften, wie z.B. -Cl, -CH<sub>3</sub>, -F, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -COOH, und -NO<sub>2</sub>.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Einführung der Substituenten und deren Stellung einen erheblichen Einfluß auf die Interaktion der L-Alaninanilid-Derivate mit dem Transportprotein besitzen.

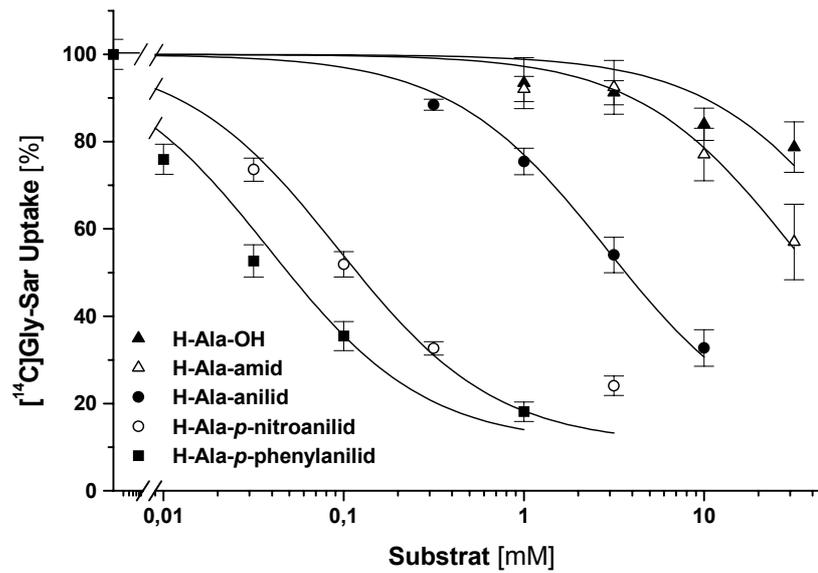
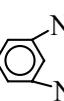
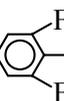
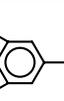
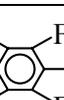


Abb. 8 Hemmkurven ausgewählter L-Alaninderivate

Durch die Einführung einer paraständigen Nitrogruppe konnte die Affinität im Vergleich zur H-Ala-anilid-Grundstruktur um den Faktor 36 gesteigert werden. Die Verbindungen H-Ala-*p*-nitroanilid (**23**) und H-Phe-*p*-nitroanilid (**27**) stellen erstklassige Substrate dar und können dem Vergleich mit natürlichen Dipeptiden standhalten. Andere Aminosäure-*p*-nitroanilide (H-Leu-, H-Glu-, H-Arg-) wurden als Substrate für das renale Peptid-transportsystem durch DANIEL et al.<sup>[37]</sup> beschrieben.

Tab. 5  $K_I$ -Werte der Aminosäurearylamide

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
23	H-Ala-NH-  -NO <sub>2</sub> * HCl	0,08 ± 0,01
24	H-Ala-NH-  -NO <sub>2</sub> * HCl	0,50 ± 0,05
25	H-Ala-NH-  -NO <sub>2</sub> * HBr	4,9 ± 0,3
26	H-Ala-NH-  -NO <sub>2</sub> * HBr	0,39 ± 0,03
27	H-Phe-NH-  -NO <sub>2</sub> * HCl	0,09 ± 0,01

28	H-Ala-NH-  -Cl * HCl	0,33 ± 0,07
29	H-Ala-NH-  * HCl	0,46 ± 0,04
30	H-Ala-NH-  * HCl	7,8 ± 0,9
31	H-Ala-NH-  -CH <sub>3</sub> * HCl	0,34 ± 0,04
32	H-Ala-NH-  * HCl	0,41 ± 0,06
33	H-Ala-NH-  * HCl	14,2 ± 3,4
34	H-Ala-NH-  -  * HCl	0,03 ± 0,003
35	H-Ala-NH-  -  * HCl	0,29 ± 0,06
36	H-Ala-NH-  -  * HCl	16,6 ± 0,9
37	H-Ala-NH-  -F * HCl	0,46 ± 0,04
38	H-Ala-NH-  * HBr	0,11 ± 0,008
39	H-Ala-NH-  * HBr	> 30
40	H-Ala-NH-  * HBr	3,1 ± 0,3

In Abhängigkeit von der Position des Substituenten tritt eine deutliche Abstufung der Affinität ein. Die höchsten  $K_1$ -Werte besitzen die jeweiligen *ortho*-Derivat (**25,30,36,39**).

Die hohe Affinität der *para*-, zum Teil auch die der *meta*-substituierten Aminosäureanilid-Derivate kann nicht ausschließlich durch die elektronischen Effekte erklärt werden. Zwar kommt es durch den starken  $-I$  und  $-M$ -Effekt der Nitrogruppe zu einer Verminderung der Elektronendichte des Arylsystems bis hin zum Amidstickstoff, aber andere *para*-substituierte

Arylamide (**28,31,34,37**) besitzen trotz z.T. gegensätzlicher mesomerer und induktiver Effekte vergleichbare  $K_I$ -Werte.

**Tab. 6** Gegenüberstellung von Substituenteneffekten und  $K_I$ -Werten

Nr.	Substituent	Effekt	$K_I$ [mM]
<b>28</b>	-Cl	-I / +M	$0,33 \pm 0,07$
<b>31</b>	-CH <sub>3</sub>	+I	$0,34 \pm 0,04$
<b>23</b>	-NO <sub>2</sub>	-I / -M	$0,08 \pm 0,01$
<b>34</b>	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-I / +M	$0,03 \pm 0,003$

In die Betrachtung mit einbezogen werden müssen die Molekülhydrophobizität und insbesondere bei den *ortho*-Derivaten sterische Effekte. Dies zeigt sich besonders deutlich bei den Diphenyl-Verbindungen (**34,35,36**). Der  $K_I$ -Wert von 0,03 mM für das Alanin-*p*-phenylanilid (**34**) weist diese Verbindung als ein erstklassiges Substrat für PEPT1 aus. Allerdings sind hier im Vergleich zu Alanin-*p*-nitroanilid (**23**) nur schwache elektronische Effekte zu diskutieren. Der zweite Phenylring übt zwar ebenfalls, wenn auch einen wesentlich geringeren -I-Effekt auf das Arylsystem aus, allerdings sind die mesomeren Effekte vernachlässigbar klein. Da die Hydrophobizität der drei Verbindungen (**34,35,36**) nahezu identisch sein sollte, scheinen die strukturellen Eigenschaften des Biphenyl-Systems von Bedeutung zu sein. Die *para*- und *meta*-Verbindung liegen als planare Spezies vor, während im *ortho*-Derivat (**36**) das zweite Ringsystem um 40° verdreht zur Ebene des Arylsystems angeordnet ist.<sup>[79]</sup> Denkbar wäre, daß ähnliche molekulare Anordnungen auch bei anderen *ortho*-substituierten Aniliden vorliegen, die die mögliche Ausbildung einer Sandwich-Struktur zur Interaktion mit dem Transportprotein unterbinden.

Interessante Ergebnisse erbrachten H-Ala-anilid-Derivate, die sich durch Mehrfachsubstitution am aromatischen Ringsystem auszeichnen. Die Akzeptanz des Transporters für diese Substrate wird hier offensichtlich ebenfalls nur von der Position der Substituenten (*meta* oder *para*), nicht aber von deren Anzahl beeinflusst. In Analogie zum Alanin-3,5-di-nitroanilid (**26**) wird auch der Austausch der Wasserstoffatome durch Fluor in den Positionen 3, 4 und 5 am Ringsystem (**38**) gut toleriert. Das geringe Inhibierungsvermögen der *ortho*-substituierten Alaninanilide gehen durch Substitution beider *ortho*-Positionen (Verbindung **39**) offensichtlich völlig verloren. Nicht erklärbar in diesem Zusammenhang ist allerdings die relativ gute Affinität des L-Alanin-*penta*-fluor-anilids (**40**). Trotz des Vorhandenseins von

Fluoratomen in beiden *ortho*-Positionen besitzt dieses Substrat einen mit dem L-Alanin-anilid (**13**) vergleichbaren  $K_I$ -Wert.

Eine Ausnahme in dieser Betrachtung bilden die L-Alanin-aminobenzoesäureamide (**41-47**). Das *para*-substituierte L-Alanin-aminobenzoesäureamid (**41**) weist den höchsten  $K_I$ -Wert auf und ist damit das schlechteste Substrat dieser Substanzreihe. Eine Ursache dafür könnte die Ausbildung von Dimeren oder noch höhermolekularen Verbindungen sein. Da die Säurestärke von Carbonsäuren wesentlich von Umgebungseinflüssen abhängt, erhöht jeder Faktor der die Säure destabilisiert und/oder das Carboxylat-Anion stabilisiert die Säurestärke und umgekehrt. <sup>[80]</sup> Es ist durchaus denkbar, daß sich unter den gegebenen sauren Versuchsbedingungen (pH 6.0) eine Betainstruktur ausbildet. Einen optischen Hinweis dafür lieferte die H-Phe-*p*-aminobenzoesäureamid (**47**). Kurz nach dem Lösen der Substanz im Puffer 1 (vgl. 6.1.2) setzt sich die Verbindung als feiner weißer Niederschlag ab, so daß die Uptake-Experimente nicht durchgeführt werden konnten.

**Tab. 7**  $K_I$ -Werte von L-Alanin-aminobenzoesäurederivaten

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
41	H-Ala-NH-  -COOH * HCl	9,1 ± 1,7
42	H-Ala-NH-  -COOH * HCl	0,31 ± 0,03
43	HOOC H-Ala-NH-  * HCl	2,8 ± 0,2
44	H-Ala-NH-  -COOCH <sub>3</sub> * HCl	1,1 ± 0,1
45	H-Ala-NH-  -COOCH <sub>3</sub> * HCl	6,9 ± 0,3
46	H <sub>3</sub> COOC H-Ala-NH-  * HCl	0,89 ± 0,05
47	H-Phe-NH-  -COOH * HCl	n. m.

Um den potentiellen Einfluß der Ladung der Carboxylfunktion auf die  $K_I$ -Werte zu ermitteln, wurde die Substanzreihe durch die entsprechenden Methylester-Derivate komplettiert. Wie aus Tab. 7 deutlich ersichtlich, wurde sowohl die Verbindung **44**, als auch die Verbindung **46** besser erkannt als die entsprechende freie Säure. Eine Ausnahme stellt der Alanin-*m*-aminobenzoesäure-methylester (**45**) dar.

Insgesamt gesehen zeigen diese Ergebnisse eine graduelle Abstufung der Substrateigenschaften der untersuchten L-Alanin-anilid-Derivate in Abhängigkeit der Substitution in der Reihenfolge *para*- > *meta*- > *ortho*-Stellung. Diese Ergebnisse sind aber nicht allein aus den Unterschieden in den elektro- und sterischen Eigenschaften der Verbindungen zu erklären. Des weiteren zeigte sich, daß eine negative Ladung und deren Position am aromatischen Ringsystem die Substrateigenschaften von Ala-arylamiden deutlich beeinflusst.

Als weitere Strukturmodifikation erfolgte, wie aus der Substanzreihe in Tab. 8 ersichtlich, der Austausch des Arylsystems durch ein Cyclohexylsystem.

**Tab. 8**  $K_I$ -Werte von L-Alanin-cyclohexylamidderivaten

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
48	H-Ala-NH-  * HCOOH	1,5 ± 0,1
49	H-Ala-NH-  CH <sub>3</sub> * HCOOH	0,47 ± 0,02
50	 H-Ala-NH-  * HCOOH	3,7 ± 0,3

Die beobachteten Affinitätsunterschiede der entsprechenden Verbindungstypen dürften in erster Linie auf Konformationsunterschiede der beiden Ringsysteme zurückzuführen sein. Die Sesselkonformation des Cyclohexanrings scheint sich möglicherweise besser in die Tasche des Transportproteins einpassen zu können als der planare Benzenring.

Ein weiterer Aspekt ist die Erhöhung der Molekülhydrophobizität der Verbindungen, da die Hydrophobizität des Cyclohexanringes mit der des entsprechenden offenkettigen Alkans vergleichbar ist.<sup>[81]</sup>

Des weiteren ist hier zu berücksichtigen, daß bei der Darstellung der Verbindungen **49** und **50** auf ein *cis/trans*-Gemisch von *ortho*-, bzw. *para*-Methylcyclohexylamin zurückgegriffen werden mußte, so daß die Produkte wahrscheinlich ebenfalls in einem *cis/trans*-Gemisch vorlagen. Die beiden Verbindungen zeigten im Protonenspektrum zwei Datensätze, was möglicherweise auf zwei im Gleichgewicht vorliegende Konformationen hinweist. Die Auswertung der zweidimensionalen ROESY-Spektren zeigte jedoch keinen chemischen Austausch zwischen den beiden Datensätzen und lediglich eine geringfügige Anzahl charakteristischer NOEs, was die Identifizierung der Isomere erschwerte. Die relativen Populationen der Haupt- und Nebenisomeren in den Verbindungen (**49**) und (**50**) wurden durch Integration gut aufgelöster Signale in den eindimensionalen Protonenspektren bestimmt. (vgl. NMR-Daten)

In der *para*-Position hat die Stellung des Substituenten kaum einen Einfluß auf die Affinität im Vergleich zum L-Alanin-*p*-methylanilid (**31**). Ein erheblicher Einfluß hingegen ist der Methylgruppe in der *ortho*-Position zuzuschreiben.

Hier scheint weniger die elektronische Eigenschaft des Substituenten eine Rolle zu spielen, als vielmehr der Abstand zwischen Amidstickstoff und der funktionellen Gruppe. Ein Vergleich von Verbindung **50** und Verbindung **19** zeigt identischen Affinitäten.

Eine weitere Modifikation der Alanin-hexyl-, bzw. -arylamid-Struktur wurde durch die Einführung von CH<sub>2</sub>-Gruppen zwischen Amidstickstoff und Ringsystem realisiert.

**Tab. 9** K<sub>I</sub>-Werte von L-Alanin-benzylamidderivaten und L-Alanin-hexylamidderivaten

Nr.	Verbindung	K <sub>I</sub> [mM]
<b>51</b>	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -  * HCOOH	0,46 ± 0,05
<b>52</b>	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -  * HCOOH	0,42 ± 0,02
<b>53</b>	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -  * HCl	14 ± 1
<b>54</b>	H-Ala-N(-CH <sub>2</sub> -  ) <sub>2</sub> * HCl	7,6 ± 0,5
<b>55</b>	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -  -CH <sub>3</sub> * HCl	18 ± 2
<b>56</b>	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -  -NO <sub>2</sub> * HCl	> 30

Wird zwischen Amidstickstoff und Cyclohexylsystem eine CH<sub>2</sub>-Gruppe eingeführt (**51**), so führt das im Vergleich zu Verbindung **48** zu einer weiteren Verbesserung des K<sub>I</sub>-Wertes, wobei es unerheblich ist, ob eine oder zwei CH<sub>2</sub>-Gruppen (**52**) eingeführt werden.

Im Unterschied dazu führt die gleiche Modifikation bei den L-Alanin-arylamiden zu einem teilweisen (**53,55**) oder, wie im Falle des H-Ala-*p*-nitrobenzylamids (**56**), zu einem völligen Verlust der Affinität gegenüber PEPT1.

Hier ist anzunehmen, daß durch die zwischengeschaltete CH<sub>2</sub>-Gruppe der elektronische Effekt der funktionellen Gruppe auf den Amidstickstoff unterbrochen wird. <sup>[82]</sup> Des weiteren ist festzustellen, daß die Affinität gegenüber PEPT1 um so drastischer sinkt, je größer der mesomere und induktive Einfluß des Substituenten auf das Arylsystem ist.

Gleichzeitig mit der CH<sub>2</sub>-Einführung wurde aber auch die Größe des Moleküls verändert, so daß es zu einer Abstandsvergrößerung zwischen dem freien N-Terminus und der funktionellen Gruppe am Arylsystem kommt.

Es ist anzunehmen, daß beide Parameter sich gleichzeitig negativ auf die Affinität auswirken.

Diese Untersuchungen anhand einer breiten Palette von Aminosäurederivaten machten deutlich, daß für die Substrataffinität zu PEPT1 bestimmte Faktoren von zentraler Bedeutung sind.

Ein entscheidendes Kriterium scheint die molekulare Hydrophobizität zu sein.

**Tab. 10**  $K_I$ -Werte von H-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-R und H-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R Verbindungen

Nr.	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -R	$K_I$ [mM]	Nr.	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -R	$K_I$ [mM]
	R =			R =	
<b>128</b>	-COOH	$0,14 \pm 0,1$	<b>129</b>	-COOH	$2,7 \pm 0,1$
<b>10</b>	-CH <sub>3</sub>	> 30	<b>57</b>	-OH	> 30
<b>53</b>		$14,1 \pm 1,1$	<b>52</b>		$0,42 \pm 0,02$
<b>51</b>		$0,46 \pm 0,05$			

In der H-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-R - Reihe hat der Austausch der C-terminalen Carboxylgruppe vom H-Ala-Gly-OH (**128**) durch einen kurzen aliphatischen Rest (Methylgruppe; **10**) keine Einfluß auf die Erhöhung der Substrataffinität. Die Einführung von Ringsystemen hat zur Folge, daß mit der Erhöhung der hydrophoben Eigenschaften (Benzyl- (**53**), Cyclohexyl- (**51**)), die  $K_I$ -Werte sinken, obwohl hier nicht nur hydrophobe Effekte zu diskutieren sind.

Ähnliche Ergebnisse erhält man in der H-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R - Reihe. Der beste  $K_I$ -Wert wurde mit dem Cyclohexylderivat (**52**) erreicht. Allerdings wird in dieser Position eine Carboxylfunktionen (Verbindung **129**) ebenfalls toleriert. Nicht akzeptiert wird hingegen eine Alkoholfunktion (**57**).

Diese Ergebnisse zeigen, daß mit der Erhöhung der Hydrophobizität eine Verbesserung der Affinität einhergeht. Als vorteilhaft hat sich die Einführung von Ringsystemen erwiesen. Nicht akzeptiert werden hingegen Alkoholfunktionen und kurze aliphatische Reste.

Des weiteren scheint die molekulare Umgebung des Säureamidbindungstickstoffs (-CO-NH-) einen Einfluß auf die Substraterkennung zu haben. Beim Austausch des Amid-Protons gegen eine Methylgruppe (Verbindung **22**) sinkt die Affinität gegenüber PEPT1 drastisch. Demgegenüber wird eine Modifikation des Carbonylsauerstoffatoms (-CO-NH-), z.B. durch die Einführung einer Thioxogruppe (-CS-NH-), gut toleriert. <sup>[68]</sup>

Ein anderer Parameter scheint die Polarisierung der Säureamid-Bindung zu sein. Bei den Aminosäureamiden läßt sich der elektronische Einfluß von Substituenten auf das aromatische System durch die Lineare-Freie-Enthalpie-Beziehungen (LFE) beschreiben. LFE-

Beziehungen sind empirisch und lassen sich nicht unmittelbar aus thermodynamischen Gesetzen ableiten. Ihre Gültigkeit ist nur durch das chemische Experiment gesichert. <sup>[84]</sup>

Als Resultat von LFE-Beziehungen können elektronische Substituentenkonstanten, wie die *HAMMETT*-Konstanten  $\sigma_{\text{para}}$  und  $\sigma_{\text{meta}}$ , für aromatische Verbindungen beschrieben werden. Die Bestimmung der Konstanten erfolgte durch Dissoziation von *meta*- und *para*-substituierten Benzoesäuren. Bei den entsprechenden *ortho*-Derivaten versagt diese Methode. Durch SWAIN et al. <sup>[85]</sup> erfolgte eine erste Korrektur der Werte, wobei die Feld- und Resonanz-Parameter  $F$  und  $R$  in die Berechnung mit einbezogen wurden. Eine weitere Berichtigung erfolgte durch HANSCH et al. <sup>[86]</sup>

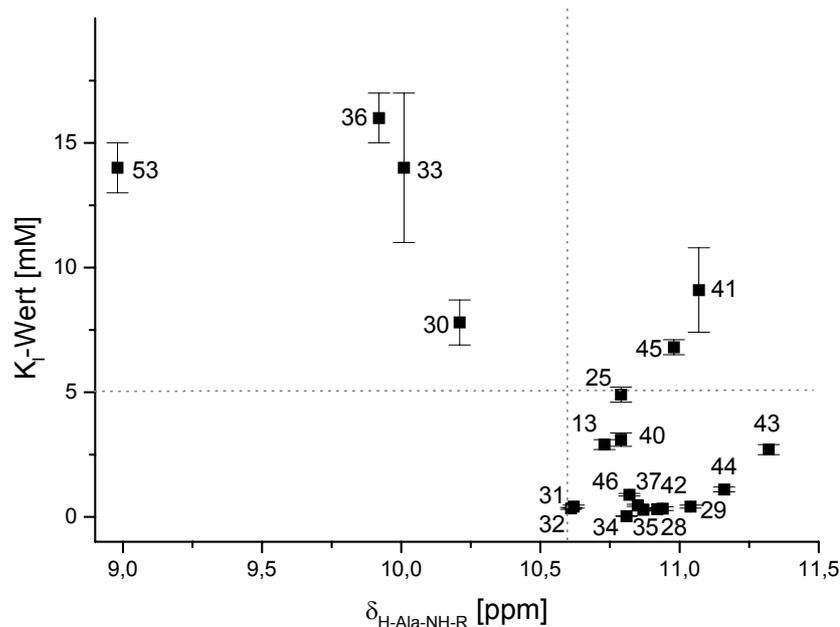
**Tab. 11** Gegenüberstellung von  $K_1$ -Werten und elektronischen Substituentenkonstanten für ausgewählte Verbindungen

Nr.	Substituent	$K_1$ [mM]	$\sigma_{\text{para}}$	$F$
<b>23</b>	-NO <sub>2</sub>	0,08 ± 0,01	0,78	<b>0,67</b>
<b>37</b>	-F	0,46 ± 0,04	0,06	<b>0,43</b>
<b>28</b>	-Cl	0,33 ± 0,07	0,23	<b>0,41</b>
<b>44</b>	-COOMe	1,1 ± 0,1	0,45	<b>0,33</b>
<b>34</b>	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	0,03 ± 0,003	-0,01	<b>0,08</b>
<b>13</b>	-H	2,9 ± 0,2	0	<b>0</b>
<b>31</b>	-CH <sub>3</sub>	0,34 ± 0,04	-0,17	<b>-0,04</b>
<b>41</b>	-COO <sup>-</sup>	9,1 ± 1,7	0	<b>-0,15</b>

Sowohl die *HAMMETT*-Konstante  $\sigma$  als auch der elektronische Feldparameter  $F$  sind ein Maß für die elektronenziehende Wirkung von Substituenten relativ zum Wasserstoff, dem der Wert 0 zugeordnet wurde. Hohe positive Werte der Substituentenkonstanten treten bei elektronenziehenden Substituenten, wie -NO<sub>2</sub>, -F und -Cl auf. Demzufolge sollten die Parameter auch ein Maß für die Stärke der Polarisierbarkeit der Säureamidbindung durch die Substituenten sein.

In Tab. 11 sind einige  $K_1$ -Werte von *para*-substituierten Arylamiden den *Swain-Lupton*-Konstanten der Substituenten gegenübergestellt. Tendenziell sollten hohe positive  $F$ -Werte niedrigere  $K_1$ -Werten beinhalten. Es konnte aber weder bei den *para*-Substituenten noch bei den entsprechenden *meta*-Verbindungen eine Korrelation festgestellt werden. Auch eine von JAFFÉ <sup>[87]</sup> beschriebene Abhängigkeit, wodurch sich bei Mehrfachsubstitutionen die Substituenteneinflüsse nahezu additiv verhalten, kann hier nicht die vergleichbaren  $K_1$ -Werte von H-Ala-anilid (**21**) und H-Ala-*penta*-fluoranilid (**40**) erklären.

Eine geeignete Methode zur Untersuchung der Polarisierung der -NH- Gruppe durch die mesomeren und induktiven Effekte der verschiedenen Substituenten (-F; -Cl; -NO<sub>2</sub>; -Phenyl; -COOH) am Arylsystem ist mit der NMR-Spektroskopie gegeben. Unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen wurde die <sup>1</sup>H-Verschiebung des Säureamidprotons bestimmt und den K<sub>I</sub>-Werten der Verbindungen gegenübergestellt. ( $\delta_{\text{-NH-}}$  Werte: siehe Anhang)



**Abb. 9** Graphische Gegenüberstellung von K<sub>I</sub>-Werte und  $\delta_{\text{-NH-}}$ -Verschiebung (Probeneinwaage: 5 mg; Lösungsmittel: DMSO; Meßtemperatur: 300 K; die Zahlen entsprechen der laufenden Substanznumerierung im Text)

Die graphische Gegenüberstellung von K<sub>I</sub>- und  $\delta_{\text{-NH-}}$ -Wert zeigt, daß alle Verbindungen mit guten Inhibierungskonstanten in einem engen Bereich angesiedelt sind, d.h. überschreitet die  $\delta_{\text{-NH-}}$  Verschiebung den Wert von 10,6 ppm, so kann man von einer guten Affinität des Substrates ausgehen. Dem gegenüber sind Verbindungen mit hohen K<sub>I</sub>-Werten (**30,33,36,53**) im entgegengesetzten Wertebereich zu finden.

Ausnahmen stellen die Verbindungen H-Ala-*p*-benzoesäureamid (**41**) und H-Ala-*m*-benzoesäuremethylesteramid (**45**) dar. Trotzdem beide Derivate einen hohen K<sub>I</sub>-Wert besitzen, sind ihre <sup>1</sup>H-Verschiebungen in dem oben angegebenen Bereich zu finden. Eine Ursache hierfür könnte in der Ausbildung von intra- und intermolekularen Wasserstoffbrücken zu suchen sein, die eine starke Verschiebung des Signals zu tiefem Feld bewirken. <sup>[88]</sup>

Ein Nachteil der Kompensationsexperimente ist, daß die Verdrängung des radioaktiv markierten Referenzsubstrates [ $^{14}\text{C}$ ]Gly-Sar durch die unmarkierten Derivate vom Transportprotein kein Beweis für einen tatsächlichen Transport in die Zelle darstellt. Die ermittelten Affinitäten lassen lediglich den Schluß zu, daß eine Interaktion mit PEPT1 stattfindet.

Da der Peptidtransport als Folge des gleichzeitigen Protonentransports durch die Membran elektrogen ist, erzeugt die Protonen-gekoppelte Substrat(Peptid)aufnahme einen nach innen gerichteten Stromfluß, der mittels *voltage-clamp*-Technik meßbar ist. Durch die Kopplung des Transports an Protonen fällt bei der Substrataufnahme der intrazelluläre pH-Wert ab. <sup>[29]</sup>

In der erstmals von MIYAMOTO et al. <sup>[89]</sup> beschriebenen Methode wurde in eine *Xenopus leavis* Eizelle die (m)RNA des isolierten Transportproteins aus dem Darm eines Kaninchen injiziert, worauf die Oocyte wenig später den Peptidtransporter an der Oberfläche exprimiert. Umfassende Übersichtsartikel zur Methodik sind bei FEI et al. <sup>[31]</sup>, BOLL et al. <sup>[90]</sup>, SAITO et al. <sup>[91]</sup> und TAMAI et al. <sup>[92]</sup> zu finden.

Um mögliche Nebeneffekte (z.B. Diffusion) bei den Uptake-Versuchen auszuschließen und um die tatsächliche Translokation der Aminosäurederivate zu beweisen, wurden ausgewählte Verbindungen mit dem Oocyten-Modell vermessen.

**Tab. 12**  $K_I$ -Werte aus Caco-2 und Oocyt-Testung

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM] (Caco-2)	$K_I$ [mM] (Oocyte)
<b>21</b>	H-Ala-anilid	$2,9 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,7$
<b>23</b>	H-Ala- <i>p</i> -nitroanilid	$0,08 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,05$
<b>31</b>	H-Ala- <i>p</i> -methylanilid	$0,34 \pm 0,04$	$0,84 \pm 0,55$

Die gute Korrelation der mit den unterschiedlichen Systemen ermittelten  $K_I$ -Werte bestätigt einmal mehr, daß die Caco-2 Zelllinie eine geeignete Methode zur Bestimmung von Affinitäten zu PEPT1 darstellt.

Des weiteren wurde mit dem *Xenopus leavis* Oocyten-Modell der Beweis angetreten, daß zumindest diese 3 Aminosäurederivate **21**, **23** und **31** ebenso wie natürliche Di- und Tripeptide vom Oligopeptidtransporter PEPT1 in die Zelle transportiert werden.

Die Oocyten-Testungen wurden freundlicherweise am Medical College of Georgia (Augusta, USA), unter der Leitung von Prof. F.H. Leibach, durchgeführt.

### 4.1.2 Dipeptide

Alle untersuchten Dipeptide erwiesen sich erwartungsgemäß als Substrate des intestinalen Peptidsymporters. Die bestimmten  $K_I$ -Werte für diese Verbindungen bewegen sich zum größten Teil in einem Bereich von 0,08 bis 0,35 mM. Ausnahmen bilden Dipeptide mit den Iminosäuren Sarkosin (**69,70**) oder Prolin (**71,72**) in N-terminaler Stellung, sowie Dipeptide mit polar geladenen Aminosäureseitenketten (**73,74**).

**Tab. 13**  $K_I$ -Werte ausgewählter Dipeptide ( <sup>#</sup> Werte aus [93]; <sup>##</sup> Werte aus [94])

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
<b>58</b>	H-Ala-Ala-OH	0,08 ± 0,01
<b>59</b>	H-Phe-Phe-OH <sup>#</sup>	0,11 ± 0,01
<b>60</b>	H-Ala-Glu-OH	0,32 ± 0,01
<b>61</b>	H-Ala-Asp-OH <sup>#</sup>	0,26 ± 0,02
<b>62</b>	H-Ala-Lys-OH <sup>#</sup>	0,21 ± 0,02
<b>63</b>	H-Ala-Nle-OH	0,09 ± 0,01
<b>17</b>	H-Ala-Pro-OH	0,11 ± 0,01
<b>64</b>	H-Asp-Ala-OH	0,32 ± 0,02
<b>65</b>	H-Lys-Ala-OH * 2HBr <sup>#</sup>	0,34 ± 0,08
<b>66</b>	H-Nle-Ala-OH	0,14 ± 0,01
<b>67</b>	H-Gly-Sar-OH	0,83 ± 0,04
<b>68</b>	H-Ala-Sar-OH <sup>#</sup>	0,25 ± 0,01
<b>69</b>	H-Sar-Sar-OH <sup>#</sup>	> 30
<b>70</b>	H-Sar-Pro-OH <sup>##</sup>	2,5 ± 0,1
<b>71</b>	H-Pro-Ala-OH <sup>#</sup>	9,5 ± 0,4
<b>72</b>	H-Pro-Lys-OH <sup>#</sup>	3,3 ± 0,5
<b>73</b>	H-Lys-Glu-OH <sup>#</sup>	1,3 ± 0,1
<b>74</b>	H-Asp-Lys-OH <sup>#</sup>	0,86 ± 0,11

Die Substrateigenschaften der Dipeptide sind in gewissen Grenzen abhängig von der Stellung der Aminosäure (N- oder C-terminale Position) und der Struktur ihrer Seitenketten. Aminosäuren mit hydrophober Seitenkette in N-terminaler Position (**58,59**) zeigen gute Inhibierungskonstanten. Dipeptide mit einer polar geladenen Aminosäure in N- oder C-terminaler Stellung ergeben, im Vergleich zu H-Ala-Ala-OH, bis zu 4fach höhere  $K_I$ -Werte (**64,65**).

Wird die Ladung der funktionellen Gruppe in der Seitenkette unter Beibehaltung der übrigen Struktur entfernt (Austausch Lys gegen Nle und Asp gegen Ala), verbessern sich die Substrateigenschaften.

Wesentlich sensitiver reagiert der intestinale Peptidtransporter auf eine Änderung der Stereospezifität der Aminosäure in Dipeptiden. PEPT1 zeigt eine hohe Spezifität für L-Verbindungen. Dipeptide mit einer D-Aminosäure werden noch toleriert, in N-terminale Stellung besser als am C-Terminus. Liegen beide Aminosäuren in der D-Konfiguration vor, gehen die Substrateigenschaften verloren. Die ermittelten Werte korrelieren mit den Literaturbefunden. <sup>[41,95,96]</sup>

**Tab. 14**  $K_I$ -Werte ausgewählter Dipeptide mit D-Aminosäuren

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
58	H-Ala-Ala-OH	$0,08 \pm 0,01$
75	H-D-Ala-Ala-OH	$2,0 \pm 0,2$
76	H-Ala-D-Ala-OH	$4,2 \pm 0,2$
77	H-D-Ala-D-Ala-OH	> 30
62	H-Ala-Lys-OH	$0,21 \pm 0,02$
78	H-D-Ala-Lys-OH * HCl	$6,9 \pm 0,6$
79	H-Ala-D-Lys-OH * HCl	> 30
80	H-D-Ala-D-Lys-OH * HCl	> 30

### 4.1.3 Einfluß von Schutzgruppen

#### 4.1.3.1 Blockierung des N-Terminus

Die  $\alpha$ -Aminogruppe scheint für die Substraterkennung von zentraler Bedeutung zu sein. Ihre Blockierung führt zu einer deutlich herabgesetzten Affinität. Andererseits wird in einer Studie von BAI et al. <sup>[97]</sup> darauf hingewiesen, daß N-geschützte Aminosäurederivate (Phenylacetylprolin, N-Benzoylprolin, Hippursäure) von PEPT1 akzeptiert und transportiert werden. Diese Aussage konnte von uns im Falle von Z-Lys-OH (**83**) bestätigt werden. Die mit einer Acetyl-Schutzgruppe versehene Verbindung Ac-Phe-NH<sub>2</sub> (**81**) weist hingegen keine Affinität zu PEPT1 auf.

Tab. 15  $K_I$ -Werte N-geschützter Aminosäuren und Dipeptide

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
81	Ac-Phe-NH <sub>2</sub>	> 30
82	H-Lys-OH	> 30
83	Z-Lys-OH	6,8 ± 1,2
58	H-Ala-Ala-OH	0,08 ± 0,01
84	Z-Ala-Ala-OH	5,6 ± 0,3
85	Boc-Ala-Ala-OH	> 30
86	Ac-Ala-Ala-OH	> 30
62	H-Ala-Lys-OH	0,21 ± 0,02
87	Z-Ala-Lys-OH	5,3 ± 0,3
88	Boc-Ala-Lys-OH	25 ± 3
65	H-Lys-Ala-OH * 2HBr	0,34 ± 0,08
89	Z-Lys-Ala-OH * HCOOH	2,3 ± 0,1
90	Boc-Lys-Ala-OH	> 30
91	Ac-Lys-Ala-OH * HCl	6,4 ± 0,3

Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Blockierung des N-Terminus zu einer signifikanten Abnahme der Affinität gegenüber den freien Dipeptiden führt. Die Abnahme ist abhängig von der jeweiligen Schutzgruppe. <sup>[10,98]</sup> Während die Blockierung mit dem Benzyloxycarbonyl-Rest (Z) im allgemeinen noch toleriert wird, liegen die Inhibierungskonstanten für die Boc-geschützten Dipeptide weitaus höher. Das aromatische System der Z-Schutzgruppe könnte sich möglicherweise positiv auf die Interaktion mit PEPT1 auswirken. Das würde auch die von BAI et al. <sup>[97]</sup> beschriebene Akzeptanz der o.g. N-geschützten Aminosäurederivate erklären, die ebenfalls diese Strukturmerkmale aufweisen.

Völlig widersprüchlich sind hingegen die Resultate bezüglich der Blockierung mit der Acetyl-Schutzgruppe. Während der N-terminale Einbau bei Verbindung **91** noch toleriert wird, geht die Affinität gegenüber PEPT1 bei Ac-Ala-Ala-OH (**86**) völlig verloren. Es ist anzunehmen, daß die freie Seitenkette des Lysins hier einen signifikanten Einfluß auf die Substraterkennung besitzt. Die freie N<sup>ε</sup>-Amino-Gruppe besitzt hier möglicherweise eine ähnliche Funktion wie die α-Aminogruppe in neutralen Dipeptiden.

#### 4.1.3.2 Blockierung des C-Terminus

Auch die Blockierung des C-Terminus von Dipeptiden führt zu einer Abnahme der Affinität gegenüber PEPT1. Wie in Tab. 16 deutlich ersichtlich ist, treten allerdings erhebliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Typus der Blockierung auf.

**Tab. 16**  $K_I$ -Werte von Dipeptidestern und -amiden

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
58	H-Ala-Ala-OH	$0,08 \pm 0,01$
92	H-Ala-Ala-OMe * HCl	$2,1 \pm 0,2$
93	H-Ala-Ala-OBu	$3,1 \pm 0,3$
94	H-Ala-Ala-OBzl * HCOOH	$0,22 \pm 0,01$
95	H-Ala-Ala-ONB * HCl	$0,42 \pm 0,06$
96	H-Ala-Ala-NH <sub>2</sub> * HCl	$2,7 \pm 0,4$
97	H-Ala-Ala-NH-CH <sub>3</sub> * HCl	> 30
98	H-Ala-Ala-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	$25 \pm 2$
99	H-Ala-Ala-anilid * HCl	$7,7 \pm 0,8$
65	H-Lys-Ala-OH * 2HBr	$0,34 \pm 0,08$
100	H-Lys-Ala-OMe	$4,1 \pm 0,3$
101	H-Lys-Ala-NH <sub>2</sub> * 2HCl	$6,3 \pm 0,3$

Gut akzeptiert werden Blockierungen in Form von Alkyl- und Arylestern, wobei die Alkylester-Derivate (**92,93**) bis zu 10-fach höhere Inhibierungskonstanten aufweisen als die Arylester-Verbindungen (**94,95**).

Diese Verbindungen zeichnen sich allerdings durch eine geringe Stabilität gegenüber den auf der Oberfläche von Caco-2 Zellen lokalisierten Esterasen aus. Eine Stabilitätsuntersuchung (vgl. 4.4) von Verbindung **94** ergab, daß die Verbindung auf der Zelloberfläche bereits nach 10 Minuten zu 70 % abgebaut ist. Es ist daher anzunehmen, daß ein Teil als ungeschütztes Dipeptid (H-Ala-Ala-OH) vorliegt und es zu einer Verfälschung des  $K_I$ -Wertes kommt.

Die Blockierung des C-Terminus durch Amidstrukturen führt zu unterschiedlichen Ergebnissen. Interessanterweise besitzt hier das H-Ala-Ala-amid (**96**) den kleinsten  $K_I$ -Wert. Im Gegensatz zu den Aminosäureamiden geht hier mit der Einführung eines Arylamidsystems (**99**) eine Verminderung der Affinität einher. Dipeptidamide mit aliphatischen Resten (**97,98**) sind keine Substrate.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß für den Dipeptidtransport durch PEPT1 ein freier C-Terminus des Peptids vorhanden sein sollte.

#### 4.1.3.3 Blockierung von Seitenketten

Die Blockierung der Seitenkettenfunktionen von trifunktionellen Aminosäuren bei Dipeptiden hat sich in vielen Fällen positiv auf die Affinität zum Transportprotein ausgewirkt. Besonders die Einführung der Z-Schutzgruppe bei basischen Aminosäuren hat sich als vorteilhaft erwiesen.

**Tab. 17**  $K_I$ -Werte von H-Lys-Ala-OH-Derivaten mit unterschiedlichem Seitenkettenschutz

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
65	H-Lys-Ala-OH * 2HBr	$0,34 \pm 0,08$
102	H-Lys(Z)-Ala-OH * HCl	$0,11 \pm 0,01$
103	H-Lys(Boc)-Ala-OH	$0,56 \pm 0,02$
104	H-Lys(Ac)-Ala-OH * HCl	$0,26 \pm 0,01$
105	H-Lys(biotinyl)-Ala-OH * HCl	$1,1 \pm 0,1$

Wie aus Tab. 17 ersichtlich ist, sind die Unterschiede in den  $K_I$ -Werten allerdings nicht so groß, daß man den untersuchten seitenkettenständigen Schutzgruppen (Boc-, Ac-, Z-) den entscheidenden Einfluß auf die Substraterkennung zusprechen kann. Möglicherweise ist die Erhöhung der Hydrophobizität als Ursache für die guten  $K_I$ -Werte anzusehen. Für die Substraterkennung hat die Art der Schutzgruppe demzufolge eine untergeordnete Bedeutung.

Keinen Einfluß auf die Affinität gegenüber PEPT1 hat die Position der seitenkettengeschützten Aminosäure im Dipeptid. Sowohl ihre N- als auch C-terminale Position werden gleich gut toleriert.

Es kann auch kein Unterschied in der Affinität bezüglich der Art der Bindung der Schutzgruppe an die Seitenkettenfunktion festgestellt werden. Eine Ester-Bindung wird wie im Falle von H-Asp(OBzl)-Ala-OH (**108**) ebenso gut toleriert, wie die Ether-Bindung bei den Serin-Dipeptiden (**109,110**) oder der bei Lysin-Peptidderivaten beschriebenen Amid-Bindung (**102,106**). (vgl. Tab. 18)

**Tab. 18**  $K_I$ -Werte von seitenkettengeschützten Dipeptiden

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
<b>106</b>	H-Ala-Lys(Z)-OH * HCOOH	$0,18 \pm 0,01$
<b>102</b>	H-Lys(Z)-Ala-OH * HCl	$0,11 \pm 0,01$
<b>107</b>	H-Ala-Asp(OBzl)-OH * HCl	$0,11 \pm 0,01$
<b>108</b>	H-Asp(OBzl)-Ala-OH * HCl	$0,09 \pm 0,01$
<b>109</b>	H-Ala-Ser(Bzl)-OH * HCl	$0,11 \pm 0,01$
<b>110</b>	H-Ser(Bzl)-Ala-OH * HCl	$0,09 \pm 0,01$

In der Literatur wird mehrfach darauf hingewiesen, daß sich der Einbau von D-Aminosäuren in Dipeptide negativ auf die Affinität gegenüber PEPT1 auswirkt. Wie bereits erwähnt wird die D-Aminosäure in N-terminaler Stellung besser akzeptiert als in C-terminaler Position. Substrate, die nur aus D-Aminosäuren aufgebaut sind, werden vom Transporter nicht erkannt und transportiert. [95,96,99]

**Tab. 19**  $K_I$ -Werte von seitenkettengeschützten Dipeptiden mit D-Aminosäuren

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
<b>106</b>	H-Ala-Lys(Z)-OH * HCOOH	$0,18 \pm 0,01$
<b>111</b>	H-D-Ala-Lys(Z)-OH * HCl	$2,3 \pm 0,1$
<b>112</b>	H-Ala-D-Lys(Z)-OH * HCOOH	$2,4 \pm 0,1$
<b>113</b>	H-D-Ala-D-Lys(Z)-OH * HCOOH	$5,5 \pm 0,6$
<b>102</b>	H-Lys(Z)-Ala-OH * HCl	$0,11 \pm 0,01$
<b>114</b>	H-D-Lys(Z)-Ala-OH * HCOOH	$> 10^+$
<b>115</b>	H-Lys(Z)-D-Ala-OH * HCl	$27 \pm 4$

(+ Löslichkeitsproblem; Messung bei max. Konzentration)

Durch den Seitenkettenschutz ist allerdings auch eine Möglichkeit gegeben, die Affinität solcher DD-Derivate (Diastereomere) gegenüber dem Transportprotein zu erhöhen.

Der C-terminale Einbau von Lys(Z) bzw. D-Lys(Z) hat zur Folge, daß kaum noch Unterschiede in den  $K_I$ -Werten der verschiedenen Diastereomere auftreten. Ein Vergleich der Substanzen **111** und **112** zeigt, daß durch die N<sup>ε</sup>-Z-Schutzgruppe im Lysinmolekül die Position der D-Aminosäure weniger von Bedeutung ist. Mit H-D-Ala-D-Lys(Z)-OH (**113**)

konnte von uns erstmals ein Substrat beschrieben werden, daß trotz seiner DD-Konfiguration von PEPT1 erkannt wird. <sup>[100]</sup>

Dieser Befund deutet aber gleichzeitig darauf hin, daß auch andere Möglichkeiten der Substraterkennung in die Betrachtung mit einbezogen werden müsse. Möglicherweise übernimmt hier die Z-geschützte Seitenkette des Lysins die Funktion einer Z-geschützten  $\alpha$ -Aminogruppe, so daß ein ähnliches Substraterkennungsmuster wie bei den von BAI et al. <sup>[97]</sup> beschriebenen Aminosäurederivaten abläuft.

Auffallend ist, daß der N-terminale Einbau von Lys(Z) (**115**) und D-Lys(Z) (**114**) zu Substraten führt, die keine Affinität gegenüber PEPT1 aufweisen. Möglicherweise besitzt das N-terminale Ende von Substraten einen größeren Einfluß für die Interaktion als der C-Terminus.

#### 4.1.4 Einbau von $\omega$ -Aminocarbonsäuren

Untersuchungen zum Einfluß der Position der N-terminalen Aminogruppe und der C-terminalen Carboxylgruppe durch den Einbau von  $\omega$ -Aminocarbonsäuren in N- bzw. C-terminaler Position zeigen, daß zur Erzielung einer hohen Affinität des Dipeptids die N-terminale Aminogruppe nicht nur frei und protoniert, sondern auch in der  $\alpha$ -Position lokalisiert sein muß.

**Tab. 20**  $K_I$ -Werte von Dipeptiden mit N-terminalen  $\omega$ -Aminocarbonsäuren

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
<b>116</b>	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CO-Ala-OH	0,38 ± 0,02
<b>117</b>	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-Ala-OH	4,8 ± 0,3
<b>118</b>	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-Gly-OH	7,2 ± 1,2
<b>119</b>	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CO-Ala-OH * HCl	24 ± 1
<b>120</b>	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ala-OH * HCOOH	7,7 ± 0,7
<b>121</b>	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CO-Ala-OH * HCl	7,9 ± 0,6
<b>122</b>	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CO-Ala-OH * HCl	> 30
<b>123</b>	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CO-Ala-OH * HCl	26 ± 2
<b>124</b>	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CO-Gly-OH * HCl	29 ± 2
<b>125</b>	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -CO-Ala-OH * HCOOH	n. m.

Die Verlängerung des Peptidrückgrads am N-terminalen Ende, durch den Einbau von  $\beta$ -Alanin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Abu), Aminopentan- (Apt), -hexan- (Ahx), -heptan- (Ahp) und

-oktansäure (Aoc) führen zu einer Reduzierung der Affinität gegenüber PEPT1. Interessant ist hingegen die bedingte Affinität der beiden Substrate H- $\delta$ -Apt-Ala-OH (**120**) und H- $\epsilon$ -Ahx-Ala-OH (**121**), im Vergleich zu H- $\gamma$ -Abu-Ala-OH (**119**). Die Struktur der Verbindungen **120** und **121** ähnelt natürlichen Tripeptiden. Die Aminogruppe der  $\delta$ -Aminopentan- bzw.  $\epsilon$ -Aminohexansäure übernimmt hier die Funktion des N-Terminus eines „Tripeptids“, während die Carboxylgruppe des Alanins das natürliche Ende der Tripeptidstruktur bildet.

**Tab. 21**  $K_I$ -Werte von Dipeptiden mit C-terminaler  $\omega$ -Aminocarbonsäuren

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
<b>126</b>	H-Ala-NH-CH(CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> )-COOH	0,07 ± 0,01
<b>127</b>	H-Ala-NH-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -COOH	1,1 ± 0,1
<b>128</b>	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -COOH	0,14 ± 0,01
<b>129</b>	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH	2,7 ± 0,1
<b>130</b>	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COOH	0,39 ± 0,02
<b>131</b>	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH	0,27 ± 0,02
<b>132</b>	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -COOH * HCl	0,54 ± 0,02
<b>133</b>	H <sub>3</sub> C-NH-CH(CH <sub>3</sub> )-CO-Ala-OH	1,8 ± 0,1
<b>134</b>	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> * 2 HCl	> 30

Dagegen wird vom Peptidsympporter die C-terminale Verlängerung des *backbons* durch  $\omega$ -Aminocarbonsäuren gut akzeptiert. Die Verlängerung mit bis zu 10 C-Atomen stellt kein Problem dar. Einzige Ausnahme in dieser Reihe ist das Alanyl- $\beta$ -Alanin (**129**). Wird das Dipeptidrückgrad um eine CH<sub>2</sub>-Gruppe verlängert ( $\beta$ -ständige Carboxylgruppe), so resultiert daraus, im Vergleich zu H-Ala-Ala-OH, ein über 30fach schlechterer  $K_I$ -Wert. Hier scheint der Abstand zwischen N-terminaler Aminogruppe und C-terminaler Carboxylgruppe einen kritischen Bereich zu tangieren.

In einer Studie von DÖRING et al. <sup>[54]</sup> wurde beschrieben, daß freie  $\omega$ -Amino-carbonsäuren sowohl am Oocyten- als auch am *Pichia pastoris*-Testsystem <sup>[101]</sup> durch PEPT1 transportiert werden. Diese Ergebnisse konnten mit dem Caco-2 System nicht bestätigt werden. Obwohl, wie im Fall der 6-Aminohexansäure, die Messung ebenfalls bei einem pH-Wert von 7.0 durchgeführt wurden, zeigte Verbindung **135** keine Affinität gegenüber PEPT1.

(vgl. Tab. 22)

**Tab. 22**  $K_I$ -Werte von  $\omega$ -Aminocarbonsäuren (# Werte aus DÖRING *et al.* [54])

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]	$EC_{50}$ [mM] #
135	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH	> 30	-
135	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH *	> 30	0,73 ± 0,07
136	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	7,9 ± 0,6	0,30 ± 0,04
	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -COOH	-	0,58 ± 0,03
137	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -COOH	> 10 <sup>+</sup>	-

(\* Messung bei pH 7.0; + Löslichkeitsproblem; Messung bei max. Konzentration)

Die Ursachen für diese erheblichen Affinitätsunterschiede bleiben ungeklärt. Wie von uns gezeigt wurde, korrelieren die  $K_I$ -Werte von Caco-2 Kompensationsexperimenten für andere Verbindungen und der Oocyten-Testung gut miteinander. [78] Ein Uptake-Experiment mit der ebenfalls bei DÖRING *et al.* [54] erwähnten  $\delta$ -Aminolävulinsäure, erbrachte vergleichbare  $K_I$ -Werte (persönliche Mitteilung M. Brandsch und F. Hirche), so daß experimentelle Fehler ausgeschlossen werden können.

Die Ausnahme in dieser Reihe ist die 8-Aminooctansäure (**136**). Die Akzeptanz ist wahrscheinlich auf die tripeptidähnliche Größe zurückzuführen. Unverständlich bleibt, warum nicht auch die 6-Aminohexansäure als solche transportiert wird, da der Abstand zwischen N- und C-Terminus mit einem Dipeptid vergleichbar ist.

Ebenfalls keine Affinitäten zu PEPT1 weisen Dipeptide auf die aus 2  $\omega$ -Aminocarbonsäuren bestehen (**139,140**). Das H-Gly-Gly-OH (**138**) besitzt einen  $K_I$ -Wert von 1 mM und stellt damit in der Reihe der natürlichen Dipeptide ein schlecht akzeptiertes Substrat dar. Werden die Carboxylgruppe und die  $\alpha$ -Aminosäurefunktion noch weiter voneinander entfernt (**127,128**) geht die Affinität verloren, d.h. das Vorhandensein einer Peptidbindung (Amidbindung) reicht für die Substraterkennung nicht aus.

**Tab. 23**  $K_I$ -Werte von H-Gly-Gly-OH, H- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala-OH und H-Ahx-Ahx-OH

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
138	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CO-NH-CH <sub>2</sub> -COOH	1 ± 0,1
139	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH	> 30
140	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CO-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH * HCOOH	> 30

#### 4.1.5 Isopeptidbindung

Dipeptide, die über eine partielle oder klassische Isopeptidbindung miteinander verknüpft sind werden von PEPT1 nicht akzeptiert. (Tab. 24)

**Tab. 24**  $K_I$ -Werte von Dipeptiden mit Isopeptidbindung (# Werte aus [93])

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
141	H-Glu-Ala-OH #	$0,25 \pm 0,02$
142	H- $\gamma$ -Glu-Ala-OH #	> 30
143	H-Glu-Lys-OH #	$0,51 \pm 0,05$
144	H- $\gamma$ -Glu-N <sup>ε</sup> -Lys-OH #	> 10
62	H-Ala-Lys-OH	$0,21 \pm 0,02$
145	H-Ala-N <sup>ε</sup> -Lys-OH #	> 10
146	H-Ala-N <sup>ε</sup> -Z-Lys-OH * HCOOH	$2,7 \pm 0,2$
147	Z-Ala-N <sup>ε</sup> -Lys-OH * HCOOH	unlöslich
148	H-Ala-N <sup>ε</sup> -D-Lys-OH * HCl #	> 10
149	H-D-Ala-N <sup>ε</sup> -Lys-OH * HCl	> 10

Die Verknüpfung der Aminosäuren über eine Isopeptidbindung hat zwei grundlegende strukturelle Veränderungen gegenüber  $\alpha$ -Dipeptiden zur Folge:

1. der Abstand zwischen N- und C-Terminus ändert sich drastisch,
2. im Molekül liegt keine  $\alpha$ -Peptidbindung vor.

Beide Effekte für sich genommen stellen für die Substraterkennung kein Hindernis dar. Eine Verlängerung des Peptidrückgrades (vgl. C-terminaler Einbau von  $\omega$ -Aminocarbonsäuren) wird vom Transporter ebenso gut toleriert, wie Modifikationen der Peptidbindung (Ketomethylen-<sup>[37]</sup>, Thioxo-<sup>[83]</sup>). Daraus kann geschlußfolgert werden, daß in Substraten in denen keine  $\alpha$ -Peptidbindung vorliegt, der Abstand zwischen N- und C-Terminus das entscheidende Kriterium für die Interaktion mit PEPT1 ist.

Zu berücksichtigen ist ebenfalls, daß durch die Isopeptidbindung / partielle Isopeptidbindung die Seitenkettenladung der trifunktionellen Aminosäure aufgehoben wird. Diese scheint partiell einen Einfluß auf die Substraterkennung zu besitzen. (vgl. 4.1.5)

Die gute Akzeptanz der Verbindung **146** läßt sich mit der erhöhten Hydrophobizität erklären.

#### 4.1.6 Backbone- und Seitenkettencyclisierung

Ebenso wie die partielle oder klassische Isopeptidbindung ein Strukturelement darstellt, das von PEPT1 nicht akzeptiert wird, sind die durch *backbone* Cyclisierung (N- und C-Terminus) von Dipeptiden erhaltenen Dioxopiperazine keine Substrate des intestinalen Peptidtransporters.

**Tab. 25**  $K_I$ -Werte von cyclischer Dipeptide (# Werte aus [93])

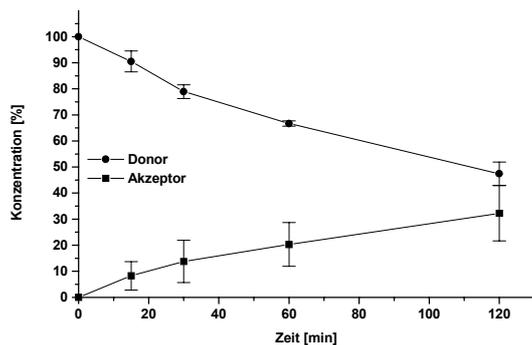
Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
150	H-Lys-Glu-OH <sup>#</sup>	1,3 ± 0,1
151	$\square$ -Lys-Glu- $\square$ * AcOH <sup>#</sup>	> 30
152	$\square$ -Lys-Ala- $\square$	5,4 ± 0,4
153	$\square$ -Gly-Phe- $\square$ <sup>#</sup>	> 30
154	$\square$ -Gly-Pro- $\square$	> 30
155	$\square$ -Glu-Glu- $\square$ <sup>#</sup>	> 10
156	$\square$ -Lys(Z)-Sar- $\square$	> 30

Erste Untersuchungen mit Dioxopiperazinen wurden von HIDALGO et al.<sup>[102]</sup> durchgeführt. Dabei zeigt sich, daß der mit der Cyclisierung verbundene Verlust der freien Amino- und Carboxylgruppe mit dem Verlust der Affinität einhergeht. Allerdings wurde *cyclo(-Asp-Asp-)* als Substrate für PEPT1 beschrieben. Die Revidierung dieses Ergebnisses erfolgt kurze Zeit später durch TAMURA et al.<sup>[103]</sup> Durch Transwell<sup>®</sup>-Experimente konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Art der Substratladung einen Einfluß für die Erkennung besitzt. Das neutrale *cyclo(-Ala-Ala-)* und das negativ geladene *cyclo(-Asp-Asp-)* sind keine Substrate des PEPT1, wohingegen das positiv geladene *cyclo(-Lys-Ala-)* bedingt als Substrat für PEPT1 beschrieben wurde. Die Einschränkung ergibt sich daraus, das diese Verbindung nur teilweise über den Carrier in das Zellinnere gelangt. Einen weitaus höheren Anteil hat die passive Diffusion über den parazellulären Weg. Im Widerspruch dazu zeigt MIZUMA et al.<sup>[104]</sup> am isolierten Rattendarm, daß der Transport des neutralen *cyclo(-Gly-Phe-)* hauptsächlich über den Oligopeptidtransporter und weniger über die passive Diffusion erfolgt.

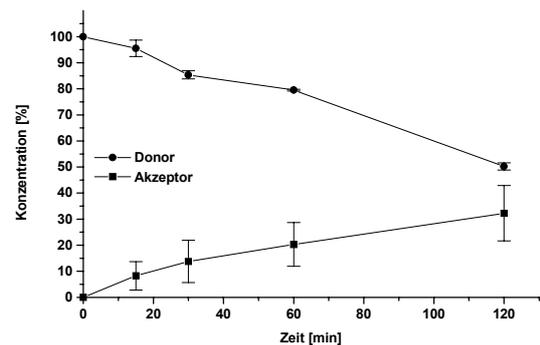
Die Affinität von *cyclo*(-Lys-Ala-) könnte auch ein Beweis dafür sein, daß die N<sup>ε</sup>-Amino-  
gruppe von PEPT1 erkannt wird.

Zur Aufklärung dieser Diskrepanz sollte durch ein Transwell<sup>®</sup>-Experiment geklärt werden, ob  
*cyclo*(-Lys-Ala-) aktiv die Monolayermembran passiert. Unter dieser Voraussetzung muß die  
Transportrate durch ein anderes Substrat beeinflussbar sein. Als Konkurrenzsubstrat wurde das  
abbaustabile H-Phe-Sar-OH (K<sub>I</sub>-Wert: 0,21 ± 0,01 mM; persönliche Mitteilung I. Knütter)  
ausgewählt.

Die Auswertung der Ergebnisse ergaben jedoch ein sehr widersprüchliches Bild.



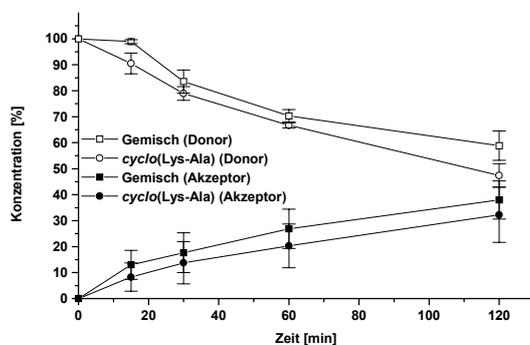
**Abb. 10** Vergleich der Konzentrationsänderungen  
von *cyclo*(-Lys-Ala-)



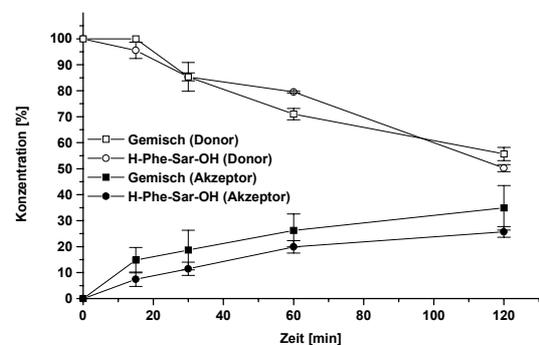
**Abb. 11** Vergleich der Konzentrationsänderungen  
von H-Phe-Sar-OH

In den Abbildungen 10 und 11 sind die Abnahme der Substratkonzentration auf der  
Donorseite und die Zunahme in der Akzeptorseite der Kammer dargestellt. Beide Substrate  
wurden dem Transporter in einer Konzentration von 1 mM angeboten. Es zeigt sich  
allerdings, daß sich die Konzentrationen auf der Akzeptorseite von *cyclo*(-Lys-Ala-) (32,2 %) und  
H-Phe-Sar-OH (25,6 %) nach 120 Minuten kaum voneinander unterscheiden, obwohl das  
Dioxopiperazin einen wesentlich höheren K<sub>I</sub>-Wert besitzt.

Ein noch deutlicheres Bild ergibt sich aus der Gegenüberstellung der Konzentrations-  
änderungen der reinen Substanzen mit dem verwendeten Gemisch aus *cyclo*(Lys-Ala) (1mM)  
und H-Phe-Sar-OH (5mM).



**Abb. 12** Vergleich der Konzentrationsänderungen von  
*cyclo*(-Lys-Ala-) und dem Gemisch aus  
*cyclo*(-Lys-Ala-) [1mM] + H-Phe-Sar-OH [5mM]



**Abb. 13** Vergleich der Konzentrationsänderungen von  
H-Phe-Sar-OH und dem Gemisch aus  
*cyclo*(-Lys-Ala-) [1mM] + H-Phe-Sar-OH [5mM]

Entgegen der erwarteten Erniedrigung der Transportrate des Dioxopiperazins durch H-Phe-Sar-OH ist eine geringe Steigerung festzustellen. Unter der Voraussetzung, daß H-Phe-Sar-OH ein Substrat für PEPT1 ist, wäre *cyclo(-Lys-Ala-)* ebenfalls als ein Substrat anzusehen. Dem widerspricht allerdings, daß nach der Aufarbeitung und Analyse der Zellmembranen keine der beiden Verbindungen detektiert werden konnte und somit dem parazellulären Transport der Vorrang gegeben werden muß.

Die von TAMURA et al. <sup>[103]</sup> favorisierte Hypothese der passiven Diffusion von cyclischen Dipeptiden scheint durch diesen Versuch ihre Bestätigung zu finden. Von TERADA et al. <sup>[105]</sup> wurde kürzlich diese Hypothese bekräftigt.

Das geringe Inhibierungsvermögen der Dioxopiperazine ist sicherlich auf die Blockierung des N- und C-Terminus zurückzuführen. Darüber hinaus könnte die Konformationsrestriktion der backbonecyclisierten Dipeptide die Substratbindung einschränken. Dioxopiperazine besitzen eine *cis*-Konformation der Peptidbindung. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zur Konformationspezifität zeigen aber, daß PEPT1 nur Substrate erkennt und transportiert, die eine *trans*-Konformation aufweisen. <sup>[83,94]</sup>

## 4.2 Affinitäten verzweigter Peptide

Wie unter 4.1.3.3 angeführt, hat der Schutz der Seitenkettenfunktion in Dipeptiden mit trifunktionellen Aminosäuren einen positiven Einfluß auf die Substraterkennung. Inwiefern diese Eigenschaft für den Transport verzweigter Peptide genutzt werden kann, sollte in den folgenden Experimenten getestet werden. Mit Hinblick auf eine mögliche Wirkstofffixierung an der Seitenkettenfunktion und der Etablierung abbaustabiler Targetstrukturen wurde eine Reihe von Verbindungen mit den Dipeptiden H-Ala-Lys-OH und H-Lys-Ala-OH als Grundstruktur untersucht. An der Lysin-Seitenkettenfunktion wurden in einem ersten Schritt Z-geschützte Aminosäuren und Dipeptide kovalent gebunden.

**Tab 26**  $K_I$ -Werte verzweigter Tripeptide mit H-Lys-Ala-OH und H-Ala-Lys-OH als Target-Struktur

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
102	Z- $\square$ H-Lys-Ala-OH * HCl	0,11 $\pm$ 0,01
157	Z-Ala- $\square$ H-Lys-Ala-OH * TFA	0,12 $\pm$ 0,01

<b>106</b>	$\begin{array}{c} \text{Z-} \\ \text{H-Ala-Lys-OH} \end{array} * \text{HCOOH}$	$0,18 \pm 0,01$
<b>158</b>	$\begin{array}{c} \text{Z-Ala-} \\ \text{H-Ala-Lys-OH} \end{array} * \text{HCl}$	$0,51 \pm 0,07$

Wie in Tab. 26 ersichtlich besitzen diese Substrate alle gute  $K_I$ -Werte. Die Anknüpfung einer Aminosäure an die  $N^\epsilon$ -Funktion des Lysins wird von PEPT1 gut toleriert, bei Verbindung **157** besser als bei Verbindung **158**. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden Substanzen synthetisiert, die Z-geschützte oder freie Dipeptidstrukturen in der Seitenkette tragen unter Beibehaltung der Dipeptidgrundstruktur H-Lys-Ala-OH und H-Ala-Lys-OH.

**Tab. 27**  $K_I$ -Werte verzweigter Tetrapeptide mit H-Lys-Ala-OH und H-Ala-Lys-OH als Target-Struktur

<b>Nr.</b>	<b>Verbindung</b>	<b><math>K_I</math> [mM]</b>
<b>159</b>	$\begin{array}{c} \text{Z-Ala-Ala-} \\ \text{H-Ala-Lys-OH} \end{array} * \text{HCOOH}$	$0,42 \pm 0,04$
<b>160</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Ala-Ala-} \\ \text{H-Ala-Lys-OH} \end{array} * \text{TFA}$	$4,7 \pm 0,1$
<b>161</b>	$\begin{array}{c} \text{Z-Ala-Ala-} \\ \text{H-Lys-Ala-OH} \end{array} * \text{HCOOH}$	$0,18 \pm 0,01$
<b>162</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Ala-Ala-} \\ \text{H-Lys-Ala-OH} \end{array} * \text{TFA}$	$4,7 \pm 0,1$
<b>163</b>	$\begin{array}{c} \text{Z-D-Ala-Ala-} \\ \text{H-Lys-Ala-OH} \end{array} * \text{HCOOH}$	$0,97 \pm 0,05$
<b>164</b>	$\begin{array}{c} \text{Z-Ala-D-Ala-} \\ \text{H-Lys-Ala-OH} \end{array} * \text{HCOOH}$	$0,55 \pm 0,05$
<b>165</b>	$\begin{array}{c} \text{Z-D-Ala-D-Ala-} \\ \text{H-Lys-Ala-OH} \end{array} * \text{HCOOH}$	$0,41 \pm 0,05$

Die ermittelten Affinitäten und die daraus resultierenden Inhibierungskonstanten weisen die in den Seitenketten geschützten Verbindungen **159** und **161** als potentielle Substrat für PEPT1 aus. Weniger gut akzeptiert werden die Verbindungen **160** und **162**, bei denen in der Verzweigung die  $\alpha$ -Aminofunktion frei vorliegt.

Eine sich daraus ergebende Frage war: Interagiert das Peptidtargetmolekül oder das Seitenkettenpeptid mit dem Transportprotein? Einen möglichen Hinweis für die Interaktion mit der Seitenkettenstruktur ist durch die identischen  $K_I$ -Werte der ungeschützten Peptide **160** und **162** gegeben. Durch die Entfernung der Z-Schutzgruppe ist sowohl im Targetmolekül als auch im Seitenkettendipeptid eine  $\alpha$ -ständige Aminogruppe vorhanden, so daß eine Interaktion mit dem Seitenkettendipeptid nicht ausgeschlossen werden kann. Das hätte zur Folge, das es unerheblich ist ob Lysin im Targetmolekül in N- oder C-terminaler Position steht.

Weitere Untersuchungen an Substanzen bei denen D-Alanin in die Z-geschützten Seitenkette eingebaut wurde (**163-165**), unterstützen die Vermutung einer Interaktion mit der Seitenkettenstruktur. Ein Vergleich von Verbindung **161** mit den Verbindung **163-165** zeigt, das auch bei Z-geschützten Seitenkettenstrukturen gewisse, wenn auch sehr geringe Affinitätsunterschiede auftreten. Würde allein das Targetmolekül H-Lys-Ala-OH mit PEPT1 interagieren, sollten sich die  $K_I$ -Werte kaum von einander unterscheiden.

In Anbetracht dieser Ergebnisse wurden bezüglich der Substratstruktur für die weiteren Untersuchungen folgende Kriterien festgelegt:

1. Ist das Trägerpeptid aus Lysin und Alanin aufgebaut, sollte die trifunktionelle Aminosäure in N-terminaler Position stehen, da daraus hohe Affinitäten resultieren.
2. Die Seitenkettenstruktur sollte geschützt sein, da das freie Peptid in der Lysinseitenketten leichter von Peptidasen metabolisiert werden kann und sich eine Ladung als hemmend auf die Interaktion mit dem Transportprotein auswirkt.

Die daraus resultierende Targetstruktur H-Lys-Ala-OH wurde für die folgenden Kompensationsexperimente verwendet. Es sollte in einem nächsten Schritt getestet werden, welchen Einfluß die Größe der Peptidseitenkettenstruktur auf die Substraterkennung hat.

**Tab. 28**  $K_I$ -Werte verzweigter Peptide mit H-Lys-Ala-OH als Target-Struktur

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
<b>166</b>	Z-Ala-D-Ala-Ala- $\square$ H-Lys-Ala-OH * HCOOH	0,61 $\pm$ 0,02
<b>167</b>	Z-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala- $\square$ H-Lys-Ala-OH * HCOOH	1,2 $\pm$ 0,1
<b>168</b>	Z-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala- $\square$ H-Lys-Ala-OH * HCOOH	1,8 $\pm$ 0,1

Dabei läßt sich feststellen, daß mit der Vergrößerung der Peptidseitenkette auch die Affinität sinkt. Die ermittelten  $K_I$ -Werte lassen den Schluß zu, daß solche verzweigten Peptide durchaus Substrate für den interstinalen Peptidtransporter PEPT1 darstellen.

Allerdings traten bei diesen Verbindungen andere Probleme auf. Zum einen sinkt die Löslichkeit der Substrate im Uptake-Puffer beträchtlich und zum anderen trat eine Spaltung des Targetmoleküls auf. Es wurde zu einem nicht unerheblichen Anteil die Peptidbindung im Targetmolekül gespalten. Durch die Z-Schutzgruppe und den alternierenden L- und D-Aminosäuren erwiesen sich nur die Seitenketten als abbaustabil. (vgl. 4.4)

In Anbetracht dieser Tatsache wurden neuen protolysestabile Leitstrukturen für das Targetmolekül untersucht, die in Tab. 29 aufgeführt sind.

**Tab. 29**  $K_I$ -Werte abbaustabiler Targetmoleküle

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
102	H-Lys(Z)-Ala-OH * HCl	$0,11 \pm 0,01$
169	H-Lys(Z)-Ala-NH <sub>2</sub> * HCOOH	$2,1 \pm 0,2$
115	H-Lys(Z)-D-Ala-OH * HCl	$27,1 \pm 3,8$
170	H-Lys(Z)-Sar-OH * TFA	$0,26 \pm 0,02$

Ein guter Kompromiß zwischen Stabilität und niederen  $K_I$ -Wert wurde mit Verbindung **170** gefunden. Als sehr stabil gegenüber Peptidasen erweisen sich auch andere Peptide mit Sarkosin in C-terminaler Stellung. Es konnte keine Spaltung bei H-Phe-Sar-OH, ebenso wie bei dem für die Uptake-Experimente verwendeten H-Gly-Sar-OH beobachtet werden. <sup>[29,106-109]</sup> H-Lys(Z)-Sar-OH (**170**) schien daher als neues Targetmolekül geeignet.

Aus diesem Grund wurde eine Reihe von Substraten der Struktur H-Lys(X)-Sar-OH (X = freie oder geschützte Peptide) synthetisiert und getestet.

**Tab. 30**  $K_I$ -Werte verzweigter Peptide mit H-Lys-Sar-OH als Targetstruktur

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
171	Z-Ala-Ala- $\square$ H-Lys-Sar-OH * HCOOH	$0,40 \pm 0,01$
172	Z-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala- $\square$ H-Lys-Sar-OH * HCOOH	$2,9 \pm 0,2$
173	H-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala- $\square$ H-Lys-Sar-OH * 2HCl	$6,7 \pm 0,7$

Die Verbindung **172** erwies sich als stabil gegenüber Protelyse, sowohl auf den Zelloberfläche als auch im Cytosol (vgl. 4.4). Wie sich bereits bei Verbindung **170** zeigte, besitzt H-Lys-Sar-OH im Vergleich zum H-Lys-Ala-OH (**102**) einen 2fach höheren  $K_I$ -Wert. Diese Differenz in der Affinität ist auch bei den verzweigten Peptiden erkennbar (vgl. **161** und **171**, sowie **167** und **172**). Wie im Falle der entsprechenden verzweigten Peptide mit der Targetstruktur H-Lys-Ala-OH kann auch hier eine deutliche Differenzierung der  $K_I$ -Werte von geschützter und ungeschützter Seitenkette beobachtet werden.

Einen positiven Einfluß auf die Substraterkennung besitzt auch eine Verkürzung der Seitenkette der trifunktionellen Aminosäure im Trägermolekül. Durch Austausch von Lysin (**158**) gegen Ornithin (**174**) resultiert ein 3fach niedriger  $K_I$ -Wert.

**Tab. 31**  $K_I$ -Werte verzweigter Peptide mit H-Ala-Orn-OH bzw. H-Ala-Orn-Ala-OH als Targetstruktur

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
<b>174</b>	$\begin{array}{l} \text{Z-Ala-} \lrcorner \\ \text{H-Ala-Orn-OH} * \text{HCOOH} \end{array}$	$0,17 \pm 0,01$
<b>175</b>	$\begin{array}{l} \text{H-Ala-} \lrcorner \\ \text{H-Ala-Orn-OH} * \text{HCl} \end{array}$	$8,9 \pm 0,3$
<b>176</b>	$\begin{array}{l} \text{H-Ala-} \lrcorner \\ \text{H-Ala-Orn-Ala-OH} * \text{HCl} \end{array}$	$7,3 \pm 0,7$

Ebenso wie bei den entsprechenden Lysintarget-Derivaten ist auch hier ein deutlicher Abfall der Affinität zwischen der geschützten und der ungeschützten Peptidseitenkettenstruktur feststellbar, wobei hier die Unterschiede erheblich größer sind.

Parallel zu den von uns beschriebenen Untersuchungen zum Transport verzweigter Peptide mit einem H-Lys-Ala-OH Targetmolekül wurde ein anderer Weg unter Nutzung von H-Asp-Ala-OH als Targetstruktur von TAUB et al. beschrieben. <sup>[110-114]</sup> Die kovalente Veresterung der COOH-Gruppe der Seitenkette von Asparginsäure mit einer Schutzgruppe vom Benzyltyp wirkte sich auch hier positiv auf die Affinität gegenüber PEPT1 aus.

Hintergrund dieser Untersuchungen ist offenbar die erleichterte Freisetzung der an der Seitenkette gebundenen Strukturen unter Ausnutzung der Esteraseaktivitäten im Cytosol.

**Tab. 32**  $K_I$ -Werte verschiedener seitenkettengeschützter Dipeptide (Werte aus [113,114])

Verbindung	$K_I$ [mM]
H-D-Asp(OBzl)-Ala-OH	$2,62 \pm 0,35$
H-Asp(OBzl)-Sar-OH	$0,014 \pm 0,007$
H-D-Glu(OBzl)-Ala-OH	$5,47 \pm 0,13$
H-D-Ser(Bzl)-Ala-OH	$2,46 \pm 0,33$

Interessanterweise wurde von TAUB et al. [113-114] in verschiedenen Experimenten gezeigt, daß die Verbindung mit der höchsten Affinität (H-Asp(OBzl)-Sar-OH) kein Substrat für PEPT1 ist. Es konnte kein Transport der Substanz nachgewiesen werden. Für alle anderen in Tab. 32 aufgeführten Substrate wurde der aktive Transport nachgewiesen. Das auftretende Spaltprodukt Benzylalkohol wird als freie Verbindung passiv transportiert.

Eine Überprüfung unter den im Abschnitt 6.1.6 beschriebenen Bedingungen konnte den sehr guten  $K_I$ -Wert für H-Asp(OBzl)-Sar-OH nicht bestätigen. ( $0,12 \pm 0,01$  mM; persönliche Mitteilung I. Knütter) Unstimmigkeiten traten auch bezüglich des ebenfalls publizierten H- $\beta$ -Asp-Ala-OH (**177**) auf. Für dieses Isopeptid konnte entgegen dem von TAUB et al. [114] bestimmten  $K_I$ -Wert von  $4,32 \pm 0,59$  mM von uns keine Affinität gegenüber PEPT1 gefunden werden.

**Tab. 33**  $K_I$ -Werte verschiedener  $\beta$ -Asp-Ala-Strukturen

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
<b>177</b>	$\begin{array}{l} \text{Ala-OH} \\   \\ \text{H-Asp-OH} \end{array}$	$> 30$
<b>178</b>	$\begin{array}{l} \text{Ala-OH} \\   \\ \text{H-Asp-NH}_2 \end{array} \quad * \text{HCOOH}$	$5,3 \pm 0,9$
<b>179</b>	$\begin{array}{l} \text{Ala-OH} \\   \\ \text{H-Asp-OBzl} \end{array} \quad * \text{HCOOH}$	$8,4 \pm 0,3$

Eine Akzeptanz des Substrates erfolgte erst durch die Blockierung der  $\alpha$ -ständigen Carbonsäurefunktion der Asparginsäure. Für das entsprechende Amid (**178**) und dem Benzylester (**179**) konnte eine Affinität gegenüber PEPT1 nachgewiesen werden.

In Anbetracht dieser Resultate wurde eine Reihe von Verbindungen synthetisiert, bei denen ausgehend von H-Asp-Ala-OH bzw. H-D-Asp-Ala-OH an die  $\beta$ -Carboxyfunktion des Asparagins ein Dipeptid (-Ala-D-Ala-OX; X = H; Bzl) angeknüpft wurde.

**Tab. 34**  $K_I$ -Werte von verzweigten Peptiden mit H-Asp-Ala-OH als Targetstruktur

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
180	$\begin{array}{l} \text{Ala-D-Ala-OBzl} \\   \\ \text{H-Asp-Ala-OH} \end{array} \quad * \text{HCOOH}$	$0,65 \pm 0,06$
181	$\begin{array}{l} \text{Ala-D-Ala-OH} \\   \\ \text{H-Asp-Ala-OH} \end{array} \quad * \text{HCl}$	$2,7 \pm 0,2$
182	$\begin{array}{l} \text{Ala-D-Ala-OBzl} \\   \\ \text{H-D-Asp-Ala-OH} \end{array} \quad * \text{HCOOH}$	$19 \pm 2$
183	$\begin{array}{l} \text{Ala-D-Ala-OH} \\   \\ \text{H-D-Asp-Ala-OH} \end{array} \quad * \text{HCl}$	$> 30$

Wie im Falle der H-Lys-Ala-OH-Derivaten sinkt auch hier die Affinität der Substrate durch die Deblockierung der Carboxygruppe in der Asp-Seitenkette, d.h. eine Landung in der Seitenkettenstruktur wirkt sich auch hier negativ auf die Interaktion mit dem Transportprotein aus. Für eine Interaktion des Transporters mit der Targetstruktur spricht, das zwischen den Verbindungen **180** und **182** sowie **181** und **183** trotz identischer Seitenkettenstrukturen erhebliche Affinitätsunterschiede auftreten.

Die Nutzung von Targetstrukturen ist ein vielversprechender Ansatz für den Transport von Wirkstoffen durch das PEPT1-Transportsystem. Die kovalente Fixierung der zu transportierenden Substanz an eine Lysinseitenkette ist deshalb von Vorteil, da sich die  $N^{\epsilon}$ -Position als weitgehend resistent gegenüber dem Angriff von Peptidasen erwiesen hat, d.h. bei einer Applikation könnte ein Substratverlust durch Spaltung der Verbindung vor dem Transport nahezu ausgeschlossen werden. Des weiteren weisen die H-Lys-Ala-OH - bzw. die H-Lys-Sar-OH-Verbindungen bessere  $K_I$ -Werte auf als die vergleichbaren H-Asp-Ala-OH-Substrate. Aufgrund der stabilen Bindung an die Lysinseitenkette dürften allerdings Probleme bei der Freisetzung des Wirkstoffs auftreten. Hier hat eine esterartige Verknüpfung (erleichterte Spaltung durch Esterasen) sicherlich Vorteile. Des weiteren scheint sich eine Verkürzung der Länge der Seitenkette als positiv auf die Substanzerkennung auszuwirken, wie es sich bei den H-Orn-Ala-OH-Derivaten bereits andeutete.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Ester- oder die Amid-Verknüpfung geeigneter ist, sind weitere Untersuchungen und Transportstudien (z.B. am *Oocyt*-Testsystem) notwendig.

### 4.3 Affinitätsuntersuchungen mit biologisch relevanten Verbindungen

Die Ausnutzung des Transports von physiologisch relevanten Substanzen über den Gastrointestinaltrakt ist seit der Charakterisierung von PEPT1 und der Etablierung des Caco-2 Testsystems zu einem zentralen Anliegen der Forschung geworden. Neben dem gut untersuchten Transport von  $\beta$ -Lactamantibiotika<sup>[115]</sup> wurden auch eine Reihe anderer Verbindungen untersucht, wie z.B. ACE-Inhibitoren<sup>[10,116]</sup> und L-DOPA<sup>[117,118]</sup> und ihr aktiver Transport gezeigt. Für das Antikrebsmittel Taxol und die bei bestimmten Anämieformen therapeutisch verwendete Folsäure konnte eine passive Diffusion der Substrate durch die Monolayer beschrieben werden.<sup>[119,120]</sup> Für Biotin wurde ein eigener, spezifischer Biotin-Carrier postuliert.<sup>[121]</sup> Umstritten war lange Zeit auch der Transportweg von Aspirin® (Acetylsalicylsäure) und dessen synthetischer Vorstufe, der Salicylsäure. Nach den Untersuchungen von MESHKINPOUR et al.<sup>[122]</sup> wurde für diese Substanzen ebenfalls die passive Diffusion beschrieben. Eine Revision der Ergebnisse erfolgte durch SUZUKA et al.<sup>[123]</sup> und TAKANAGA et al.<sup>[124]</sup>, die belegen konnten, daß der protonenabhängige Transport der Verbindungen über einen spezifischen Monocarboxylat-Transporter (MCT) erfolgt. Diese Transporter (MCT1-MCT7) treten organspezifisch auf, wobei MCT1 hauptsächlich im Herz-, Skelettmuskel- und Dünndarmgewebe exprimiert wird.<sup>[125]</sup>

Zu der großen Gruppe der Peptidwirkstoffe gegen grampositive Mikroorganismen gehören neben den  $\beta$ -Lactamantibiotika auch die Lantibiotika. Das in der Literatur beschriebene Nisin gehört zu den interessantesten Vertretern und wird als gesundheitlich unbedenkliches Substrat bereits großtechnisch zur Konservierung von Lebensmittels eingesetzt und als Antimalariamittel diskutiert.<sup>[126]</sup> Neben dem komplexen Nisinmolekül gelten auch Teilstrukturen, allen voran das Lanthionin (**184**) als Wirkstoff.<sup>[127,128]</sup> Das aus dem C-Ring des Nisins gewonnene Dipeptidderivat ist strukturell durch eine Alanin-Seitenkettenverknüpfung über ein Schwefelatom charakterisiert.

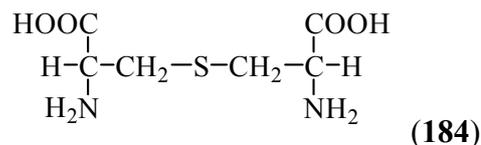


Abb. 14 Struktur von Lanthionin

Es war interessant herauszufinden, ob für Lathionin ein ebensolcher Transportmechanismus mit PEPT1 beschrieben werden kann, wie bei den  $\beta$ -Lactamantibiotika.

In die Untersuchung mit einbezogen wurden auch Verbindungen, die z. B. für das Wachstum von Mikroorganismen (*p*-Aminobenzoessäure) unerlässlich sind oder als Blütengeruchsstoff (Anthranilsäure) fungieren.

Tab. 35  $K_I$ -Werte verschiedener Wirkstoffe

Nr.	Verbindung	$K_I$ [mM]
184	Lanthionin	> 10 +
185	Ascorbinsäure	> 30
186	<i>p</i> -Aminobenzoessäure	4,2 ± 0,2
187	<i>m</i> -Aminobenzoessäure	6,6 ± 0,7
188	<i>o</i> -Aminobenzoessäure	2,4 ± 0,1
189	<i>p</i> -Aminophenylelessigsäure	14 ± 1

(+ Löslichkeitsproblem; Messung bei max. Konzentration)

Bedingt durch das geringe Löslichkeitsvermögen konnte jedoch für das Lanthion nur ein  $K_I$ -Wert von > 10 mM ermittelt werden. Die Affinität der Ascorbinsäure (Vitamin C) strebt ebenfalls gegen Null. Es scheint daher ausgeschlossen, daß diese Verbindungen aktiv über PEPT1 transportiert werden.

Allen isomeren Aminobenzoessäuren ist gemein, daß sie sowohl einen freien N- als auch C-Terminus besitzen. Durch TEMPLE et al. <sup>[129]</sup> wurde am Beispiel der *p*-Aminophenylelessigsäure (189) demonstriert, daß solche Substrate trotz eines hohen  $K_I$ -Wertes durch PEPT1 transportiert werden können. Widersprüchlich hingegen sind die Aussagen zur Absorption von *p*-Aminobenzoessäure (PABA) (186) im Intestinum. MAEDA et al. <sup>[130]</sup> beschrieb die passive Diffusion im Rattendünndarm, während YAMAMOTO et al. <sup>[131]</sup> einen carriergestützten Transport nachwies.

Unter Berücksichtigung der oben erwähnten Affinitäten der strukturverwandten Salicyl- und Acetylsalicylsäure gegenüber dem MCT-Carrier kann der aktive Transport durch PEPT1 nahezu ausgeschlossen werden. Die Gründe für die scheinbaren Affinitäten, der mit der standardisierten Methode durchgeführten Versuche, sind unklar. Zum einen könnte ein Zusammenbruch des pH-Gradienten oder die Veränderung der Beschaffenheit der Zelloberfläche durch die spezifischen Eigenschaften der Substrate die Ursache sein. Weiterhin ist die Komplexbildung der Verbindungen in dem sauren Milieu des Aufnahmepuffers mit den vorhandenen zweiwertigen Ionen ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) und den damit verbundenen Konzentrationsänderungen als Ursache nicht auszuschließen. <sup>[132]</sup>

#### 4.4 Stabilitäten einiger ausgewählter Verbindungen

Die Bürstensaummembran der Caco-2 Zellen enthält mindestens acht verschiedene Peptidasen, deren Aktivität nach 15 Tagen ihr Plateau erreicht. <sup>[133,134]</sup> Um den Einfluß der Substrathydrolyse auf die Kompensationsexperimente zu untersuchen, wurde daraufhin die Abbaustabilität ausgewählter Verbindungen untersucht.

In allen Fällen wurden die Verbindungen in Puffer 1 (vgl. 6.1.2) gelöst. Alle Versuche wurden einmal wiederholt und die Substratkonzentration mit 1 mM festgesetzt. (vgl. 6.1.4) Die Bestimmung des prozentualen Anteils der Spaltprodukte und ihre Identifizierung erfolgte mittels HPLC oder CE unter Verwendung des Zellüberstandes nach 5, 30, 60 und 120 Minuten. In Abb. 15 sind die Stabilitätskurven der untersuchten Aminosäurederivate graphisch dargestellt.

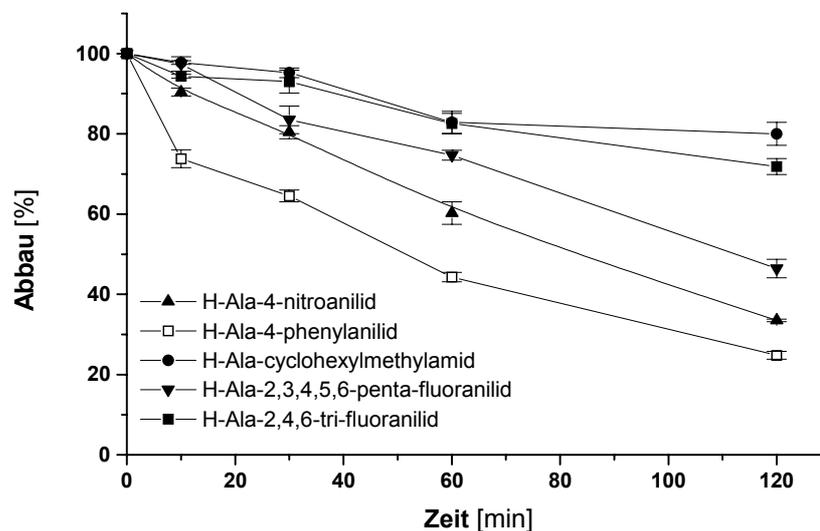


Abb. 15 Stabilitäten einiger Aminosäurederivaten

Tab. 36 Stabilitäten einiger Aminosäurederivate (\* Werte nach 10 Minuten)

Nr.	Verbindung	Abbau [%] *	Spaltprodukt
23	H-Ala- <i>p</i> -nitroanilid * HCl	9,7	<i>p</i> -Nitroanilin
34	H-Ala- <i>p</i> -phenylanilid *HCl	26,3	<i>p</i> -Phenylanilin
51	H-Ala-cyclohexylmethylamid * HCOOH	2	Cylohexylmethylamin
39	H-Ala-2,4,6-tri-fluoranilid *HBr	5,2	2,4,6-Trifluoranilin
40	H-Ala-2,3,4,5,6-penta-fluoranilid * HBr	2,6	Pentafluoranilin

Die Stabilität der ausgewählten Verbindungen ist in den ersten 10 Minuten ähnlich (bis 10% Abbau), allerdings zeigen sich über einen längeren Zeitraum deutliche Unterschiede.

Einen schnellen Abbau läßt das H-Ala-*p*-phenylanilid (**34**) vermuten, das bereits nach 10 Minuten nur noch zu 73,7% nachgewiesen werden konnte. Dabei ist zu berücksichtigen, daß dieses Substrat eine hohe Affinität zu PEPT1 aufweist und so ein hoher Anteil der Verbindung bereits nach 10 Minuten die Zellmembran passiert hat.

Die Stabilität freier Dipeptide gegenüber den büstensaumständigen Peptidasen wurde in der Literatur mehrfach beschrieben. <sup>[112,135-137]</sup> SILBERNAGEL <sup>[138]</sup> stellte allerdings fest, daß die Peptidbindung des Substrates H-Gly-Phe-OH gespalten wird. Der Transport erfolgt dann in Form der freien Aminosäuren.

Von uns wurde eine Reihe C-terminal geschützter Dipeptide untersucht (Abb. 16). Interessant war herauszufinden, ob hier ebenfalls ein Abbau durch Spaltung der Peptidbindung erfolgt.

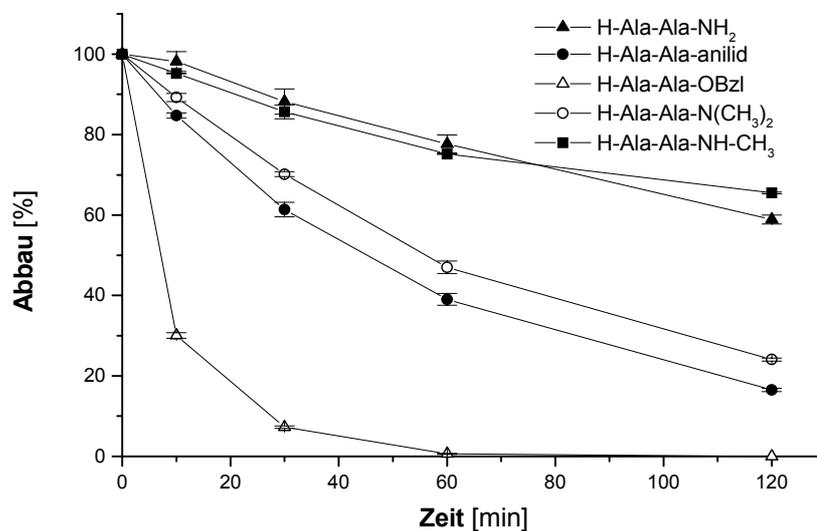


Abb. 16 Stabilitäten einiger C-terminal geschützter Dipeptidderivaten

Tab. 37 Stabilitäten einiger C-terminal geschützter Dipeptidderivaten (\* Werte nach 10 Minuten)

Nr.	Verbindung	Abbau [%] *	Spaltprodukt
88	H-Ala-Ala-NH <sub>2</sub> * HCl	1,9	H-Ala-NH <sub>2</sub>
89	H-Ala-Ala-NH-CH <sub>3</sub> * HCl	5,2	H-Ala-NH-CH <sub>3</sub>
90	H-Ala-Ala-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	11,8	H-Ala-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
91	H-Ala-Ala-anilid * HCl	15,3	H-Ala-anilid
86	H-Ala-Ala-OBzl * HCOOH	70	H-Ala-Ala-OH

Wie aus Tab. 37 ersichtlich, erfolgt im Falle der H-Ala-Ala-amid-Derivate (**88-91**) auch eine Spaltung der Peptidbindung. H-Ala-Ala-OBzl (**86**) erwies sich als äußerst instabil. Bereits nach 10 Minuten sind nur noch 30% der Ausgangssubstanz nachweisbar. Die Spaltung der

Verbindung erfolgte hier allerdings an der Estergruppierung. Es ist anzunehmen, daß in diesem Fall der Transport durch PEPT1 in Form des ungeschützten Dipeptids H-Ala-Ala-OH erfolgt.

Die Stabilität gegenüber Peptidasen wurde insbesondere für Lysin-Substrate mit Seitenkettenderivatisierung beschrieben.<sup>[139-141]</sup> Der Grund für die Protelysestabilität der partiellen Isopeptidbindung gegenüber der  $\alpha$ -Peptidbindung liegt in ihre geringeren Hydrolysegeschwindigkeit durch Proteasen.

Auch in den von uns untersuchten Substraten konnte nur eine Spaltung der  $\alpha$ -Peptidbindung zwischen Alanin und Lysin beobachtet werden.

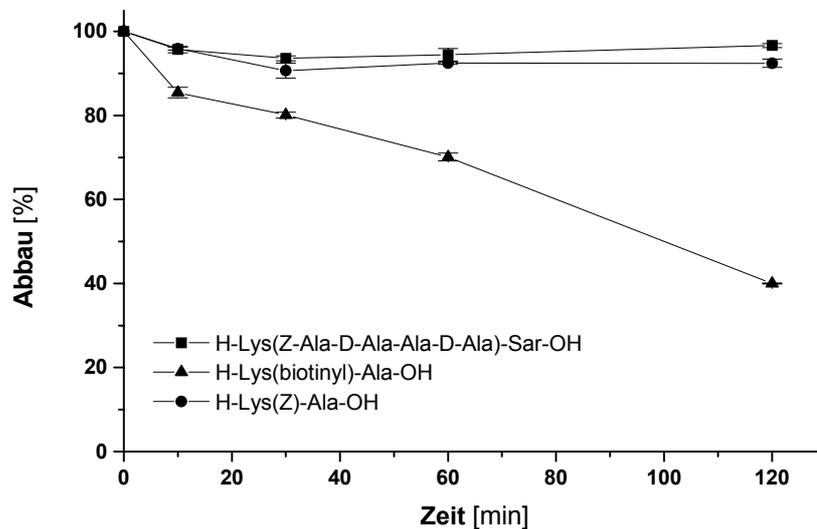


Abb. 17 Stabilitäten seitenkettengeschützter Dipeptide

Tab. 38 Stabilitäten seitenkettengeschützter Dipeptide (\* Werte nach 10 Minuten)

Nr.	Verbindung	Abbau [%] *	Spaltprodukt
94	H-Lys(Z)-Ala-OH * HCl	4,2	H-Lys(Z)-OH
97	H-Lys(biotinyl)-Ala-OH * HCl	15,9	H-Lys(biotinyl)-OH
158	H-Lys(Z-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala)-Sar-OH * HCOOH	3,3	-

Im Falle der Blockierung der N<sup>ε</sup>-Funktion des Lysins durch die Z-Schutzgruppen (**94**) und Biotin (**97**) konnte gezeigt werden, daß eine Protelyse der Verbindung nur in der Targetstruktur (H-Lys-Ala-OH) eintritt. Erwartungsgemäß erwies sich die Targetstruktur H-Lys-Sar-OH der Verbindung **158** als stabil gegenüber den oberflächenhaftenden

Peptidasen. Auch von der geschützten Seitenkettenstruktur konnten, bedingt durch den Einbau von D-Aminosäuren, keine Spaltprodukte detektiert werden.

Soll ein Pharmakon wirksam sein, so muß es die Zelle auf der basolateralen Seite intakt verlassen. Aus diesem Grund wurden auch erste Untersuchungen zur Stabilität im Cytosol durchgeführt. Ausgewählt für dieses Experiment wurde Verbindung **158**, die eine Z-geschützte alternierenden L- und D- Alanin-Sequenz in der Seitenketten der Lys-Sar-Targetstruktur aufweist. Als Referenzsubstrat diente Tertaalanin (H-Ala-Ala-Ala-Ala-OH).

(Abb. 18)

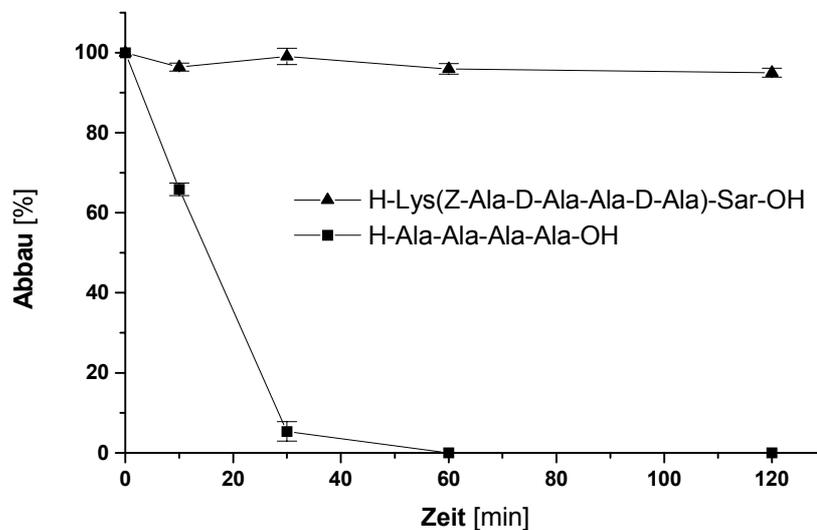


Abb. 18 Stabilität im Cytosol

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die für die Stabilitätsprüfungen ausgewählten Verbindungen, mit Ausnahme der Verbindung **86**, in den ersten 10 min alle einen Abbau bis zu 15% aufweisen. In einer Studie von SYKES et al. <sup>[142]</sup> wurde gezeigt, daß über 80% der gesamten Peptidaseaktivität für Dipeptide auf das Cytosol entfallen und nur weniger als 10% auf die Bürstensaummembran. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren beschrieben (STERCHI et al. <sup>[135]</sup>, BAI et al. <sup>[10]</sup>). Zwar findet in den ersten 10 Minuten eine Hydrolyse der Substrate statt, allerdings besitzt sie demzufolge wenig Einfluß auf die Ergebnisse der Uptake-Versuche. Eine Anpassung der Werte ist daher nicht notwendig.

Wichtig sind die Abbauxperimente allerdings für die Flux- bzw. Transwell<sup>®</sup>-Versuche. Da hier die Versuchszeit 120 Minuten beträgt, kommt dem Zerfall der Substanz eine entscheidende Bedeutung zu. <sup>[70]</sup>

## 5. Zusammenfassung

In der Literatur werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Substratspezifität des PEPT1-Symporters kontrovers diskutiert. Da weder Röntgenstrukturanalysen noch gesicherte Informationen über das aktive Zentrum des Transportproteins vorliegen, ist man auf systematische Studien von Struktur-Wirkungs-Beziehungen an einem einheitlichen Transportmodell angewiesen.

Für die Untersuchungen wurde das *in vitro* Modell Caco-2 benutzt. Diese Zelllinie ist ein anerkanntes Modell für Transportstudien im Dünndarm. Die sich aus der Messung der Aufnahmehemmung des Referenzsubstrates [<sup>14</sup>C]Gly-Sar durch die Testsubstanzen ergebenden Inhibierungskonstanten  $K_I$  sind ein Maß für die Affinität der Verbindungen zum PEPT1.

Das Ziel dieser Arbeit war es, anhand von systematischen Studien an einer breiten Palette von Dipeptiden, Dipeptid- und Aminosäurederivaten Aussagen zur Substratspezifität des intestinalen Peptidtransporter PEPT1 zu erhalten. Im Mittelpunkt standen dabei folgende Strukturmodifikationen:

- Aminosäureamidderivate,
- Dipeptide und deren N-, C- oder seitenkettengeschützte Derivate,
- Inversion der Konfiguration,
- N- und C-terminalem Einbau von  $\omega$ -Aminocarbonsäuren,
- Cyclopeptide, Isopeptide,
- verzweigte Peptide.

Die Einbeziehung der am C-Terminus modifizierten **Aminosäurederivate** in die Affinitätsuntersuchungen erfolgte unter dem Aspekt der Minimierung der Substratstruktur. Als die kleinsten akzeptierten Einheiten können H-Ala-anilid und H-Ala-cyclohexylamid angesehen werden. Eine erhöhte Affinität wurde durch verschiedene Modifikationen der Arylamide erreicht, wobei sich besonders die *para*-substituierten Verbindungen durch eine hohe Affinitäten auszeichnen. So sind z.B. Aminosäure-*p*-nitroanilide ausgezeichnete Substrate.

Nicht akzeptiert werden hingegen Aminosäureester, Aminosäureamide mit kurzen aliphatischen Ketten (Methyl-, Ethyl-), Aminosäurepyrrolidide und Aminosäurederivate, die in der *ortho*-Position des Arylsystems funktionelle Gruppen tragen.

Wird zwischen Amidstickstoff und Arylsystem eine CH<sub>2</sub>-Gruppe eingeführt, führt das zu einem Verlust der Affinität gegenüber PEPT1.

Durch eine Korrelation von  $K_I$ -Wert und <sup>1</sup>H-Verschiebung des Säureamidprotons (-CO-NH-) konnte nachgewiesen werden, daß die Polarisierung dieser Bindung bei den Aminosäurederivaten einen entscheidenden Einfluß auf die Affinität besitzt.

---

Naturgemäß besitzen **Dipeptide** gute Affinitäten zu PEPT1. Ausnahmen bilden solche Substrate, die die Iminosäuren Sarkosin oder Prolin in N-terminaler Stellung aufweisen, sowie Dipeptide mit Ladungen in der Aminosäureseitenkette.

Eine **Blockierung der N-terminalen Aminogruppe** führt bei Dipeptiden zu einer signifikanten Abnahme der Affinität, in Abhängigkeit von der jeweiligen Schutzgruppe. Während die Blockierung mit dem Benzyloxycarbonylrest im allgemeinen noch toleriert wird, liegen die Inhibierungskonstanten für die tert-Butoxycarbonyl-geschützten Dipeptide weitaus höher.

Die **Blockierung des C-Terminus** führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Gut akzeptiert werden Blockierungen in Form von Alkyl- und Arylestern, dagegen führt die Blockierung des C-Terminus mit aliphatischen Amin-Komponenten zu einem Verlust der Affinität.

Die **Blockierung der Seitenkettenfunktionen** von trifunktionellen Aminosäuren mit Schutzgruppen vom Benzyltyp hat sich in vielen Fällen als positiv auf die Affinität ausgewirkt. Eine mögliche Ursache ist in der Erhöhung der Molekülhydrophobizität zu sehen.

Die hohe Stereospezifität von PEPT1 für L,L-Verbindungen hat zur Folge, daß die Affinität von Dipeptiden, die eine **Inversion der Konfiguration** aufweisen, schlecht oder gar nicht akzeptiert werden. In N-terminaler Stellung werden D-Aminosäuren besser toleriert, als am C-Terminus. Liegen beide Aminosäuren in der D-Konfiguration vor, gehen die Substrateigenschaften verloren. Durch den Einbau von D-Lys(Z) in C-terminaler Position konnte von uns erstmals mit H-D-Ala-D-Lys(Z)-OH ein Substrat beschrieben werden, daß trotz seiner DD-Konfiguration von PEPT1 erkannt wird.

Die Verlängerung des Peptidrückgrads am N-terminalen Ende durch den Einbau von  $\omega$ -**Aminocarbonsäuren** führt zu einer Reduzierung der Affinität, dagegen wird vom Transporter die C-terminale Verlängerung des *backbone*s gut toleriert. Diese Untersuchungen zeigen, daß die N-terminale Aminogruppe nicht nur frei und protoniert, sondern auch in der  $\alpha$ -Position lokalisiert sein muß, um eine hohe Affinität zu erzielen.

Nicht toleriert werden vom Peptidtransporter **cyclische Dipeptide, Dipeptide mit Isopeptidbindungen** und Dipeptide aus zwei  $\omega$ -Aminocarbonsäuren.

In diese Untersuchungen wurden **verzweigter Peptide** mit einbezogen, da sich hier die Nutzung eines Dipeptids als Target für therapeutische Substanzen (*prodrug*) anbietet. Die erhaltenen Inhibierungskonstanten weisen diese seitenkettenverzweigten Peptidstrukturen in vielen Fällen als mögliches Substrat für PEPT1 aus. H-Lys-Sar-OH konnte als ein stabiles Targetmolekül etabliert werden. Eine kovalente Anknüpfung von N-geschützten Peptiden über die Lysinseitenkette des Targetdipeptides erwies sich als stabil gegenüber proteolytischem Abbau.

Weitere Studien sind notwendig um zu klären, ob die kovalente Fixierung eines Wirkstoffes an eine Lysinseitenkette möglich ist und ob ein Transport des so erhaltenen Prodrugs über PEPT1 erfolgen kann.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen die folgende strukturelle Anforderungen an hochaffine Dipeptidsubstrate für PEPT1 gestellt werden müssen:

- freier N- und C-Terminus
- Blockierung der Seitenkettenfunktion bei trifunktionellen Aminosäuren
- L-Konfiguration der Aminosäurebausteine in N- und C-terminaler Position
- Lokalisation der N-terminalen Aminogruppe in  $\alpha$ -Position

---

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1 Zellspezifische Methoden

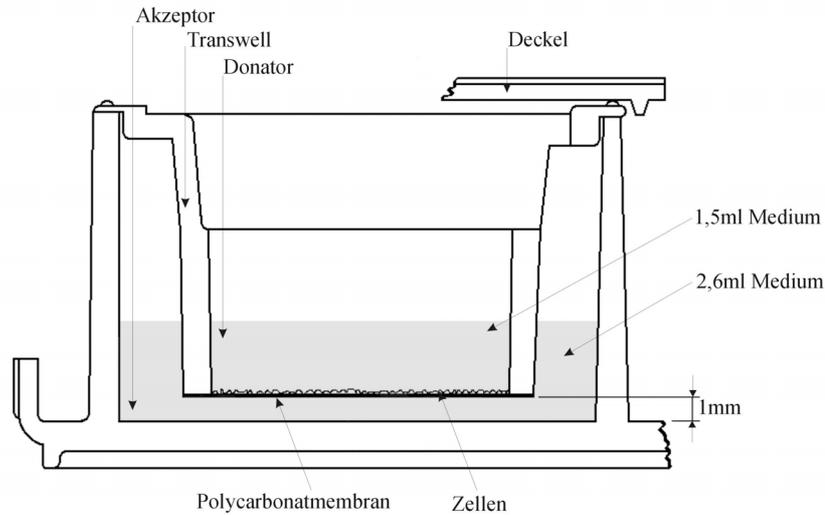
#### 6.1.1 Kultivierung und Subkultivierung von Caco-2

Caco-2 Zellen (Passage 9 bis 100) wurden routinemäßig in 75cm<sup>2</sup> Plastikkulturflaschen der Firma Greiner (Frickenhausen, Deutschland) bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in einem Inkubator des Typs BB16 der Firma Heraeus (Hanau, Deutschland) kultiviert. Als Kulturmedium diente MEM (vgl. 6.1.2). Die Zellen wurden bis zur Konfluenz (Bildung einheitlicher Monolayer) kultiviert (3-5 Tage). Dabei erfolgte alle 2 Tage ein Mediumwechsel sowie zusätzlich am 1. Tag nach der Aussaat, um eventuelle Trypsinreste zu entfernen. Nach Erreichen der Konfluenz wurde mittels Trypsinbehandlung eine neue Subkultur angelegt.

Nach der Entfernung des Mediums von den Monolayern wurden die Zellen ca. 5 min mit einer kalziumfreien isotonischen Pufferlösung (PBS) gespült. Danach erfolgte eine ca. 3 minütige Behandlung mit 3 ml EDTA-haltiger Trypsinlösung, wobei das EDTA die restlichen Kalziumionen bindet. Nach der möglichst vollständigen Entfernung der Trypsin-Lösung wurden die Zellen von der Wand geschlagen (*knocking*) und mit Hilfe einer Pipette in 10 ml Kulturmedium suspendiert. Ein Tropfen der homogenen Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl auf ein Hämocytometer überführt. Anschließend wurde die gewünschte Zelldichte durch Verdünnung mit Kulturmedium eingestellt und die Zellen in die entsprechenden Versuchsmodelle (Petrischale, Flux-Kammer) überführt. Ein kleiner Teil der Zellsuspension wurde zur Anlegung einer neuen Kulturpassage genutzt.

Für die Untersuchung der Aufnahme der Substrate über das aktive Transportsystem (Uptake Untersuchungen) wurden die Zellen 7 oder 8 Tage in 35 mm Falcon<sup>®</sup>-Petrischalen der Firma Becton Dickinson (Plymouth, U.K.) mit einer anfänglichen Zelldichte von 0,75\*10<sup>6</sup> Zellen pro Petrischale (entspricht 0,375\*10<sup>6</sup> Zellen pro ml) unter den bereits beschriebenen Bedingungen kultiviert. Nach 2 Tagen waren die Monolayer konfluent (mikroskopische Prüfung).

Für die Nutzung der Caco-2-Monolayer als *in vitro* Permeationsmodell wurden die Zellen in 24 mm Transwell<sup>®</sup>-Kammern der Firma Costar (Bodenheim, Deutschland) mit Polycarbonatmembran (Porendurchmesser 3µm) 19-21 Tage unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die Ausgangszelldichte wurde hier mit 0,2\*10<sup>6</sup> Zellen pro Filter (entspricht 0,133\*10<sup>6</sup> Zellen pro ml) festgelegt.



**Abb. 19** Schematische Darstellung einer Transwell®-Kammer zur Bestimmung des epithelialen Fluxes

### 6.1.2 Medien und Lösungen für die Zellzucht

Kulturmedium: Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen und L-Glutamin und Zusätzen von:

- Fetalem Rinderserum (10%)
- NEAA – nichtessentielle Aminosäuren (1%)
- Gentamycin (44,6 µg/ml)

Trypsin-EDTA-Lösung: · 0,5g Trypsin (1:250)  
· 0,2g EDTA pro 1ml modifizierter Puck's Salzlösung A

Dubecco's PBS-Lösung: · phosphatgepufferte Salzlösung ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7,2

Alle Medien und Lösungen wurden von der Firma Life Technologies Inc. (Eggenstein, Deutschland) bezogen.

### 6.1.3 Puffer zur Bestimmung der Aufnahme von Substraten in Caco-2

Puffer 1 (pH 6,0)		Puffer 2 (pH 7,5)	
NaCl	140 mM	NaCl	140 mM
KCl	5,4 mM	KCl	5,4 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM	CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,8 mM	MgSO <sub>4</sub>	0,8 mM
Glucose	5 mM	Glucose	5 mM
MES	25 mM	HEPES	25 mM

Die Puffersalze wurden in Aqua bidest. gelöst und mit festem Tris auf die entsprechenden pH-Werte eingestellt. Alle Materialien wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

### 6.1.4 Untersuchungen der Substratstabilität auf der Zelloberfläche

Für die Untersuchung der Substratstabilität wurden 4 willkürlich ausgewählte Petrischalen mit 7 oder 8 Tagen routinemäßig kultivierten Caco-2 Zellen verwendet.

Nach dem Entfernen des Kulturmediums wurde die Zelloberfläche mit Puffer 1 mehrmals gründlich gewaschen. Pro Petrischale wurde dann 1 ml der zu untersuchenden Substratlösung (1 mM) zugegeben. Die Durchmischung des Überstandes erfolgt mit einem Thermomixer der Firma Heraeus (Hanau, Deutschland), mit dem gleichzeitig die entsprechenden Versuchsbedingungen, RT oder 37°C, eingestellt werden konnten. Zur Nullwertbestimmung wurde innerhalb der ersten Minute eine Probe von 40 µl aus jeder Schale entnommen. Der Versuch wurde nach 10, 30, 60 und 120 Minuten beendet. Aus der entsprechenden Petrischale wurde eine 200 µl Probe entnommen und der Analytik (HPLC oder CE) zugeführt. Anschließend wurde der Zellteppich gründlich mit eiskaltem Puffer 1 gewaschen, mit 1ml bidest. H<sub>2</sub>O versetzt und für 24 h eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen homogenisiert, die Lösung zentrifugiert, gegebenenfalls filtriert und das klare Zellysate ebenfalls analysiert.

### 6.1.5 Untersuchungen der Substratstabilität im Cytosol

Die Untersuchungen wurden in Anlehnung an Arbeiten von WALTER et al. <sup>[7]</sup> und MOSS et al. <sup>[142]</sup> durchgeführt.

Die Caco-2-Zellen wurden in 75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen der Firma Greiner (Eggenstein, Deutschland) 8 Tage routinemäßig kultiviert.

---

Nach dem Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen 3 min mit PBS-Puffer (pH 7,4) behandelt. Die Spüllösung wurde entfernt, der Zellrasen erneut mit 2 ml PBS-Lösung versetzt, die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und anschließend mit 0,15 M NaCl-Lösung 1:5 verdünnt. Die erhaltene Lösung wurde in ein Reagenzglas überführt, auf Eis gelegt und auf 4°C abgekühlt. Nach dem Homogenisieren mit einem *ultra turrax* wurde das Homogenisat bei 1000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand für die Stabilitätsstudien verwendet.

Die Stabilitätsüberprüfung erfolgte bei 37°C in einem Gemisch aus 1ml des Überstandes und 0,5 ml der 1 mM Peptidlösung (gelöst in PBS-Puffer). Die Versuchslösung wurde alle 10 Minuten durchmischt, nach 10, 30, 60 und 120 min eine 500 µl Probe entnommen und mit gleicher Menge an 0,1 M ZnSO<sub>4</sub> versetzt. Zur Vervollständigung der Fällung muß die Lösung sehr gut gemischt und anschließend bei RT und 10000 rpm für 5 min zentrifugiert werden. Als vorteilhaft hat sich das nochmalige filtrieren mit einem Ultrafree-MC Filter (5000)<sup>®</sup> der Firma Millipore (Eschborn, Deutschland) erwiesen. Der klare Überstand wird dann der Substratanalyse zugeführt.

### 6.1.6 Transwelltechnik zur Bestimmung des transepithelialen Fluxes

Zur Vorbereitung der Kammern und Kultivierung vergleiche Kapitel 6.1.1.

Der Versuch wird bei 37°C durchgeführt.

Nachdem das Medium entfernt wurde, wird in die Kammern auf der Akzeptorseite 2,6 ml und auf der Donorseite 1,5 ml der Puffer 2-Lösung eingefüllt und nach 10 min wieder entfernt. Unter die Membranen wird dann erneut 2,6 ml warmer Puffer 2 gefüllt, die Zeit gestartet und auf die Membranen nacheinander 1,5 ml der warmen Prüflösung (Substrat gelöst in Puffer 1) gegeben. Zur Durchmischung wird die Kammer in einem Wasserbad bei 37°C langsam geschüttelt. In den ersten 5 min wird aus der Donorseite eine 50 µl Probe zur Nullwertbestimmung entnommen und durch die entsprechende Menge frische Prüflösung ersetzt. Die Filter wurden regelmäßig geliftet, zuerst nach 10 min, dann alle 15-20 min und vor jeder Probeentnahme. Die Entnahme der 200 µl Proben erfolgt nach 15, 30, 60 und 120 min aus dem Akzeptor, wobei anschließend die entsprechende Menge wieder mit Puffer ersetzt wird. Für weitere Überprüfungen des Substanzverhaltens wurden zu den Zeiten auch aus dem Donor 30 µl Proben entnommen. Am Ende des Versuchs werden die Lösungen abgesaugt und die Membranen mehrmals mit eiskaltem Puffer 1 behandelt. Die Filtereinsätze werden mit der Kante auf Zellstoff abgetupft, die Membranschicht mit einem Skalpell herausgelöst und in 400 µl bidest. H<sub>2</sub>O eingefroren. Für die Analytik werden die Membranen aufgetaut, sehr gut gemischt, 10 min bei 12000 Umin<sup>-1</sup> zentrifugiert und gegebenenfalls noch einmal filtriert.

---

### 6.1.7 Transportstudien in Caco-2 Monolayern

Alle Versuche wurden bei RT durchgeführt. Es wurde getestet, ob die Aufnahme eines radioaktiv markierten Substrates durch die zu untersuchenden Verbindungen gehemmt wird. Als Aufnahmepuffer diente Puffer 1 (vgl. 6.1.3). Dieser enthielt entweder nur das radioaktiv markierte 10  $\mu\text{M}$  [Gly-1- $^{14}\text{C}$ ] Glycylsarkosin (= Kontrolle) oder zusätzlich den zu untersuchenden potentiellen Inhibitor in ansteigenden Konzentrationen. Der pH-Wert des substrathaltigen Puffers wurde vor jedem Versuch geprüft und gegebenenfalls mit TRIS oder HCl korrigiert und auf pH 6.0 eingestellt.

Nach der Entfernung des Mediums von den Monolayern wurden die Zellen ca. 30 s mit 1 ml substratfreiem Puffer 1 vorbehandelt. Nach Absaugen des Puffers folgte eine 10 min Inkubation mit 1 ml substrathaltiger Pufferlösung. Im Anschluß daran wurden die Zellen 4mal mit eiskaltem Puffer 1 gespült und 1 ml Lysierlösung (= wäßrige Lösung von 1% SDS und 0,2 M NaOH) auf die Zellen gegeben. Nach 30-60 min Einwirkzeit wurden die aufgelösten Zellen mittels einer Pipette in 8 ml Meßröhrchen überführt und für die Flüssigkeit-Szintillationsspektroskopie vorbereitet.

### 6.1.8 Konzentrationsbestimmung mittels Flüssigkeits-Szintillation

Die Bestimmung der Zerfallsrate der in die Zellen aufgenommenen radioaktiv markierten Substanz erfolgte mit dem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer Tri-Carb-2100TR der Firma Hawlett-Packard (Meriden, USA). Die in die Meßröhrchen überführten lysierten Zellen wurden mit 4 ml LSC-Coctail (Ultima Gold™ XR) vermischt und jeweils für 10 Minuten vermessen. Das Gerät arbeitet mit einem internen Standard und liefert die Zerfälle pro Minute (dpm). Die Umrechnung der erhaltenen Werte in die Konzentration der radioaktiven Substanz erfolgte nach Gleichung I.

Erforderlich für jeden Versuch war die Ermittlung der Gesamtaktivität des Aufnahmepuffers. Dazu wurde aus den vereinten Resten der Prüflösungen eine 25 $\mu\text{l}$  Probe (= Standard) entnommen und ebenfalls 10 Minuten vermessen.

### 6.1.9 Bestimmung des Proteingehaltes

Für die Ermittlung des Proteingehaltes pro Petrischale wurde willkürlich eine Schale der Versuchspassage ausgewählt. Nach der Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen 4 mal mit 1 ml eiskalter Pufferlösung (Puffer 1) gewaschen und anschließend mit 1 ml entmineralisiertem Wasser versetzt. Bis zur Bestimmung wurde die Petrischale dann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die homogene Lösung der aufgetauten Zellen wurde benutzt, um die Proteinbestimmung nach der Standardmethode von LOWRY et al. <sup>[144]</sup> durchzuführen. Das

*Lowry*-Reagenz wurde dazu im Verhältnis **A:B:C** = 100:1:1 gemischt, wobei die einzelnen Lösungen sich wie folgt zusammensetzten:

Lösung **A**: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,1 N NaOH

Lösung **B**: 0,2% K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup>-Tartrat in bidest. H<sub>2</sub>O

Lösung **C**: 1% CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O in bidest. H<sub>2</sub>O

100 µl Zellsuspension wurden mit 900 µl bidest. H<sub>2</sub>O und 5 ml des *Lowry*-Reagenz versetzt (je zweimal als Doppelbestimmung). Als Blindwert wurde 1 ml bidest. H<sub>2</sub>O mit 5 ml *Lowry*-Reagenz vermischt. Die Gemische wurden 10 Minuten stehen gelassen, bevor 0,5 ml 1 N Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagenz zugesetzt und sofort durchmischt wurde. Nach weiteren 30 Minuten wird die Absorption bei 725 nm, bezogen auf den gleichbehandelten Blindwert, gemessen. (Spectronic 601, Molton Roy Company, USA)  
Die beiden Parallelbestimmungen wurden gemittelt.

## 6.2 Synthese der Substanzen

### 6.2.1. Allgemeine Bemerkungen

#### Schmelzpunkte:

Die Werte wurden auf einem Heiztischmikroskop nach *BOETIUS* bestimmt und sind nicht korrigiert.

#### Optische Drehung:

#### Polamat A (Carl Zeiss Jena)

Die spezifische Drehung  $[\alpha]$  wurde, wenn nicht anders angegeben, in Methanol mit einer Natriumlampe ( $\lambda=589\text{nm}$ ) bestimmt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt.

Die Konzentration  $c$  wurde, wenn nicht anders angegeben, mit 1 mg/ml festgelegt.

#### NMR-Messungen:

#### ARX 500-Spektrometer (Bruker, 500.141 MHz)

#### AVANCE 500-Spektrometer (Bruker, 500.141 MHz)

#### UNITY 500-Spektrometer (Varian, 499.884 MHz)

5 mg der entsprechenden Verbindung wurden in 0,8 ml DMSO-d<sub>6</sub> (99,95 %-D, CIL) bzw. CDCl<sub>3</sub> (99,8 %-D, CIL) gelöst, filtriert und in 5-mm-NMR-Röhrchen überführt. Alle <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C- chemischen Verschiebungen wurden auf internes TMS bei 0 ppm referenziert. Alle Experimente wurden bei 300 K durchgeführt. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch kombinierte Analyse von eindimensionalen <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und zweidimensionalen H,H-COSY-, ROESY- und HMQC-NMR-Spektren. Kleinbuchstaben haben folgende Bedeutung: s - Singulett, d - Dublett, dd - doppeltes Dublett, t - Triplett, m - Multiplett, q - Quartett, br.s -

breites Singulett, br.d - breites Dublett. Die Angabe der vicinalen Kopplungskonstanten J erfolgt in Hertz (Hz).

**MS-Messungen: VG-BIOQ Massenspektrometer (Fisons Instruments)**

Die Massenspektren wurden an einem Spektrometer mit Elektrospray Interface aufgenommen. In einem konstanten Fluß von 4µl/min von Methanol/Wasser (1:1 v/v) wurden 2µl Probelösung über ein Schleifendosierventil direkt in die Quelle injiziert.

**CE-Elektropherogramme: BioFocus™ 3000 (Bio-Rad Laboratories)**

Alle Analysen wurden mit einer ungecoateten Kapillare ( Ø 50µm, Länge 45,5cm) und einem anliegenden Strom von 15kV durchgeführt. Sowohl die Proben, als auch die Cartridge Temperatur wurde auf 25°C eingestellt. Als Puffer wurde eine mit HCl auf pH 8,5 eingestellte 0,1m Borax (Natriumtetraborat) Lösung verwendet.

**Chromatographie: Kieselgel der Firma Merck (Darmstadt)**

Für die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Kieselgel-Fertigplatten F<sub>254</sub> (Schichtdicke 0,2mm) mit folgenden Laufmittelsystemen (in Volumenanteilen) verwendet:

<b>A</b>	Benzol : Aceton : Essigsäure	25 : 10 : 0,5
<b>B</b>	Chloroform : Methanol	9 : 1
<b>C</b>	Essigester : Pyridin : Essigsäure : Wasser	90 : 15 : 4,5 : 8,3
<b>D</b>	Butan-1-ol : Eisessig : Wasser : Essigester	1 : 1 : 1 : 1
<b>E</b>	Butan-2-ol : Ameisensäure : Wasser	75 : 15 : 20
<b>F</b>	Butan-1-ol : Pyridin : Eisessig : Wasser	30 : 20 : 6 : 24

Die Chromatogramme wurden mit einer 0,2%igen Ninhydrinlösung in Aceton und anschließend nach der Chlor/Kaliumjodid-Stärke-Technik bzw. im Falle der Z-geschützten Verbindungen nur nach der letzteren Methode entwickelt.

Für die semipräparative säulenchromatographische Trennung wurde Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Korngröße 0,063-0,02) benutzt. Die Säulen wurden im allgemeinen mit leichtem Überdruck betrieben.

Alle Chemikalien entstammen kommerziellen Quellen und wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Lösungsmittel wurden generell analyserein eingesetzt.

---

## 6.2.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

### 6.2.2.1 Synthese von Aminosäure- und Peptidderivaten

#### 6.2.2.1.1 Einführung von $\alpha$ -Aminoschutzgruppen

##### Synthese von Boc-Aminosäuren

10 mMol Aminosäure oder Aminosäurederivat in 30 ml Dioxan/Wasser (2:1) und 10 ml 1N Natronlauge werden unter Eiskühlung und Rühren mit 11 mMol Di-tert.-butyldicarbonat versetzt. Die Mischung wird ca. 1 h bei RT gerührt und anschließend das Dioxan in Vakuum abgedampft. Die alkalische wäßrige Lösung wird 2mal mit Petrolether zur Entfernung des überschüssigen Di-tert.-butyldicarbonats ausgeschüttelt. Anschließend wird unter Eiskühlung und Überschichten mit Essigester mit einer möglichst konzentrierten  $\text{KHSO}_4$ -Lösung bis pH 2-3 angesäuert. Die abgetrennte wäßrige Phase wird noch 2mal mit Essigester extrahiert. Die vereinten Essigesterextrakte werden mehrmals mit Sole gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Der erhaltene Rückstand wird aus einem geeigneten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch umkristallisiert.

Mit dieser Methode wurden Boc-Ala-OH und Boc-D-Ala-OH hergestellt.

##### Synthese von Z-Aminosäuren

50 mMol Aminosäure oder Aminosäurederivat in 25 ml 2N Natronlauge werden unter Eiskühlung und kräftigem Rühren innerhalb von 1 h mit 55 mMol Chlorameisensäurebenzylester und 27,5 ml 2N Natronlauge behandelt (evtl. ausgefallenes kristallines Produkt wird durch Zugabe von Wasser wieder in Lösung gebracht). Danach läßt man ca. 1 h bei RTiterrühren. Die basische Reaktionslösung wird zunächst 4mal mit Petrolether ausgeschüttelt und danach unter Eiskühlung, Überschichten mit Essigester und Rühren mit 2N Salzsäure bis pH 2 angesäuert. Die abgetrennte wäßrige Phase wird noch 2mal mit Essigester extrahiert. Die vereinten Essigesterextrakte werden mehrmals mit Sole gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird aus einem geeigneten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch umkristallisiert.

Es wurden Z-Ala-OH und Z-Nle-OH nach dieser Methode synthetisiert.

#### 6.2.2.1.2 Synthese von Aminosäuremethylestern

Zu 60 ml absolutem Methanol werden bei  $-10^\circ\text{C}$  unter Rühren innerhalb von 0,5 bis 1h 16 ml Thionylchlorid zugetropft und gleichzeitig Portionsweise 0,2 Mol Aminosäure zugegeben. Anschließend wird 3h bei  $30-40^\circ\text{C}$  (Wasserbad) und nach Zugabe von nochmals 2 ml Thionylchlorid weiter über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird danach im Vakuum

abgedampft, der Rückstand noch 2mal in jeweils 30 ml absolutem Methanol gelöst und erneut eingengt. Nach dem Ausfällen mit Ether wird filtriert und gründlich mit Ether gewaschen. Der Methylester wurde u.a. bei H-Ala-OMe \* HCl und H-Orn(Z)-OMe \* HCl nach dieser Methode eingeführt.

#### 6.2.2.1.3 Mischanhydrid-Methode

2,5 mMol der entsprechenden Boc-oder Z-Aminosäure wurden in 10 ml EE/THF (3:1) gelöst und auf -15°C gekühlt. Nach dem Versetzen der Lösung mit jeweils 2,5 mMol N-Ethylmorpholin (NEM) und Chlorameisensäure-isobutylester (CAIBE) wurde weitere 15 min bei -15°C gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,75 mMol der entsprechenden Aminkomponente als freie Verbindung oder als Hydrochlorid, wobei im letzteren Fall 2,75 mMol NEM zur Freisetzung des Amins zugegeben werden muß. Die erhaltene Reaktionslösung wurde 1 h bei -15 °C und anschließend weitere 15 h bei RT gerührt. Nach dem Einengen des Lösungsmittelgemisches im Vakuum wird der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und je 3mal mit Sole, 5% KHSO<sub>4</sub>-Lösung und gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Das Neutralwaschen der Lösung erfolgte ebenfalls mit Sole. Danach wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Zur Kristallisation wird der Rückstand in einer geringen Menge eines geeigneten Lösungsmittels aufgenommen und anschließend mit einem zweiten Lösungsmittel (z.B. Petrolether) bis zur Trübe versetzt. Das erhaltene Produkt wird abgesaugt, sorgfältig mit kaltem Petrolether gewaschen und gegebenenfalls umkristallisiert.

#### 6.2.2.1.4 Aktivester-Methode

Nach dem Lösen (Suspendieren) äquivalenter Mengen des geschützten aktivierten Esters (Boc-Ala-ONSU) und der Aminkomponente in einem geeigneten Lösungsmittel (Acetonitril) wurde bei 0°C und unter stetem Rühren 1 Äquivalent Triethylamin zugesetzt. Die Reaktionslösung wird 2h bei 0°C und weiter bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Bicarbonatlösung aufgenommen. Die basische Lösung wird mehrmals mit Essigester ausgeschüttelt, die wäßrige Phase mit 2 N HCl oder Zitronensäure auf pH 2 gebracht und erneut mit Essigester extrahiert. Die vereinten Essigesterextrakte werden anschließend mit Sole neutral gewaschen. Danach wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt.

#### 6.2.2.1.5. Darstellung von Z-Ala-nitroaniliden und -fluoraniliden mittels POCl<sub>3</sub> und Pyridin

Die Synthese der Z-Ala-nitroanilide und -fluoranilide erfolgte in Anlehnung an Arbeiten von MERZ et al. <sup>[145]</sup> und KÖNIG et al. <sup>[146]</sup>.

Zu einer Lösung von 0,04 mMol Z-Ala-OH und 0,04 mMol frisch destilliertem oder umkristallisiertem Nitro- bzw. Flouranilin in 150 ml absol. THF werden bei -15 °C 0,04 mMol POCl<sub>3</sub> zugegeben. Unter kräftigem Rühren wird anschließend tropfenweise 0,08 mMol frisch destilliertes Pyridin zugesetzt. Man läßt den Ansatz auf RT kommen und noch mindestens 5 h weiter rühren, setzt dann einige ml Wasser hinzu und engt im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Essigester gelöst und nacheinander mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, 2N HCl und Sole ausgeschüttelt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, eingengt und zur Kristallisation gebracht.

#### 6.2.2.1.6. Uroniumsalz-Methode

2 mMol N-geschützte Aminosäure, 2 mMol TBTU, 2 mMol HOBT und 2 mMol der C-terminal geschützten Aminkomponente werden in 3 ml DMF gelöst und auf 0°C gekühlt. Unter Rühren wird 4 mMol NEM zugesetzt und weitere 0,5 h bei 0°C belassen. Anschließend wird die Lösung auf RT gebracht und über Nacht weitergerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum etwas eingengt. Der Rückstand wird in ca. 15 ml Wasser aufgenommen und das DMF/H<sub>2</sub>O-Gemisch 3 mal mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinten Essigesterphasen werden nacheinander mit Sole, 2N HCl, Sole und NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Anschließend wird die Essigesterphase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, eingengt und das erhaltene Produkt mit einem geeigneten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch zur Kristallisation gebracht.

### 6.2.2.2 Deblockierung des N-Terminus

#### 6.2.2.2.1 Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

##### Deblockierung mittels HCl in Essigester

10 mMol des Boc-geschützten Aminosäure- bzw. Peptidderivates werden in einem 3fach molaren Überschuß mit 4N HCl/Essigester-Lösung gelöst und bei RT belassen. Nach vollständiger Deblockierung (DC-Kontrolle) wird das entstandene Hydrochlorid (evtl. nach vorherigem, teilweisem Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum) mit absol. Diethylether ausgefällt, nach mehrstündigem Stehen in der Kälte abfiltriert, gründlich mit absol. Diethylether gewaschen und im Vakuum über KOH/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Falls erforderlich, muß das Produkt nochmals aus einem geeigneten Lösungsmittelgemisch umgefällt werden.

### **Deblockierung mittels Ameisensäure**

Das Boc-geschützte Aminosäure- bzw. Peptidderivat wird mit einem 3fach molaren Überschuß an konzentrierter Ameisensäure mehrere Stunden bei RT belassen. Nach vollständiger Deblockierung (DC-Kontrolle) wird das entstandene Formiat (evtl. nach vorherigem, teilweisem Entfernen der Ameisensäure in Vakuum) mit absolutem Diethylether ausgefällt, nach mehrstündigem Stehen in der Kälte abfiltriert, gründlich mit absol. Diethylether gewaschen und im Vakuum über KOH/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet.

### **6.2.2.2 Entfernung der Z-Schutzgruppe**

#### **Katalytische Hydrierung**

1 g Z-geschützte Aminosäure- bzw. Peptidderivat wird unter einer Stickstoffatmosphäre in ca. 100 ml Methanol gelöst und mit 50-100 mg Palladiumschwarz-Katalysator versetzt. Danach wird unter Rühren bei RT mit Wasserstoff bis zur vollständigen Deblockierung behandelt (DC-Kontrolle). Nach beendeter Reaktion wird der Wasserstoff durch kurzzeitigen Stickstoffstrom ausgetrieben. Anschließend wird vom Katalysator abfiltriert, der Katalysator mit MeOH nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wird aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

#### **Abspaltung mittels HBr in Eisessig**

10 mMol des Z-geschützten Aminosäure- bzw. Peptidderivates wurden mit 15 ml eiskalter gesättigter Bromwasserstoff/Eisessig-Lösung gelöst und unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit bei RT belassen. Die Reaktion ist nach 15-120 min beendet (DC-Kontrolle). Nach weitgehender Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum fällt man das entstandene Hydrobromid durch Zugabe von absol. Diethylether aus. Nach mehrstündigem Stehen im Kühlschrank filtriert man ab, wäscht sorgfältig mit absol. Ether nach und trocknet das Produkt im Vakuum über KOH/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Meist muß das Produkt noch einmal aus einem geeigneten Lösungsmittelgemisch umgefällt werden.

### **6.2.2.3 Deblockierung des C-Terminus**

#### **Esterverseifung**

10 mMol des Peptidesters werden in 30 ml Aceton/Wasser (5:1) gelöst und unter Rühren mit 1,1 Äquivalenten 1N NaOH versetzt. Falls erforderlich, gibt man nach 1 h nochmals 0,1-0,2 Äquivalente 1N NaOH zu. Nach der vollständigen Verseifung des Esters (DC-Kontrolle) wird das organische Lösungsmittel im Vakuum verdampft, der Rest mit 15ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung verdünnt und 2mal mit je 10 ml Essigester extrahiert. Man stellt nun die wäßrige Phase unter Eiskühlung mit möglichst konzentrierter KHSO<sub>4</sub>-Lösung auf pH 2-3 ein und

extrahiert die Peptidsäure 3mal mit Essigester. Die vereinten Essigesterphasen werden 4mal mit Sole gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wird aus einem geeigneten Lösungsmittel oder -gemisch umkristallisiert.

### Hydrierung von Benzylestern

Die Hydrogenolyse von Peptidbenzylestern wurde in Analogie zur beschriebenen Entfernung von Z-Schutzgruppen durchgeführt. (vgl. 6.2.2.2.2) Die Arbeitsvorschrift zur katalytischen Hydrierung kann uneingeschränkt zur Deblockierung von Peptidbenzylestern angewendet werden.

## 6.2.3 Spezielle Synthesen

### 6.2.3.1 Darstellung von 2-Cyclohexylethylamin \* HCl

Eine von SPIELBERGER et al. <sup>[147]</sup> beschriebene Synthesvariante unter Verwendung von 2-Cyclohexylethylbromid führte in diesem Fall nicht zur gewünschten Verbindung, sondern zur quantitativen Bildung des entsprechenden sekundären Amins.

Deshalb erfolgte die Umsetzung von 3-Cyclohexylpropionsäure unter den Bedingungen einer *Schmidt*-Reaktion. Diese Variante lieferte das gewünschte Produkt in guter Ausbeute. <sup>[148]</sup>

In einem Dreihalskolben mit Rührer und Rückflußkühler mit Gasableitung werden zu einer Mischung aus 0,1 Mol 3-Cyclohexylpropionsäure, 50 ml konz. Schwefelsäure und 150 ml Chloroform bei RT unter lebhaftem Rühren 0,12 Mol Natriumazid in kleinen Portionen so zugesetzt, daß die Reaktion nicht zu heftig wird. Ist das Natriumazid völlig gelöst, erhitzt man in einem Wasserbad unter weiterem Rühren noch 6 h bei 50°C. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch auf 400 g zerstoßenes Eis gegossen, gut durchmischt und die Chloroformschicht sorgfältig abgetrennt. Anschließend wird die wäßrige Phase unter Kühlung mit konzentrierter Natronlauge stark alkalisch gemacht (pH 9) und destilliert das Amin mit Wasserdampf in eine Vorlage, die mit verdünnter Salzsäure gefüllt ist. Daraus läßt sich das 2-Cyclohexylethylamin \* HCl durch Eindampfen im Vakuum gewinnen.

$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_{11} \cdot \text{HCl}$	
Summenformel	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N} \cdot \text{HCl}$
MG [g/mol]	163,69
Ausbeute	5,5% d.Th.
MS [M+H] <sup>+</sup>	128,1
Fp.	65-69 °C
[α] <sub>D</sub>	+12 °
DC	(D) 0,51; (E) 0,54; (F) 0,66

### 6.2.3.2 Darstellung von 3-Aminobiphenyl \* HCl

Die Synthese wurde an Anlehnung einer Arbeitsvorschrift von CADE et al. <sup>[149]</sup> durchgeführt.

5,02 mMol 3-Nitrobiphenyl und 15,51 mMol  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  werden vorsichtig in 40 ml absolutem Alkohol gelöst und unter Rühren und Rückfluß 8 h lang erhitzt. Anschließend wird der Alkohol abdestilliert und der Rückstand in wenig Wasser gegossen. Zur Befreiung der Base wird mit NaOH-Lösung versetzt und mehrmals mit Ether extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinten Etherphasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird das 3-Aminobiphenyl \* HCl mit einer wasserfreien 4N HCl/Ether-Lösung gefällt.



Summenformel	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N} \cdot \text{HCl}$	Fp.	40-43 °C
MG [g/mol]	205,68	$[\alpha]_D$	+35 °
Ausbeute	71,2% d. Th.	DC	(D) 0,21; (E) 0,14; (F) 0,35
MS $[\text{M}+\text{H}]^+$	170,4		

### 6.2.3.3 Darstellung von L-Alanin-ethanolamid

Das Problem bei dieser Synthese besteht darin, daß das als Aminkomponente hinzugesetzte Ethanolamin über 2 funktionellen Gruppen verfügt.

Eine erfolgreiche Variante ergab sich durch den Einsatz von Trimethylchlorsilan. Die von DEIMER et al. <sup>[150]</sup> für Aminosäuren und Peptide beschriebene Methode zur Blockierung von Alkoholfunktionen ließ sich ausgezeichnet auf das bifunktionelle Ethanolamin anwenden.

0,1 Mol Ethanolamin werden in 120 ml absol. Chloroform mit 0,2 Mol Trimethylchlorsilan zum Sieden erhitzt. Nach der Entfernung der Heizung werden 0,2 Mol Triethylamin so schnell zugetropft, wie es der Rückfluß erlaubt. Die Lösung wird noch weitere 5 min gerührt und kann anschließend zur Synthese weiterverwendet werden.

Der entstandene N-Trimethyl-silyl-2-amino-ethanol-trimethyl-silylester ließ sich ohne Isolierung weiterverwenden. Die Umsetzung mit Z-geschütztem Alanin über die Aktivestermethode (vgl. 6.2.2.1.4) führte zur selektiven Amidierung. Bei der anschließenden Aufarbeitung erfolgte gleichzeitig die Deblockierung der Alkoholfunktion, so daß das Z-geschützte L-Alanin-ethanolamid in DC einheitlicher Form aus einem MeOH/DIPE-Gemisch gewonnen werden konnte.

Die abschließende Abspaltung der Z-Schutzgruppe erfolgte durch katalytische Hydrierung zur gewünschten Verbindung. (vgl. 6.2.2.2.2)

Z-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH					
Summenformel	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Fp.	107-109 °C		
MG [g/mol]	266,37	[α] <sub>D</sub>	-14 °		
Ausbeute	51,3% d. Th.	DC	(A) 0,08; (B) 0,29; (C) 0,56		
MS [M+H] <sup>+</sup>	267,2				

H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH					
Summenformel	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fp.	78-80 °C		
MG [g/mol]	123,17	[α] <sub>D</sub>	+2 °		
Ausbeute	75,4% d. Th.	DC	(D) 0,36; (E) 0,16; (F) 0,35		
MS [M+H] <sup>+</sup>	133,0	NMR	s. A.		

### 6.3 Charakterisierung der Substanzen

#### 6.3.1 Aminosäureamide

##### 6.3.1.1 Aminosäureamide mit aliphatischen Resten

Alle hier aufgeführten Verbindungen wurden mit der Mischanhydridtechnik unter Verwendung von Boc-Ala-OH und dem entsprechenden Amin synthetisiert. Die Amine lagen alle in Form ihrer Hydrochloride vor.

Einzige Ausnahme bei der Synthese bildet das Alaninamid, das nach der Methode von NOZAKI et al.<sup>[151]</sup> mittels EEDQ und NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> hergestellt wurde.

Die acidolytische Deblockierung erfolgte mit einer 4N HCl/EE-Lösung, nur im Falle des Alanindodecylamids und des 5-Aminopentanylalanins wurde die Abspaltung mit Ameisensäure realisiert.

Tab. 39 Analytische Daten der Alaninalkylamide

Verbindung	Summenformel MG [g/mol] Ausbeute [%]	Fp. [°C] [α] <sub>D</sub> [°]	R <sub>f</sub> -Wert	MS MG [g/mol] [M+H] <sup>+</sup>	NMR
H-Ala- -NH <sub>2</sub> * HCl	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> OCl 124,65 35	135-145 +8	0,31 (D) 0,25 (E) 0,41 (F)	88,1 89,2	-
-NH-CH <sub>3</sub> * HCl	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> OCl 138,59 3	222-224 +12	0,29 (D) 0,17 (E) 0,38 (F)	102,0 102,7	s. A.

-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * HCl	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> OCl 152,62 12	82-84 +10	0,47 (D) 0,31 (E) 0,49 (F)	116,0 117,1	s. A.
-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> * HCl	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> OCl 152,62 38	235-238 -24	0,35 (D) 0,27 (E) 0,46 (F)	116,0 117,1	-
-N(CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * HCl	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> OCl 180,67 55	amorph -16	0,43 (D) 0,31 (E) 0,49 (F)	144,1 145,0	s. A.
-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -CH <sub>3</sub> * HCOOH	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 302,46 65	57-59 +3	0,68 (D) 0,55 (E) 0,70 (F)	256,2 257,3	-
H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ala-OH * HCOOH	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 234,25 58	189-192 -20	0,51 (D) 0,43 (E) 0,69 (F)	188,1 189,1	-

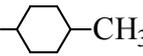
### 6.3.1.2 Aminosäureamide mit cyclischen nichtaromatischen Resten

Die Darstellung der Verbindungen erfolgte mit der Mischanhydrid-Methode, durch Verknüpfung von Boc-Ala-OH mit Piperidin, Pyrrolidin bzw. den entsprechenden Cyclohexylaminderivaten. Nach den Aufarbeitungen der Reaktionsansätze lagen fast alle geschützten Zwischenverbindungen in DC einheitlicher Form vor. Nur im Falle des Boc-Ala-*p*-methylcyclohexylamids mußte eine Trennung an Kieselgel mit einem EE/PE-Eluenten (3:7 v/v) durchgeführt werden. Zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe hat sich eine Behandlung mit Ameisensäure bewährt.

Bei der Umsetzung von *meta*-, und *para*-Methylcyclohexylamin zu den entsprechenden Produkten mußte auf ein *cis/trans*-Gemisch der Amine zurückgegriffen werden. Auf eine Auftrennung der beiden Isomeren wurde verzichtet, so daß auch die Produkte wahrscheinlich in einem *cis/trans*-Gemisch vorlagen. Die exakten Anteile von Haupt- und Nebenisomer wurden mittels NMR bestimmt (vgl. Anhang).

Tab. 40 Analytische Daten von Aminosäureamiden mit cyclischen nichtaromatischen Resten

Verbindung	Summenformel MG [g/mol] Ausbeute [%]	Fp. [°C] [α] <sub>D</sub> [°]	R <sub>f</sub> -Wert	MS MG [g/mol] [M+H] <sup>+</sup>	NMR
-N  * HCl	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> OCl 192,69 25	210-212 +8	0,37 (D) 0,24 (E) 0,49 (F)	156,1 156,9	s. A.
-NH  * HCOOH	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 216,28 78	138-140 +11	0,60 (D) 0,51 (E) 0,71 (F)	170,0 171,1	s. A.

$\text{-NH-}$  $\text{-CH}_3$ * HCOOH	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ 230,30 48	122-127 +13	0,61 (D) 0,56 (E) 0,72 (F)	184,1 185,1	s. A.
 $\text{-NH-}$ * HCOOH	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ 230,30 45	147-150 +18	0,62 (D) 0,50 (E) 0,67 (F)	184,1 185,1	s. A.
$\text{-NH-CH}_2\text{-}$  * HCOOH	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ 230,30 39	110-112 +4	0,56 (D) 0,48 (E) 0,60 (F)	184,1 185,1	s. A.
$\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$  * HCOOH	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ 244,33 12	76-80 +20	0,59 (D) 0,45 (E) 0,72 (F)	198,1 199,2	s. A.

### 6.3.1.3 Aminosäurearylamide

Die Grundstruktur aller dieser Verbindungen ist das Alaninanilid. Durch Substitution einzelner Wasserstoffatome am Ringsystem erhält man die entsprechenden *para*-, *meta*- und *ortho*-Verbindungen. Allerdings ist eine direkte Substitution am Arylsystem für die Darstellung der Substanzen ungeeignet, so daß auch hier die Methode der gemischten Anhydride, unter Verwendung von Boc-Ala-OH und dem entsprechenden Arylaminderivaten, eine geeignete Synthesvariante darstellt.

Unter Anwendung dieser Methode ließen sich in guten Ausbeuten das Alaninanilid, die drei Alanin-toluidide und -chloranilide, sowie die drei Phenylanilide herstellen. Ebenfalls nach dieser Methode wurden das Alanin-*para*-Fluoranilid, das Benzylamid-, das di-Benzylamid-, das *para*-Methylbenzylanilid- und das *para*-Nitrobenzylanilid- Derivat dargestellt.

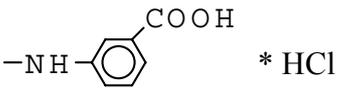
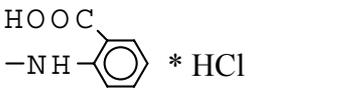
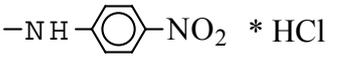
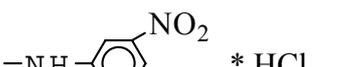
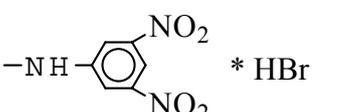
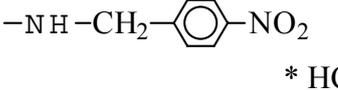
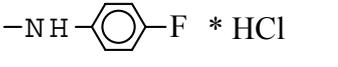
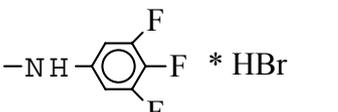
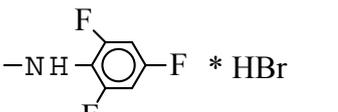
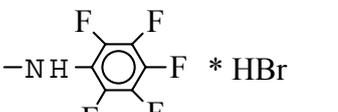
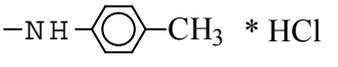
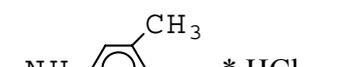
Für die Synthese der Aminobenzoesäure-Derivate erwies sich die Aktivester-Methode als geeignet. Allerdings mußte hier nach der Aufarbeitung der Reaktionsansätze in jedem Fall eine säulenchromatographische Trennung an Kieselgel durchgeführt werden. EE/PE-Gemische haben sich hier als Eluenten und zur Umkristallisation für die Boc-geschützte Aminobenzoesäure-Derivate bewährt.

Als erheblich aufwendiger erwiesen sich die Synthesen der Nitroanilide, des 3,5 Dinitroanilids, sowie der mehrfachsubstituierten Fluoranilide. Während das *para*-Nitroanilind-Derivat noch mit der Isocyanant-Methode<sup>[152]</sup> in relativ guten Ausbeuten hergestellt werden kann, versagt diese Methode bei den entsprechenden *meta*-, *ortho*- und mehrfachsubstituierten Arylaminen. Auch die Mischanhydrid- und die Aktivester-Methode, sowie der Einsatz von Uroniumsalzen führte in diesen Fällen nicht zum gewünscht Produkt.<sup>[153]</sup> Nur unter Verwendung von Z-Ala-OH, POCl<sub>3</sub>, Pyridin und dem entsprechenden Amin ließen sich diese Derivate in guten Ausbeuten synthetisieren. Zur Reinigung war eine säulenchromatographische Trennung an Kieselgel für alle 4 der Nitoanilin-Verbindungen

erforderlich. Die Eluentzusammensetzung lag in einem Bereich zwischen 90:10 und 99:01 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH v/v). Die Deblockierung der Z-geschützten Derivate erfolgte mit HBr/Eisessig, da besonders die Fluor-Derivaten bei einer katalytische Hydrierung zur Zersetzung neigen.

Tab.41 Physikalische Eigenschaften von H-Ala-arylamiden

Verbindung	Summenformel MG [g/mol] Ausbeute [%]	Fp. [°C] [α] <sub>D</sub> [°]	R <sub>F</sub> -Wert	MS MG [g/mol] [M+H] <sup>+</sup>	NMR
H-Ala- -NH-  * HCl	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> OCl 200,67 50	235-245 +8	0,42 (D) 0,36 (E) 0,54 (F)	164,2 165,3	s. A.
-N(  )   CH <sub>3</sub> * HCOOH	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 224,26 18	136-145 -28	0,40 (D) 0,29 (E) 0,51 (F)	178,1 179,1	-
-NH-CH <sub>2</sub> -  * HCl	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> OCl 214,83 65	140-141 +10	0,51 (D) 0,45 (E) 0,56 (F)	178,1 179,1	s. A.
-N(  )   CH <sub>2</sub> -  * HCl	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> OCl 304,82 42	185-195 -30	0,42 (D) 0,36 (E) 0,50 (F)	268,1 269,1	s. A.
-NH-  -Cl * HCl	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> OCl <sub>2</sub> 235,11 55	39-40 +2	0,48 (D) 0,55 (E) 0,64 (F)	198,0 201,0 <sup>[37Cl]</sup> 199,0 <sup>[35Cl]</sup>	s. A.
-NH-  -Cl * HCl	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> OCl <sub>2</sub> 235,11 63	88-90 +2	0,62 (D) 0,50 (E) 0,66 (F)	198,0 201,3 <sup>[37Cl]</sup> 199,3 <sup>[35Cl]</sup>	s. A.
-NH-  -Cl * HCl	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> OCl <sub>2</sub> 235,11 69	212-215 +4	0,62 (D) 0,47 (E) 0,66 (F)	198,0 201,3 <sup>[37Cl]</sup> 199,3 <sup>[35Cl]</sup>	s. A.
-NH-  * HCl	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> OCl 276,76 55	238-245 +99	0,62 (D) 0,52 (E) 0,59 (F)	240,3 241,3	s. A.
-NH-  * HCl	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> OCl 276,76 46	92-100 +12	0,62 (D) 0,56 (E) 0,57 (F)	240,3 241,3	s. A.
-NH-  * HCl	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> OCl 276,76 75	138-145 -22	0,62 (D) 0,53 (E) 0,60 (F)	240,3 241,2	s. A.
-NH-  -COOH * HCl	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl 244,67 29	238-249 +10	0,61 (D) 0,48 (E) 0,58 (F)	208,2 209,2	s. A.

 * HCl	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl 244,67 33	183-186 -4	0,59 (D) 0,42 (E) 0,61 (F)	208,2 209,3	s. A.
 * HCl	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl 244,67 45	240-251 -60	0,45 (D) 0,36 (E) 0,58 (F)	208,2 209,1	s. A.
 * HCl	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Cl 245,66 21	182-187 -10	0,61 (D) 0,45 (E) 0,65 (F)	209,2 210,3	s. A.
 * HCl	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Cl 245,66 36	120-128 +2	0,59 (D) 0,41 (E) 0,66 (F)	209,2 210,2	s. A.
 * HBr	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Br 290,11 32	195-200 -126	0,63 (D) 0,42 (E) 0,67 (F)	209,2 210,1	s. A.
 * HBr	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> Br 335,11 27	205-225 -1	0,63 (D) 0,48 (E) 0,65 (F)	254,2 255,3	s. A.
 * HCl	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Cl 259,69 55	179-183 +14	0,59 (D) 0,47 (E) 0,68 (F)	220,2 221,3	-
 * HCl	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> OFCI 218,65 62	101-104 +8	0,52 (D) 0,49 (E) 0,63 (F)	182,2 183,2	s. A.
 * HBr	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OF <sub>3</sub> Br 299,09 36	89-99 0	0,64 (D) 0,53 (E) 0,67 (F)	218,2 219,3	s. A.
 * HBr	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OF <sub>3</sub> Br 299,09 25	185-186 +31	0,50 (D) 0,54 (E) 0,78 (F)	218,2 219,2	s. A.
 * HBr	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> OF <sub>5</sub> Br 335,07 45	204-207 +36	0,52 (D) 0,62 (E) 0,65 (F)	254,1 255,2	s. A.
 * HCl	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> OCl 214,69 46	185-193 +33 (c=0,5)	0,51 (D) 0,47 (E) 0,62 (F)	178,2 179,3	s. A.
 * HCl	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> OCl 214,69 50	124-126 +10	0,61 (D) 0,49 (E) 0,65 (F)	178,2 179,2	s. A.
 * HCl	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> OCl 214,69 63	216-218 +28	0,59 (D) 0,44 (E) 0,61 (F)	178,2 179,2	s. A.

$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$ * HCl	$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{OCl}$ 228,72 39	189-206 +18	0,55 (D) 0,40 (E) 0,59 (F)	192,3 193,2	s. A.
--	--	----------------	----------------------------------	----------------	-------

### 6.3.2 Dipeptide und Dipeptidderivate

Die hier aufgeführten Verbindungen wurden zu einem großen Teil mit der Mischanhydrid-technik dargestellt. Einzig die beiden Norleucin-Peptide wurden unter Verwendung von TBTU/HOBT (Uroniumsalz-Methode) synthetisiert.

**Tab.42** Physikalische Eigenschaften von Peptiden und Peptidderivaten

Verbindung	Summenformel MG [g/mol] Ausbeute	Fp. [°C] [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> [°]	R <sub>f</sub> -Wert	MS MG [g/mol] [M+H] <sup>+</sup>	NMR
H-Lys(Ac)-Ala-OH * HCl	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{Cl}$ 295,77 45	138-155 +8	0,25 (D) 0,37 (E) 0,59 (F)	259,3 260,3	-
Z-Lys(Z)-Ala-OH	$\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$ 485,53 36	142-145 -16	0,09 (A) 0,36 (B) 0,56 (C)	485,2 486,2	-
H-D-Ala-D-Lys-OH	$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ 217,27 61	187-195 -45	0,36 (D) 0,42 (E) 0,44 (F)	217,3 218,2	-
H-Nle-Pro-OH	$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ 228,29 33	189-204 +16	0,38 (D) 0,40 (E) 0,44 (F)	228,1 229,1	-
H-Nle-Ala-OH	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ 202,25 42	206-215 +5	0,38 (D) 0,42 (E) 0,51 (F)	202,1 203,3	-
H-D-Tyr(Bzl)-Ala-OH *HCOOH	$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$ 388,42 22	203-226 -56 (AcOH)	0,25 (D) 0,31 (E) 0,42 (F)	342,1 343,3	-

Alle weiteren in dieser Arbeit untersuchten Dipeptide und Dipeptidderivate wurden von der Arbeitsgruppe bereitgestellt.

---

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] ADIBI SA: The oligopeptide transporter (PEPT-1) in human intestine: Biology and function. *Gastroenterology*, **113**, 332-340 (1997)
- [2] FRICKER G & DREWE J: Current concepts in intestinal peptide absorption. *J. Pept. Sci.*, **2**, 195-211 (1996)
- [3] DANIEL H: Function and molecular structure of brush border membrane peptide/H<sup>+</sup> symporter. *J. Membrane Biol.*, **154**, 197-203 (1996)
- [4] GANAPATHY V & LEIBACH FH: Peptide transporters. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **5**, 395-400 (1996)
- [5] LEIBACH FH & GANAPATHY V: Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu. Rev. Nutr.*, **16**, 99-119 (1996)
- [6] KRAMER W, GUTJAHR U, KOWALEWSKI S & GIRBIG F: Interaction of the orally dianionic cephalosporin cefixime with the uptakesystem for oligopeptides and  $\alpha$ -amino- $\beta$ -lactam antibiotics in rabbit small intestine. *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 542-546 (1995)
- [7] WALTER E & KISSEL T: Transepithelial transport and metabolism of thyrotropin-releasing hormone (THR) in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2): Evidence for an active transport component? *Pharm. Res.*, **11**, 1575-1580 (1994)
- [8] GAN L-SL, NIEDERER T, EADS C & THAKKER D: Evidence for predominantly paracellular transport of thyrotropin-releasing hormone across Caco-2 cell monolayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 771-777 (1993)
- [9] INUI K-I, TOMITA Y, KATSURA T, OKANO T, TAKANO M & HORI R: Coupled active transport of bestatin via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**, 482-486 (1992)
- [10] BAI JPF & AMIDON GL: Structural specificity of mucosal-cell transport and metabolism of peptide drugs: Implication for oral peptide drug delivery. *Pharm. Res.*, **9**, 969-978 (1992)
- [11] SWAAN PW & TUKKER JJ: Molecular determinants of recognition for the intestinal peptide carrier. *J. Pharm. Sci.*, **86**, 596-602 (1997)
- [12] WALTER E, KISSEL T & AMIDON GL: The intestinal peptide carrier: A potential transport system for small peptide derived drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **20**, 33-58 (1996)
- [13] CZIHAK G, LANGER H & ZIEGLER H (Hrsg.): in „Biologie“, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin (1990)
- [14] LUKAS ML, SCHNEIDER W, HABERICH HJ & BLAIR JA: Direct measurement by pH-microelectrode of the pH microclimate in rat proximal jejunum. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **192**, 39-48 (1975)
- [15] JONKMAN JHG & HUNT CA: Ion pair absorption of ionized drugs – fact or fiction? *Pharm. Weekbl. Scientific Edition*, **5**, 41-47 (1983)

- 
- [16] BUCHER O: in „Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen“, 11. Auflage, Verlag Hans Huber, Bern (1998)
- [17] KARARLI TT: Gastrointestinal absorption of drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **6**, 39-86 (1989)
- [18] GANAPATHY V, BRANDSCH M & LEIBACH FH: Physiology of the gastrointestinal tract. in: L.R. Johnson, (ed.) *Intestinal transport of amino acids and peptides*, 3rd ed., vol. **52**, Raven Press, New York, 1773-1794 (1994)
- [19] DYER J, BEECHEY RB, GORVEL RB, SMITH JP, WOOTON R & SHIRAZI-BEECHEY SP: Glycyl-L-Proline transport in rabbit enterocyte basolateral-membran vesicles. *J. Biochem.*, **269**, 565-571 (1990)
- [20] GANAPATHY V, MENDICINO JF & LEIBACH FH: Transport of Glycyl-L-Proline into intestinal and renal brush border vesicles from rabbit. *J. Biol. Chem.*, **256**, 118-124 (1981)
- [21] MEREDITH D & BOYD CAR: Oligopeptide transport by epithelial cells. *J. Membrane Biol.*, **145**, 1-12 (1995)
- [22] YAMASHITA T, SHIMADA S, GUO W, SATO K, KOHMURA E, HAYAKAWA T, TAKAGI T, TOHYAMA M: Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J. Biol. Chem.*, **272**, 10205-10211 (1997)
- [23] WANG H, FEI Y-J, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Electrophysiological characteristics of the proton-coupled peptide transporter PEPT2 cloned from rat brain. *Am. J. Physiol.*, **275**, C967-C975 (1998)
- [24] STEINER H-Y, SONG W, ZHANG L, NAIDER F, BEKER JM & STACEY G: An *Arabidopsis* peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. *Plant Cell*, **6**, 1289-1299 (1994)
- [25] DANIEL H & HERGET M: Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am. J. Physiol.*, **273**, F1-F8 (1997)
- [26] NUSSBERGER S, STEEL A, & HEDIGER MA: Structure and pharmacology of proton-linked peptide transport. *J. Contr. Rel.*, **46**, 31-38 (1997)
- [27] TSUJI A: Tissue selective drug delivery utilizing carrier-mediated transport systems. *J. Contr. Rel.*, **62**, 239-244 (1999)
- [28] SAY Y, TAMAI I, SUMIKAWA H, HAYASHI K, NAKANISHI T, AMANO O, NUMATA M, ISEKI S & TSUJI A: Immunolocalization and pharmacobiological relevance of oligopeptide transporter PEPT1 in intestinal absorption of  $\beta$ -lactam-antibiotics. *FEBS Letters*, **392**, 25-29 (1996)
- [29] THWAITES DT, BROWN CDA, HIRST BH & SIMMONS NL:  $H^+$ -coupled dipeptide (Glycylsarcosine) transport across apical and basal borders of human intestinal Caco-2 cell monolayers display distinctive. *Biochim. Biophys. Acta*, **1151**, 237-245 (1993)
- [30] TERADA T, SAWADA K, SAITO H, HASHIMOTO Y & INUI K-I: Functional

- characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am. J. Physiol.*, **276**, G1435-G1441 (1999)
- [31] FEI Y-J, KANAI Y, NUSSBERGER S, GANAPATHY V, LEIBACH FH, ROMERO MF, SINGH SK, BORON WF & HEDIGER MA: Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*, **368**, 563-566 (1994)
- [32] DÖRING F, DORN D, BACHFISCHER U, AMASHEH S, HERGET M & DANIEL H: Functional analysis of a chimeric mammalian peptide transporter derived from the intestinal and renal isoforms. *J. Physiol.(London)*, **497**, 773-779 (1996)
- [33] FEI Y-J, LIU J-C, FUJITA T, LIANG R, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Identification of a potential substrate binding domain in the mammalian peptide transporters PEPT1 and PEPT2 using PEPT1-PEPT2 and PEPT2-PEPT1 chimeras. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 39-44 (1998)
- [34] GANAPATHY V & LEIBACH FH: Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient? *Am. J. Physiol.*, **249**, G153-G160 (1985)
- [35] GANAPATHY V & LEIBACH FH: Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit. *J. Biol. Chem.*, **258**, 14189-14192 (1983)
- [36] BRANDSCH M, BRANDSCH C, GANAPATHY ME, CHEW CS, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H<sup>+</sup>/peptide cotransport systems in the intestine (PEPT1) and kidney (PEPT2). *Biochim. Biophys. Acta*, **1324**, 251-262 (1997)
- [37] BRANDSCH M, MIYAMOTO Y, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Expression and kinase c dependent regulation of peptide/H<sup>+</sup> co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. *Biochem. J.*, **299**, 253-260 (1994)
- [38] MACKENZIE B, LOO DDF, FEI Y-J, LIU W, GANAPATHY V, LEIBACH FH & WRIGHT EM: Mechanisms of the human intestinal H<sup>+</sup>-coupled oligopeptide transporter hPEPT1. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5430-5437 (1996)
- [39] DANIEL H & ADIBI SA: Functional separation of dipeptide transport and hydrolysis in kidney brush border membranes. *FASEB J.*, **10**, 753-759 (1994)
- [40] STEEL A, NUSSBERGER S, ROMERO MF, BORON WF, BOYD CAR & HEDIGER MA: Stoichiometry and pH dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PEPT1. *J. Physiol. (London)*, **498**, 563-569 (1997)
- [41] AMASHEH S, WENZEL U, BOLL M, DORN D, WEBER W-M, CLAUSS W & DANIEL H: Transport of charged dipeptides by the intestinal H<sup>+</sup>/peptide symporter PEPT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membrane Biol.*, **155**, 247-256 (1997)
- [42] CHEN X-Z, ZHU Z, SMITH DE & HEDIGER MA: Stoichiometry and kinetics of the high-affinity H<sup>+</sup>-coupled peptide transporter PEPT2. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2773-2779 (1999)
- [43] KRAMER W, DÜRCKHEIMER W, GIRBIG F, GUTJAHR U, LEIPE I & OEKONOMOPULOS R: Influence of amino acid side-chain modification on the uptake system for β-lactam

- antibiotics and dipeptides from rabbit small intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, **1028**, 174-182 (1990)
- [44] KRAMER W, GIRBIG F, PETZOLDT E & LEIPE I: Inactivation of the intestinal uptake system for  $\beta$ -lactam antibiotics by diethylpyrocarbonate. *Biochim. Biophys. Acta*, **943**, 288-296 (1988)
- [45] KATO M, MAEGAWA H, OKANO T, INUI K-I & HORI R: Effect of various chemical modifiers on  $H^+$ -coupled transport of cephadrine via dipeptidcarriers in rabbit intestinal brush border membranes; Role of histidin residues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**, 745-749 (1989)
- [46] TERADA T, SAITO H, MUKAI M & INUI K-I: Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by a rat  $H^+$ /peptide cotransporter, PEPT1. *FEBS Letters*, **394**, 196-200 (1996)
- [47] TERADA T, SAITO H & INUI K-I: Interaction of  $\beta$ -lactam antibiotics with histidine residue of rat  $H^+$ /Peptide cotransporters, PEPT1 and PEPT2. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5582-5585 (1998)
- [48] KRAMER W, GIRBIG F, GUTJAHR U & KOWALEWSKI S: The intestinal oligopeptide transporter. in: Amidon GL & Taylor MD (ed.) *Peptide-based drug design*, Washington, 149-180 (1995)
- [49] FEI Y-J, LIU W, PRASAD PD, KEKUDA R, OBLAK TG, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human  $H^+$ /Peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemistry*, **36**, 452-460 (1997)
- [50] RAMAMOORTHY S, LIU W, MA Y-Y, YANG-FENG TL, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Proton/peptide cotransporter (PEPT2) from human kidney: Functional characterization and chromosomal localization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1240**, 1-4 (1995)
- [51] MIYAMOTO Y, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Identification of histidyl and thiol groups at the active site of rabbit renal dipeptide transporter. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16133-16140 (1986)
- [52] LI J & HIDALGO IJ: Molecular modeling study of structural requirements for the oligopeptide transporter. *J. Drug Target.*, **4**, 9-17 (1996)
- [53] SWAAN PW, KOOPS BC, MORET EE & TUKKER JJ: Mapping the binding site of the small intestinal peptide carrier (PEPT1) using comparative molecular field analysis. *Receptors Channels*, **6**, 189-200 (1998)
- [54] DÖRING F, WILL J, AMASHEH S, CLAUSS W, AHLBRECHT H & DANIEL H: Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.*, **273**, 23211-23218 (1998)
- [55] BOLGER MB, HAWORTH IS, YEUNG AK, ANN D, VON GRAFENSTEIN H, HAMM-ALVAREZ S, OKAMOTO CT, KIM K-J, BASU SK, WU D & LEE VHL: Structure, function, and molecular modeling approaches to study of the intestinal dipeptide transporter PEPT1. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1286-1291 (1998)

- 
- [56] YEUNG AK, BASU SK, WU SK, CHU C, OKAMOTO CT, HAMM-ALVAREZ SF, VON GRAFENSTEIN H, SHEN W-C, KIM K-J, BOLGER MB, HAWORTH IS, ANN DK & LEE VHL: Molecular identification of a role for Tyrosine 167 in the function of the human intestinal proton-coupled dipeptide transporter (hPEPT1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **250**, 103-107 (1998)
- [57] LEE VHL, CHU C, MAHLIN ED, BASU SK, ANN DK, BOLGER MB, HAWORTH IS, YEUNG AK, WU SK, HAMM-ALVAREZ S & OKAMOTO CT: Biopharmaceutics of transmucosal peptide and protein drug administration: Role of transport mechanisms with a focus on the involvement of PEPT1. *J. Contr. Rel.*, **62**, 129-140 (1999)
- [58] FOGH J, FOGH JM & ORFEO T: One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**, 221-225 (1977)
- [59] PINTO M, ROBINE-LEON S, APPLAY M-D, KEDINGER M, TRIADOU N, DUSSAULX E, LACROIX B, SIMON-ASSMANN P, HAFFEN K, FOGH J & ZWEIBAUM A: Enterocyte-like differentiation and polarization of human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell*, **47**, 323-330 (1983)
- [60] HIDALGO IJ, RAUB TJ & BORCHARDT RT: Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, **96**, 736-749 (1989)
- [61] DELIE F & RUBAS W: A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **14**, 221-286 (1997)
- [62] BLAIS A, BISSONNETTE P & BERTELOOT A: Common characteristics for Na<sup>+</sup>-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. *J. Membrane Biol.*, **99**, 113-125 (1987)
- [63] HU M & BORCHARDT RT: Transport of a large neutral amino acid in a human intestinal epithelial cell line (Caco-2): uptake and efflux of phenylalanine. *Biochim. Biophys. Acta*, **1135**, 233-244 (1992)
- [64] GANAPATHY ME, BRANDSCH M, PRASAD PD, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Differential recognition of  $\beta$ -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. *J. Biol. Chem.* **270**, 25672-25677 (1995)
- [65] DIX CJ, HASSAN IF, ORBAY HY, SHAH R & WILSON G: The transport of vitamin B<sub>12</sub> through polarized monolayers of Caco-2 cells. *Gastroenterology*, **98**, 1272-1279 (1990)
- [66] FRIEDMAN DI & AMIDON GL: Characterization of the intestinal transport parameters for small peptide drugs. *J. Contr. Rel.*, **13**, 141-146 (1990)
- [67] ARTURSSON P, UNGELL A-L & LÖFROTH J-E: Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: Cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm. Res.*, **10**, 1123-1129 (1993)
- [68] YEE S: In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man - Fact or myth. *Pharm. Res.*, **14**, 763-766 (1997)

- 
- [69] DEIMER K-H: Peptidsynthese. *Houben-Weyl*, Vol. **XV/1**, 27-30 (1974)
- [70] Dissertation Beate Bretschneider, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2000)
- [71] CHENG, Y-C & PRUSOFF WH: Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 3099-3108 (1973)
- [72] THWAITES DT, MARKOVICH D, MURER H & Simmons NL:  $\text{Na}^+$ -independent lysin transport in human intestinal Caco-2 cells. *J. Membrane Biol.*, **151**, 215-224 (1996)
- [73] THWAITES DT, MCEWAN GTA & SIMMONS NL: The role of the proton electrochemical gradient in the transepithelial absorption of amino acids by human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Membrane Biol.*, **145**, 245-256 (1995)
- [74] GANAPATHY ME, HUANG W, WANG H, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Valacyclovir: A substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 470-475 (1998)
- [75] BALIMANE PV, TAMAI I, GUO A, NAKANISHI T, KITADA H, LEIBACH FH, TSUJI A & SINKO PJ: Direct evidence for peptide transporter (PEPT1)-mediated uptake of a nonpeptide prodrug, valacyclovir. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **250**, 246-251 (1998)
- [76] HAN H-K, DE VRUEH RLA, RHIE JK, COVITZ K-MY, SMITH PL, LEE C-P, OH D-M, SADEE W & AMIDON GL: 5'-Amino acid esters of antiviral nucleosides, Acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 peptide transporter. *Pharm. Res.*, **15**, 1154-1159 (1998)
- [77] GUO A, HU P, BALIMANE PV, LEIBACH FH & SINKO PJ: Interactions of a nonpeptidic drug, Valacyclovir, with the human intestinal peptide transporter (hPEPT1) expressed in a mammalian cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 448-454 (1999)
- [78] BÖRNER V, FEI Y-J, HARTRODT B, GANAPATHY V, LEIBACH FH, NEUBERT K & BRANDSCH M: Transport of amino acid aryl amides by the intestinal  $\text{H}^+$ /peptide cotransport system, PEPT1. *Eur. J. Biochem.*, **255**, 698-702 (1998)
- [79] IOANNIDES C, LEWIS DFV, TRINICK J, NEVILLE S, SERTKAYA NN, KAIBAF M, & GORROD JW: A rationale for the non-mutagenicity of 2- and 3-aminobiphenyls. *Carcinogenesis*, **10**, 1403-1407 (1989)
- [80] SUSTMANN R & KORTH H-G: Carbonsäuren. *Houben-Weyl*, Vol. **EV/1**, 196-201 (1985)
- [81] JAKUBKE H-D & JESCHKEIT H: in „Chemie“- ABC Brockhaus, VEB Brockhausverlag, Leipzig, 5. Auflage (1987)
- [82] HAMMETT LP: The effect of structures upon the reactions of organic compounds. Benzene derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 96-103 (1937)
- [83] BRANDSCH M, THUNECKE F, KÜLLERTZ G, SCHUTKOWSKI M, FISCHER G & NEUBERT K: Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal  $\text{H}^+$ /peptide symporter, PEPT1. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3861-3864 (1998)

- 
- [84] HAUPTMANN S: in „Organische Chemie“ VEB Deutscher Verlag für Grundstoff-industrie, Leipzig, 2. Auflage (1988)
- [85] SWAIN CG & LUPTON EC: Field and Resonance components of substituent effects. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 4328-4337 (1968)
- [86] HANSCH C, LEO A, UNGER SH, KIM KH, NIKAITANI D & LIEN EJ: „Aromatic“ substituent constants for structure-activity correlations. *J. Med. Chem.*, **16**, 1207-1216 (1973)
- [87] JAFFÉ HH: A re-examination of the Hammett equation. *Chem. Rev.*, **53**, 191-261 (1953)
- [88] GÜNTHER, H: in “NMR-Spektroskopie: Grundlagen und Anwendung der Protonen- und Kohlenstoff-13-Kernresonanz-Spektroskopie in der Chemie“, 3. neubearb. und erw. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart (1992)
- [89] MIYAMOTO Y, THOMPSON YG, HOWARD EF, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Functional expression of the intestinal peptide-proton co-transporter in *xenopus leavis* oocytes. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4742-4745 (1991)
- [90] BOLL M, MARKOVICH D, WEBER W-M, KORTE H, DANIEL H & MURER H: Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides,  $\beta$ -lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *Pflügers Arch.*, **429**, 146-149 (1994)
- [91] SAITO H, ISHII T & INUI K-I: Expression of human intestinal dipeptide transporter in *xenopus leavis* oocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 776-779 (1993)
- [92] TAMAI I, TOMIZAWA N, KADOWAKI A, TERASAKI T, NAKAYAMA K, HIGASHIDA H & TSUJI A: Functional expression of intestinal dipeptide/ $\beta$ -lactam antibiotic transporter in *xenopus leavis* oocytes, *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 881-888 (1994)
- [93] Diplomarbeit Ilka Knütter, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1998)
- [94] BRANDSCH M, KNÜTTER I, THUNECKE F, HARTRODT B, BORN I, BÖRNER V, HIRCHE F, FISCHER G & NEUBERT K: Decisive structural determinants for the interaction of proline derivatives with intestinal  $H^+$ /peptide symporter. *Eur. J. Biochem.*, **266**, 1-8 (1999)
- [95] TAMURA K, BHATNAGAR PK, TAKATA JS, LEE C-P, SMITH PL & BORCHARDT RT: Metabolism, uptake, and transepithelial transport of the diastereomers of Val-Val in the human intestinal cell line, Caco-2. *Pharm. Res.*, **13**, 1213-1218 (1996)
- [96] LISTER N, SYKES AP, BAILEY PD, BOYD CAR & BRONK JR: Dipeptide transport and hydrolysis in isolated loops of rat small intestine: Effects of stereospecificity. *J. Physiol. (London)*, **484**, 173-182 (1995)
- [97] BAI JPF, SUBRAMANIAN P, MOSBERG HI & AMIDON GL: Structural requirements for the intestinal mucosal-cell peptide transporter: The need for N-terminal  $\alpha$ -amino group. *Pharm. Res.*, **8**, 593-599 (1991)

- 
- [98] DANIEL H, E.L. MORSE EL & ADIBI SA: Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H<sup>+</sup> symporter in the renal brush border membrane. *J. Biol. Chem.*, **267**, 9565-9573 (1992)
- [99] SMITH PL, EDDY EP, LEE C-P & WILSON G: Exploitation of the intestinal oligopeptide transporter to enhance drug absorption. *Drug Deliv.*, **3**, 117-123 (1996)
- [100] HARTRODT B, THEIS S, KNÜTTER I, BÖRNER V, BORN I, BRANDSCH M, DANIEL H & NEUBERT K: New insights into the stereospecificity of the intestinal H<sup>+</sup>/peptide symporter. *Proc. Eur. Peptide Symp.* 2000 in press
- [101] DÖRING F, THEIS S & DANIEL H: Expression and functional characterization of the mammalian intestinal peptide transporter PEPT1 in the methylotropic yeast *Pichia Pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **232** 656-662 (1997)
- [102] HIDALGO IJ, BHATNAGAR P, LEE C-P, MILLER J, CUCULLINO G & SMITH PL: Structural requirements for the interaction with the oligopeptide transporter in Caco-2 cells. *Pharm. Res.*, **12**, 317-319 (1995)
- [103] TAMURA K, LEE C-P, SMITH PL & BORCHARDT RT: Effect of charge on oligopeptide transporter-mediated permeation of cyclic dipeptides across Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.*, **13**, 1752-1754 (1996)
- [104] MIZUMA T, MASUBUCHI S & AWAZU S: Intestinal absorption of stable cyclic Glycylphenylalanine: Comparison with the linear form. *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 1067-1071 (1997)
- [105] TERADA T, SAWADA K, IRIE M, SAITO H, HASHIMOTO Y & INUI K-I: Structural requirements for determining the substrate affinity of peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Pflügers Arch.*, **440**, 679-84 (2000)
- [106] MIYAMOTO Y, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Proton gradient-coupled uphill transport of Glycylsarcosine in rabbit renal brush-border membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 946-953 (1985)
- [107] GANAPATHY V, BURCKHARDT G & LEIBACH FH: Characteristics of Glycylsarcosine transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, **259**, 8954-8959 (1984)
- [108] THWAITES DT, BROWN CDA, HIRST BH & SIMMONS NL: Transepithelial Glycylsarcosine transport in intestinal Caco-2 cells mediated by expression of H<sup>+</sup>-coupled carriers at both apical and basal membranes. *J. Biol. Chem.*, **268**, 7640-7642 (1993)
- [109] TIRUPATHI C, GANAPATHY V & LEIBACH FH: Kinetic evidence for a common transporter for glycylsarcosine and phenylalanylprolylalanine in renal brush-border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, **265**, 14870-14874 (1990)
- [110] TAUB, ME, LARSEN BD, STEFFANSEN B & FROKJAER S:  $\beta$ -carboxylic acid esterified D-Asp-Ala retains a high affinity for the oligopeptide transporter in Caco-2 monolayers. *Int. J. Pharm.*, **146**, 205-212 (1997)

- 
- [111] TAUB ME, MOSS BA, STEFFANSEN B & FROKJAER S: Influence of oligopeptide transporter binding affinity upon uptake and transport of D-Asp(OBzl)-Ala and Asp(OBzl)-Sar in filter-grown Caco-2 monolayers. *Int. J. Pharm.*, **156**, 219-228 (1997)
- [112] STEFFANSEN B, LEPIST E-I, TAUB ME, LARSEN BD, FROKJAER S & LENNERNAS H: Stability, metabolism and transport of D-Asp(OBzl)-Ala - a model prodrug with affinity for the oligopeptide transporter. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **8**, 67-73 (1999)
- [113] TAUB ME, MOSS BA, STEFFANSEN B & FROKJAER S: Oligopeptide transporter mediated uptake and transport of D-Asp(OBzl)-Ala, D-Glu(OBzl)-Ala, and D-Ser(Bzl)-Ala in filter-grown Caco-2 monolayers. *Int. J. Pharm.*, **174**, 223-232 (1998)
- [114] FROKJAER S, STEFFANSEN B & TAUB ME: Assessment of side-chain modified dipeptides that interact with the oligopeptide transporter. in: *Peptide and Protein Drug Delivery*. Frokjaer S, Christrup L & Krogsgaard-Larsen P (editors), Murksgaard, Copenhagen, 287-297 (1998)
- [115] YANG CY, DANTZIG AH & PIDGEON C: Intestinal peptide transport and oral drug availability. *Pharm. Res.*, **16**, 1331-1343 (1999)
- [116] LIN CJ, AKARAWUT W & SMITH DE: Competitive inhibition of glycylsarcosine transport by enalapril in rabbit brush border membrane vesicles: Interaction of ACE inhibitors with high-affinity H<sup>+</sup>/peptide symporter. *Pharm. Res.*, **16**, 609-615 (1999)
- [117] VIEIRA-COELHO MA & SOARES-DA-SILVA P: Uptake and intracellular fate of L-DOPA in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2. *Am. J. Physiol.*, **275**, C104-C112 (1998)
- [118] TAMAI I, NAKANISHI T, NAKAHARA H, SAI Y, GANAPATHY V, LEIBACH FH & TSUJI A: Improvement of L-DOPA absorption by dipeptidyl derivation, utilizing peptide transporter PEPT1. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1542-1546 (1998)
- [119] WALLE UK & WALLE T: Taxol transport by human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 343-346 (1998)
- [120] VINCENT ML, RUSSELL RM & SASAK V: Folin uptake characteristics of a human colon carcinoma cell line, Caco-2. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.*, **39C**, 355-360 (1985)
- [121] MA TY, DYER DL & SAID HM: Human intestinal cell line Caco-2: A useful model for studying cellular and molecular regulation of biotin uptake. *Biochim. Biophys. Acta*, **1189**, 81-88 (1994)
- [122] MESHKINPOUR H, HOLLANDER D & HARMON D: Colonic absorption of Acetylsalicylic Acid in the rat. *Gen. Pharmac.*, **15**, 55-58 (1984)
- [123] SUZUKA T, YATA N, SAKAI K & NISHIHATA T: The effects of salicylate concentration on the uptake of salicylate and cefmetazole into rat isolated small intestinal epithelial cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 469-472 (1988)
- [124] TAKANAGA H, TAMAI I & TSUJI A: pH-dependent and carrier-mediated transport of salicylic acid across Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 567-570 (1994)

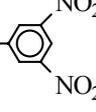
- 
- [125] BRÖER S, SCHNEIDER H-P, BRÖER A, RAHMAN B, HAMPRECHT B & DEITMER JW: Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus leavis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem J.*, **333**, 167-174 (1998)
- [126] JAKUBKE H-D: in "Peptide – Chemie und Biologie", 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1996)
- [127] ÖSAPAY G, PROKAI L, KIM H-S, MEDZIHRADSKY KF, COY DH, LIAPAKIS G, REISINE T, MELACINI G, ZHU Q, WANG SH-H, MATTERN R-H, & GOODMAN M: Lanthionine-Somatostatin analogs: Synthesis, characterization, biological activity, and enzymatic stability studies. *J. Med. Chem.*, **40**, 2241-2251 (1997)
- [128] ÖSAPAY G, ZHU Q, SHAO H, CHADHA RK & GOODMAN M: Synthesis, crystal structure and conformation in solution of four stereoisomeric cyclo-lanthionine derivatives. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **46**, 209-301 (1995)
- [129] TEMPLE CS, STEWART AK, MEREDITH D, LISTER NA, MORGAN KM, COLLIER ID, VAUGHAN-JONES RD, BOYD CAR, BAILEY PD & BRONK JR: Peptide mimetics as substrates for the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20-22 (1998)
- [130] MAEDA Y & TAKAHASHI M: Hydrolysis and absorption of a conjugate of Ursodeoxycholic Acid with para-Aminobenzoic Acid. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **12**, 744-753 (1989)
- [131] YAMAMOTO A, SAKANE T, SHIBUKAWA M, HASHIDA M, & SEZAKI H: Absorption and metabolic characteristics of p-Aminobenzoic acid and its isomer, m-Aminobenzoic acid, from the rat small intestine. *J. Pharm. Sci.*, **80**, 1067-1071 (1991)
- [132] KHATAVKAR SB, SADANA GS & DESHMUKH AA: Structural investigations of Copper(II), Nickel(II) and Cobalt(II) complexes of Phenylazobenzoylacetone. *J. Indian Chem. Soc.*, **LXV**, 529-531 (1988)
- [133] SCHARRER E, AMSTUTZ I & GRENACHER B: Inhibition of mucosal glycylsarcosine uptake by acetate in rat distal small intestine. *Exp Physiol*, **84**, 541-8 (1999)
- [134] HOWELL S, KENNY AJ & TURNER AJ: A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. *Biochem. J.*, **284**, 595-601 (1992)
- [135] STERCHI EE & WOODLEY JF: Peptide hydrolases of the human small intestinal mucosa: Distribution of activities between brush border membranes and cytosol. *Clin. Chim. Acta*, **102**, 49-56 (1980)
- [136] PAULETTI GM, GANGWAR S, OKUMU FW, SIAHAAN TJ, STELLA VJ & BORCHARDT RT: Esterase-sensitive cyclic prodrugs of peptides: Evaluation of an acyloxyalkoxy promoiety in a model hexapeptide. *Pharm. Res.*, **13**, 1615-1623 (1996)
- [137] GANAPATHY V, PASHLEY DH, FONTELES MC & LEIBACH FH: Peptidases and peptide transport in mammalian kidney. *Contr. Nephrol.*, **42**, 10-18 (1984)
- [138] SILBERNAGEL S: Intratubular splitting of peptides and their reabsorption as single amino acids from the proximal convolution of rat kidney. *Kidney Int.*, **11**, 219 (1977)

- 
- [139] ZAVALOVA L, LUKYANOV S, BASKOVA I, SNEZHKOVA E, AKOPOV S, BEREZHNOY S, BOGDANOVA E, BARSOVA E & SVERDLOV ED: Genes from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) coding for unusual enzymes that specifically cleave endo- $\epsilon$ ( $\gamma$ -Glu)-Lys isopeptide bonds and help to dissolve blood clots. *Mol. Gen Genet.*, **253**, 20-25 (1996)
- [140] GAERTNER H, PUIGSERVER A & MAROUX S: Hydrolysis of the isopeptide bond of  $\epsilon$ -N-L-Methionyl-L-Lysine by intestinal Aminopeptidase N. *FEBS Letters*, **133**, 135-138 (1981)
- [141] GAERTNER H, & PUIGSERVER A: Oligo(methionyl) proteins: Enzymatic hydrolysis of the model isopeptides N<sup>ε</sup>-oligo(L-methionyl)-L-lysine. *Eur. J. Biochem.*, **145**, 257-263 (1984)
- [142] SYKES AP, LISTER N, BAILEY PD, BOYD CAR & BRONK JR: Dipeptide transport and hydrolysis in rat small intestine, in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **1237**, 70-76 (1995)
- [143] MOSS J, BUUR A & BUNDGAARD H: Prodrugs of peptides. 8. In vitro study of intestinal metabolism and penetration of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its prodrugs. *Int. J. Pharm.*, **66**, 183-191 (1990)
- [144] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, & RANDALL RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- [145] MERZ D & DETERMANN H: Bestimmung der Reaktivität von aktivierten Aminosäureestern mit Glycin-o-nitroanilid. *Liebigs Ann. Chem.*, **728**, 215-222 (1969)
- [146] KÖNIG W & GEIGER R: N-Hydroxyverbindungen als Katalysatoren für die Aminolyse aktivierter Ester. *Chem. Ber.*, **106**, 3626-3635 (1973)
- [147] Spielberger G: II. Amine durch Austauschreaktionen. *Houben-Weyl*, Vol. **XI/1**, 24-108 (1957)
- [148] Organikum, Deutscher Verlag der Wissenschaften, 18. Auflage, 575-576 (1990)
- [149] CADE JA & PILBEAM A: Aspects of polyphenyl chemistry I: Synthesis and vapour phase chromatography of quaterphenyls. *Tetrahedron*, **20**, 519-529 (1964)
- [150] DEIMER K-H, Peptidsynthese. *Houben-Weyl*, Vol. **XV/1**, 400-401 (1974)
- [151] NOZAKI S & MURAMATSU I: Convenient synthesis of N-protected amino acid amides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 2647-2648 (1988)
- [152] Dissertation Mike Schutkowski, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1991)
- [153] CARPINO LA & EL-FAHAM A: Effect of tertiary bases on O-Benzotriazolyluronium salt-induced peptide segment coupling. *J. Org. Chem.*, **59**, 695-698 (1994)

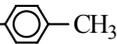
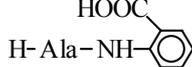
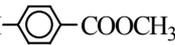
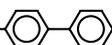
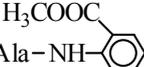
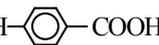
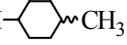
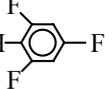
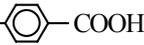
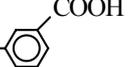
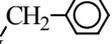
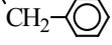
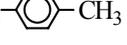
## 8. Anhang

### Übersicht der Substanzen 1 – 30

Die Numerierung entspricht der laufenden Substanznumerierung im Text.

Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]	Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]
1	H-Ala-OH	> 30	19	H-Ala-N <sub>1</sub> -COOH	3,7 ± 0,3
2	H-Ala-OCH <sub>3</sub>	> 30	20	H-Ala-N <sub>2</sub> -COOH	0,06 ± 0,01
3	H-Ala-O- 	zerfällt	21	H-Ala-NH- 	2,9 ± 0,2
4	H-Ala-O-CH <sub>2</sub> - 	22 ± 2	22	H-Ala-N(CH <sub>3</sub> )- 	12 ± 2
5	H-Gly-NH <sub>2</sub>	> 30	23	H-Ala-NH- 	0,08 ± 0,01
6	H-Ala-NH <sub>2</sub>	> 30	24	H-Ala-NH- 	0,50 ± 0,05
7	H-Phe-NH <sub>2</sub>	> 30	25	H-Ala-NH- 	4,9 ± 0,3
8	H-Ala-NH-CH <sub>3</sub>	> 30	26	H-Ala-NH- 	0,39 ± 0,03
9	H-Ala-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	15 ± 2	27	H-Phe-NH- 	0,09 ± 0,01
10	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	> 30	28	H-Ala-NH- 	0,33 ± 0,07
11	H-Ala-N(CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	> 30	29	H-Ala-NH- 	0,46 ± 0,04
12	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -CH <sub>3</sub>	0,90 ± 0,14	30	H-Ala-NH- 	7,8 ± 0,9
13	H-Ala-N $\square$	> 30			
14	H-Phe-N $\square$	> 30			
15	H-Ala-Pro-OH	0,11 ± 0,01			
16	H-Ala-D-Pro-OH	15 ± 2			
17	H-Ala-N $\square$	12 ± 2			
18	H-Ala-N $\square$ -COOH	1,6 ± 0,1			

## Übersicht der Substanzen 31 – 55

Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]	Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]
31	H-Ala-NH-  -CH <sub>3</sub>	0,34 ± 0,04	43	H-Ala-NH- 	2,7 ± 0,2
32	H-Ala-NH- 	0,41 ± 0,06	44	H-Ala-NH- 	1,1 ± 0,1
33	H-Ala-NH- 	14 ± 3	45	H-Ala-NH- 	6,8 ± 0,3
34	H-Ala-NH- 	0,03 ± 0,003	46	H-Ala-NH- 	0,89 ± 0,05
35	H-Ala-NH- 	0,29 ± 0,06	47	H-Phe-NH- 	n. m.
36	H-Ala-NH- 	16 ± 1	48	H-Ala-NH- 	1,5 ± 0,1
37	H-Ala-NH- 	0,46 ± 0,04	49	H-Ala-NH- 	0,47 ± 0,02
38	H-Ala-NH- 	0,11 ± 0,01	50	H-Ala-NH- 	3,7 ± 0,3
39	H-Ala-NH- 	> 30	51	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> - 	0,46 ± 0,05
40	H-Ala-NH- 	3,1 ± 0,3	52	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - 	0,42 ± 0,02
41	H-Ala-NH- 	9,1 ± 1,7	53	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> - 	14 ± 1
42	H-Ala-NH- 	0,31 ± 0,03	54	H-Ala-N(   )	7,6 ± 0,5
			55	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> - 	18 ± 2

## Übersicht der Substanzen 56 - 98

Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]	Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]
56	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -  -NO <sub>2</sub>	> 30	78	H-D-Ala-Lys-OH	7 ± 0,6
57	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	> 30	79	H-Ala-D-Lys-OH	> 30
58	H-Ala-Ala-OH	0,08 ± 0,01	80	H-D-Ala-D-Lys-OH	> 30
59	H-Phe-Phe-OH	0,11 ± 0,01	81	Ac-Phe-NH <sub>2</sub>	> 30
60	H-Ala-Glu-OH	0,32 ± 0,01	82	H-Lys-OH	> 30
61	H-Ala-Asp-OH	0,26 ± 0,02	83	Z-Lys-OH	6,8 ± 1,2
62	H-Ala-Lys-OH	0,21 ± 0,02	84	Z-Ala-Ala-OH	5,6 ± 0,3
63	H-Ala-Nle-OH	0,09 ± 0,01	85	Boc-Ala-Ala-OH	> 30
64	H-Asp-Ala-OH	0,32 ± 0,02	86	Ac-Ala-Ala-OH	> 30
65	H-Lys-Ala-OH	0,34 ± 0,08	87	Z-Ala-Lys-OH	5,3 ± 0,3
66	H-Nle-Ala-OH	0,14 ± 0,01	88	Boc-Ala-Lys-OH	24 ± 3
67	H-Gly-Sar-OH	0,83 ± 0,04	89	Z-Lys-Ala-OH	2,3 ± 0,1
68	H-Ala-Sar-OH	0,25 ± 0,01	90	Boc-Lys-Ala-OH	> 30
69	H-Sar-Sar-OH	> 30	91	Ac-Lys-Ala-OH	6,4 ± 0,3
70	H-Sar-Pro-OH	2,5 ± 0,1	92	H-Ala-Ala-OCH <sub>3</sub>	2,1 ± 0,2
71	H-Pro-Ala-OH	9,5 ± 0,4	93	H-Ala-Ala-O-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3,1 ± 0,3
72	H-Pro-Lys-OH	3,3 ± 0,5	94	H-Ala-Ala-O-CH <sub>2</sub> - 	0,22 ± 0,01
73	H-Lys-Glu-OH	1,3 ± 0,1	95	H-Ala-Ala-O-CH <sub>2</sub> -  -NO <sub>2</sub>	0,42 ± 0,06
74	H-Asp-Lys-OH	0,86 ± 0,11	96	H-Ala-Ala-NH <sub>2</sub>	2,7 ± 0,4
75	H-D-Ala-Ala-OH	2 ± 0,2	97	H-Ala-Ala-NH-CH <sub>3</sub>	> 30
76	H-Ala-D-Ala-OH	4 ± 0,2	98	H-Ala-Ala-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	25 ± 2
76	H-D-Ala-D-Ala-OH	> 30			

## Übersicht der Substanzen 99 - 139

Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]	Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]
99	H-Ala-Ala-NH- 	7,7 ± 0,8	121	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CO-Ala-OH	7,9 ± 0,6
100	H-Lys-Ala-OCH <sub>3</sub>	4,1 ± 0,3	122	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CO-Ala-OH	> 30
101	H-Lys-Ala-NH <sub>2</sub>	6,3 ± 0,3	123	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CO-Ala-OH	26 ± 2
102	H-Lys(Z)-Ala-OH	0,11 ± 0,01	124	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CO-Gly-OH	29 ± 2
103	H-Lys(Boc)-Ala-OH	0,56 ± 0,02	125	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -CO-Ala-OH	n. m.
104	H-Lys(Ac)-Ala-OH	0,26 ± 0,01	126	H-Ala-NH- $\begin{matrix} \text{CH-COOH} \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{matrix}$	0,07 ± 0,01
105	H-Lys(biotinyl)-Ala-OH	1,1 ± 0,1	127	H-Ala-NH-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -COOH	1,1 ± 0,1
106	H-Ala-Lys(Z)-OH	0,18 ± 0,01	128	H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -COOH	0,14 ± 0,01
107	H-Ala-Asp(OBzl)-OH	0,11 ± 0,01	129	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH	2,7 ± 0,1
108	H-Asp(OBzl)-Ala-OH	0,09 ± 0,01	130	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COOH	0,39 ± 0,02
109	H-Ala-Ser(Bzl)-OH	0,11 ± 0,01	131	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH	0,27 ± 0,02
110	H-Ser(Bzl)-Ala-OH	0,09 ± 0,01	132	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -COOH	0,54 ± 0,02
111	H-D-Ala-Lys(Z)-OH	2,3 ± 0,1	133	MeAla-Ala-OH	1,8 ± 0,1
112	H-Ala-D-Lys(Z)-OH	2,5 ± 0,1	134	H-Ala-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	> 30
113	H-D-Ala-D-Lys(Z)-OH	5,5 ± 0,6	135	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH [pH 6.0]	> 30
114	H-D-Lys(Z)-Ala-OH	15 ± 3	135	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH [pH 7.0]	> 30
115	H-Lys(Z)-D-Ala-OH	27 ± 4	136	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	7,9 ± 0,6
116	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CO-Ala-OH	0,38 ± 0,02	137	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -COOH	> 10
117	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-Ala-OH	4,8 ± 0,3	138	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CO- -NH-CH <sub>2</sub> -COOH	1 ± 0,1
118	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-Gly-OH	7,2 ± 1,2	139	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO- -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH	> 30
119	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CO-Ala-OH	24 ± 1			
120	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ala-OH	7,7 ± 0,7			

## Übersicht der Substanzen 140 - 165

Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]
140	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CO- -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH	> 30
141	H-Glu-Ala-OH	0,25 ± 0,02
142	H-γ-Glu-Ala-OH	> 30
143	H-Glu-Lys-OH	0,51 ± 0,05
144	H-γ-Glu-N <sup>ε</sup> -Lys-OH	> 10
145	H-Ala-N <sup>ε</sup> -Lys-OH	> 10
146	H-Ala-N <sup>ε</sup> -Z-Lys-OH	2,7 ± 0,2
147	Z-Ala-N <sup>ε</sup> -Lys-OH	unlöslich
148	H-Ala-N <sup>ε</sup> -D-Lys-OH	> 10
149	H-D-Ala-N <sup>ε</sup> -Lys-OH	> 10
150	H-Lys-Glu-OH	1,3 ± 0,1
151	□-Lys-Glu-□	> 30
152	□-Lys-Ala-□	5,4 ± 0,4

Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]
153	□-Gly-Phe-□	> 30
154	□-Gly-Pro-□	> 30
155	□-Glu-Glu-□	> 10
156	□-Lys(Z)-Sar-□	> 30
157	Z-Ala-□ H-Lys-Ala-OH	0,12 ± 0,01
158	Z-Ala-□ H-Ala-Lys-OH	0,51 ± 0,07
159	Z-Ala-Ala-□ H-Ala-Lys-OH	0,42 ± 0,04
160	H-Ala-Ala-□ H-Ala-Lys-OH	4,7 ± 0,1
161	Z-Ala-Ala-□ H-Lys-Ala-OH	0,18 ± 0,01
162	H-Ala-Ala-□ H-Lys-Ala-OH	4,7 ± 0,1

Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]
163	Z-D-Ala-Ala-□ H-Lys-Ala-OH	0,97 ± 0,05
164	Z-Ala-D-Ala-□ H-Lys-Ala-OH	0,55 ± 0,05
165	Z-D-Ala-D-Ala-□ H-Lys-Ala-OH	0,41 ± 0,05

## Übersicht der Substanzen 166 – 180

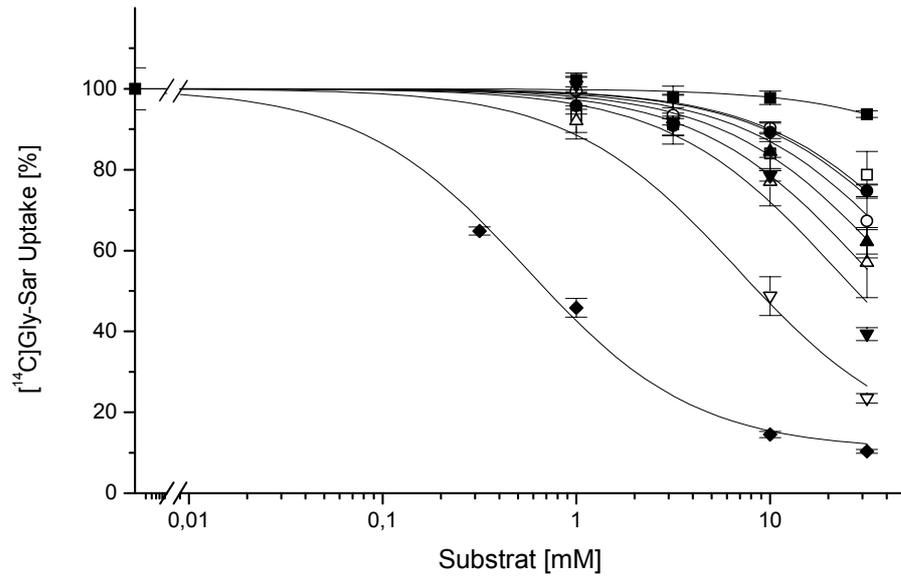
Nr.	Substanz	K <sub>1</sub> [mM]
166	Z-Ala-D-Ala-Ala- $\square$ H-Lys-Ala-OH	0,61 ± 0,02
167	Z-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala- $\square$ H-Lys-Ala-OH	1,2 ± 0,1
168	Z-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala- $\square$ H-Lys-Ala-OH	1,8 ± 0,1
169	H-Lys(Z)-Ala-NH <sub>2</sub>	2,1 ± 0,2
170	H-Lys(Z)-Sar-OH	0,26 ± 0,02
171	Z-Ala-Ala- $\square$ H-Lys-Sar-OH	0,40 ± 0,01
172	Z-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala- $\square$ H-Lys-Sar-OH	2,9 ± 0,2
173	H-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala- $\square$ H-Lys-Sar-OH	6,7 ± 0,7
174	Z-Ala- $\square$ H-Ala-Om-OH	0,17 ± 0,01
175	H-Ala- $\square$ H-Ala-Om-OH	8,9 ± 0,3
176	H-Ala- $\square$ H-Ala-Om-Ala-OH	7,3 ± 0,7
177	$\square$ -Ala-OH H-Asp-OH	> 30
178	$\square$ -Ala-OH H-Asp-NH <sub>2</sub>	5,3 ± 0,9
179	$\square$ -Ala-OH H-Asp-OBzl	8,4 ± 0,3
180	$\square$ -Ala-D-Ala-OBzl H-Asp-Ala-OH	0,65 ± 0,06

## Übersicht der Substanzen 181 – 189

Nr.	Substanz	K <sub>I</sub> [mM]
181	$\begin{array}{l} \lceil \text{Ala-D-Ala-OH} \\ \text{H-Asp-Ala-OH} \end{array}$	2,7 ± 0,2
182	$\begin{array}{l} \lceil \text{Ala-D-Ala-OBzl} \\ \text{H-D-Asp-Ala-OH} \end{array}$	19 ± 2
183	$\begin{array}{l} \lceil \text{Ala-D-Ala-OH} \\ \text{H-D-Asp-Ala-OH} \end{array}$	> 30
184	$\begin{array}{c} \text{COOH} \quad \quad \text{COOH} \\   \quad \quad \quad   \\ \text{H-C-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-C-H} \\   \quad \quad \quad   \\ \text{NH}_2 \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	> 10
185	Ascorbinsäure	> 30
186	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$	4,2 ± 0,2
187	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4 \end{array}$	6,6 ± 0,7
188	$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4 \end{array}$	2,4 ± 0,1
189	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-COOH}$	14 ± 1

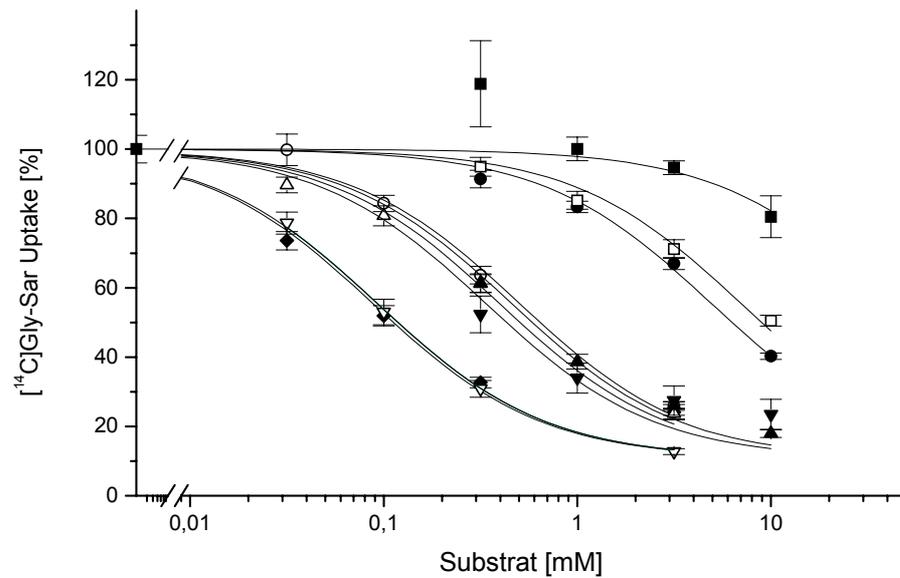
## Hemmkurven

Die Hemmkurven sind in den jeweiligen Graphiken nach steigenden  $K_I$ -Werten sortiert. Nicht aufgeführt sind die Verbindungen 12-Aminododekansäure (**137**), Ascorbinsäure (**185**) und Lanthionin (**184**).



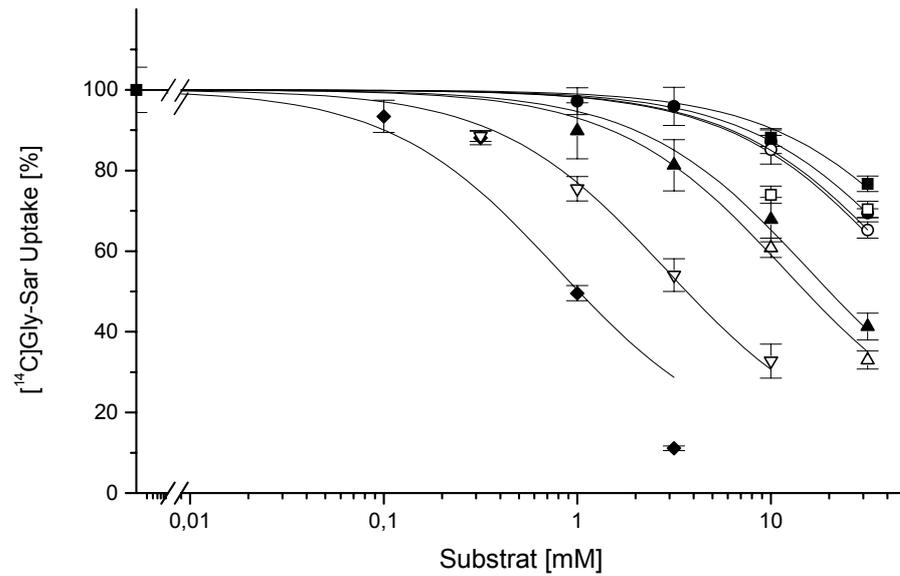
**Abb. 20** Hemmkurven der Verbindungen **5**, **1**, **2**, **7**, **81**, **6**, **4**, **83** und **67**

(■; **5**) H-Gly-NH<sub>2</sub>; (□; **1**) H-Ala-OH; (●; **2**) H-Ala-OCH<sub>3</sub>; (○; **7**) H-Phe-NH<sub>2</sub>; (▲; **81**) Ac-Phe-NH<sub>2</sub>;  
(△; **6**) H-Ala-NH<sub>2</sub>; (▼; **4**) H-Ala-O-*p*-NO<sub>2</sub>Bzl; (▽; **83**) Z-Lys-OH; (◆; **67**) H-Gly-Sar-OH



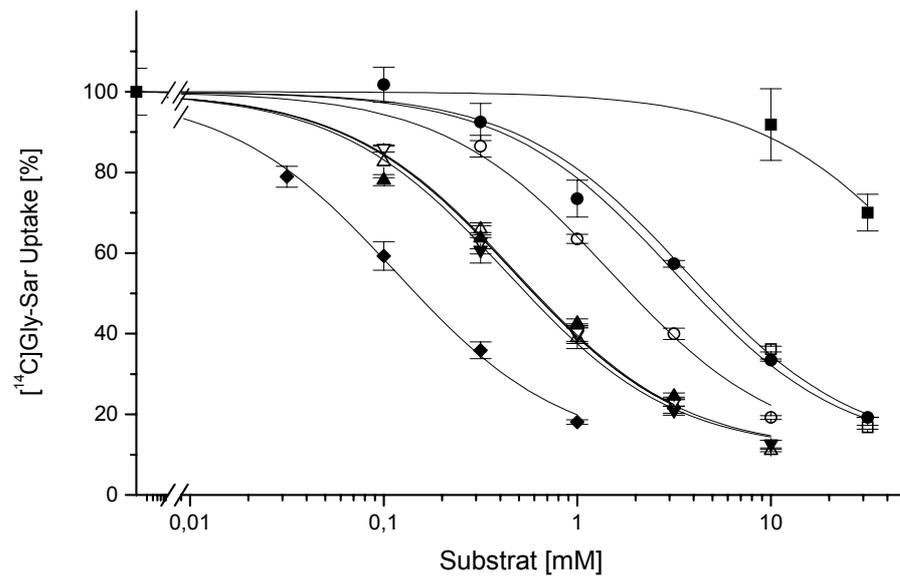
**Abb. 21** Hemmkurven der Verbindungen **56**, **30**, **25**, **24**, **29**, **26**, **28**, **27** und **23**

(■; **56**) H-Ala-*p*-NO<sub>2</sub>Bzl; (□; **30**) H-Ala-*o*-Cl-anilid; (●; **25**) H-Ala-*o*-NO<sub>2</sub>-anilid; (○; **24**) H-Ala-*m*-NO<sub>2</sub>-anilid;  
(▲; **29**) H-Ala-*m*-Cl-anilid; (△; **26**) H-Ala-3,5-di-NO<sub>2</sub>-anilid; (▼; **28**) H-Ala-*p*-Cl-anilid;  
(▽; **27**) H-Phe-*p*-NO<sub>2</sub>-anilid; (◆; **23**) H-Ala-*p*-NO<sub>2</sub>-anilid



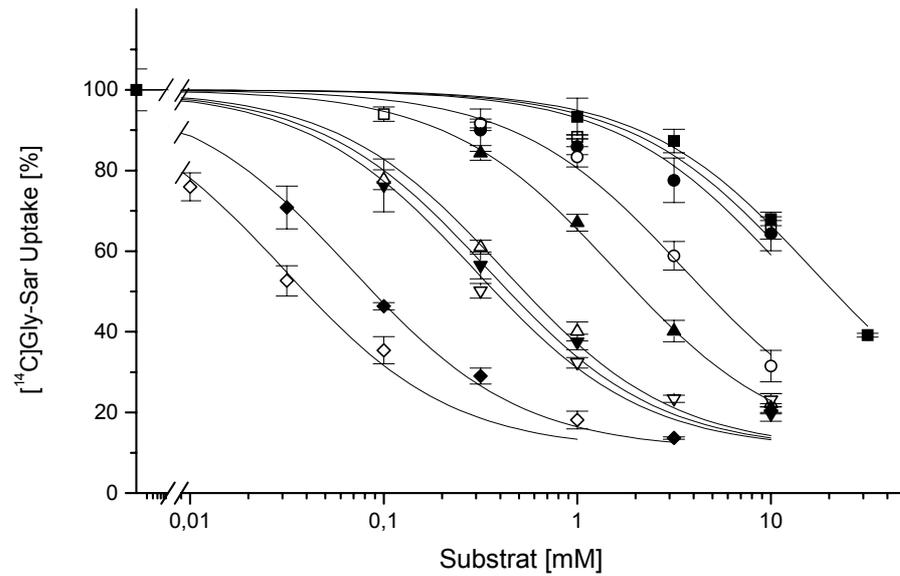
**Abb. 22** Hemmkurven der Verbindungen **10**, **11**, **8**, **57**, **9**, **22**, **21** und **12**

(■; **10**) H-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>; (□; **11**) H-Ala-N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; (●; **8**) H-Ala-NH-CH<sub>3</sub>; (○, **57**) H-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH; (▲; **9**) H-Ala-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; (△; **22**) H-Ala-N(Me)-anilid; (▽; **21**) H-Ala-anilid; (◆; **12**) H-Ala-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-CH<sub>3</sub>

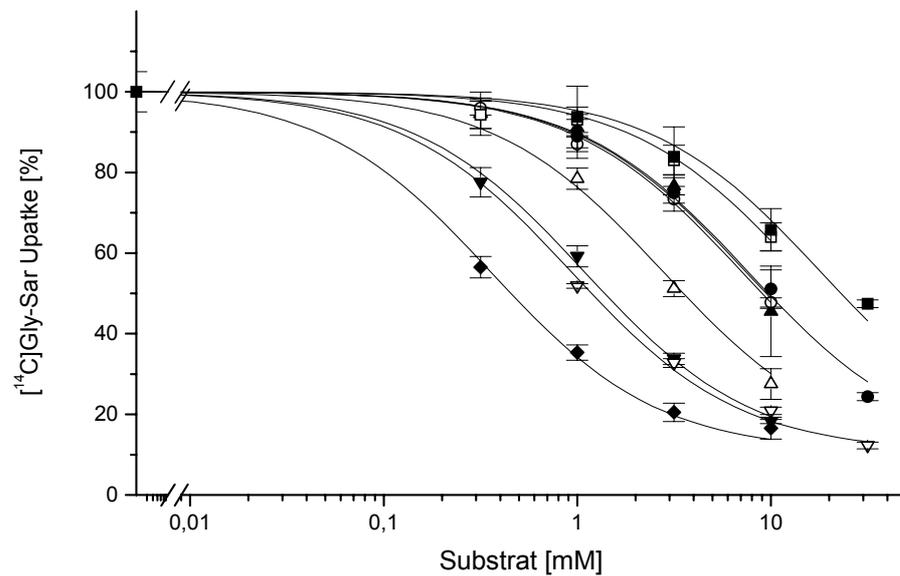


**Abb. 23** Hemmkurven der Verbindungen **39**, **50**, **40**, **48**, **37**, **51**, **52**, **49** und **38**

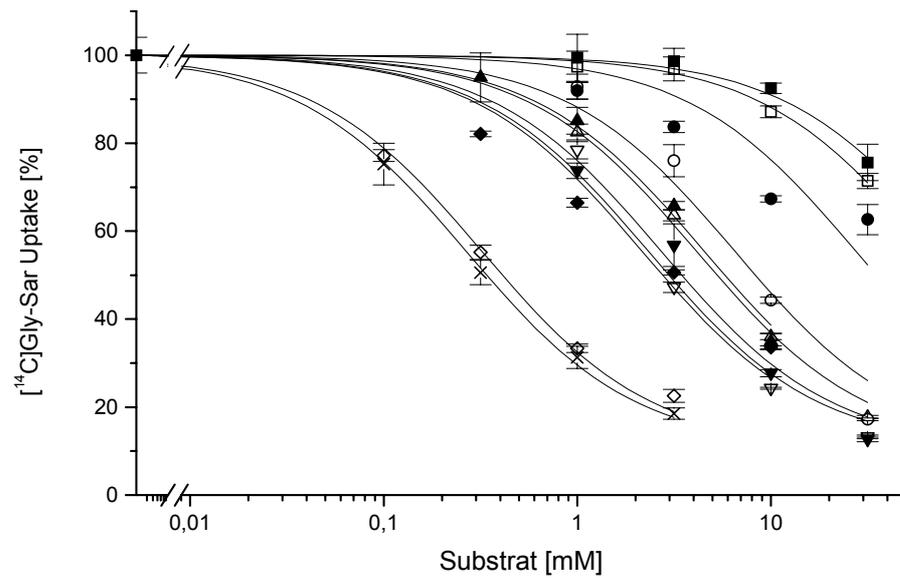
(■; **39**) H-Ala-2,4,6-tri-F-anilid; (□; **50**) H-Ala-*o*-Me-cyclohexylamid (*cis/trans*); (●; **40**) H-Ala-2,3,4,5,6-penta-F-anilid; (○; **48**) H-Ala-cyclohexylamid; (▲; **37**) H-Ala-*p*-F-anilid; (△; **51**) H-Ala-cyclohexylmethylamid; (▼; **52**) H-Ala-2-cyclohexylethylamid; (▽; **49**) H-Ala-*p*-Me-cyclohexylamid (*cis/trans*); (◆; **38**) H-Ala-3,4,5-tri-F-anilid



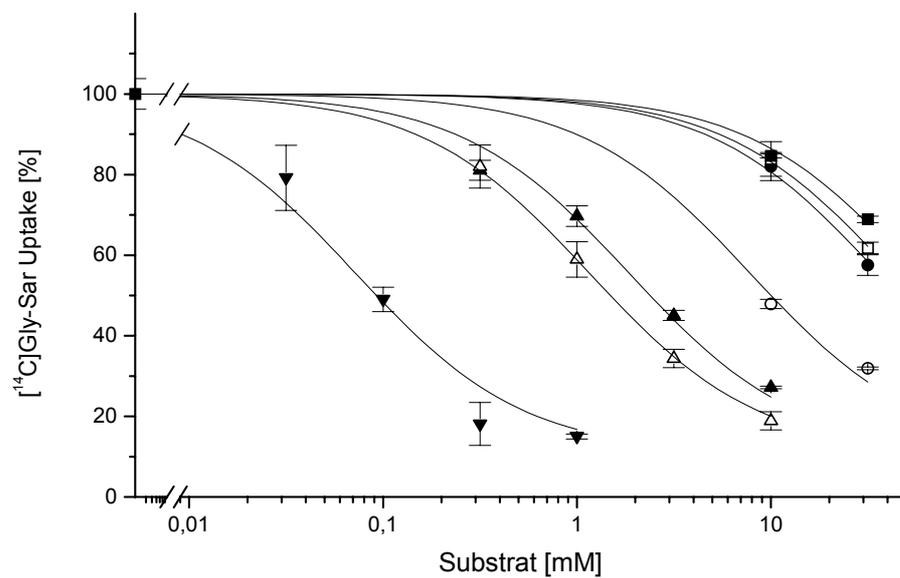
**Abb. 24** Hemmkurven der Verbindungen **36, 33, 17, 19, 18, 32, 31, 35, 20** und **34**  
 (■; **36**) H-Ala-*o*-phenyl-anilid; (□; **33**) H-Ala-*o*-Me-anilid; (●; **17**) H-Ala-piperidid; (○; **19**) H-Ala-*m*-  
 Pipecolinsäure; (▲; **18**) H-Ala-*p*-Pipecolinsäure; (△; **32**) H-Ala-*m*-Me-anilid; (▼; **31**) H-Ala-*p*-Me-anilid;  
 (▽; **35**) H-Ala-*m*-phenyl-anilid; (◆; **20**) H-Ala-*o*-Pipecolinsäure; (◇; **34**) H-Ala-*p*-phenyl-anilid



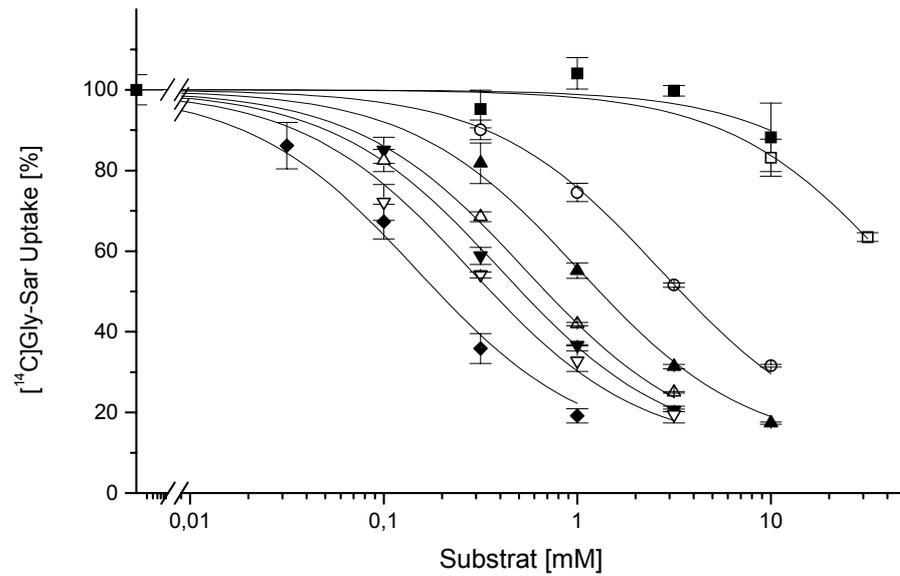
**Abb. 25** Hemmkurven der Verbindungen **55, 53, 54, 45, 41, 43, 44, 46** und **42**  
 (■; **55**) H-Ala-NH-*p*-MeBzl; (□; **53**) H-Ala-NH-Bzl; (●; **54**) H-Ala-N(Bzl)<sub>2</sub>; (○; **45**) H-Ala-*m*-  
 aminobenzoessäure-methylester; (▲; **41**) H-Ala-*p*-aminobenzoessäure; (△; **43**) H-Ala-*o*-aminobenzoessäure;  
 (▼; **44**) H-Ala-*p*-aminobenzoessäure-methylester; (▽; **46**) H-Ala-*o*-aminobenzoessäure-methylester;  
 (◆; **42**) H-Ala-*m*-aminobenzoessäure



**Abb. 26** Hemmkurven der Verbindungen **14**, **13**, **115**, **187**, **189**, **186**, **147**, **188**, **169**, **60** und **170** (■; **14**) H-Phe-pyrrolidid; (□; **13**) H-Ala-pyrrolidid; (●; **115**) H-Lys(Z)-D-Ala-OH; (○; **187**) 3-Amino-benzoessäure; (▲; **189**) Phenyllessigsäure; (△; **186**) 4-Amino-benzoessäure; (▼; **147**) Z-Lys(H-Ala)-OH; (▽; **188**) 2-Amino-benzoessäure; (◆; **169**) H-Lys(Z)-Ala-NH<sub>2</sub>; (◇; **60**) H-Ala-Glu-OH; (X; **170**) H-Lys(Z)-Sar-OH

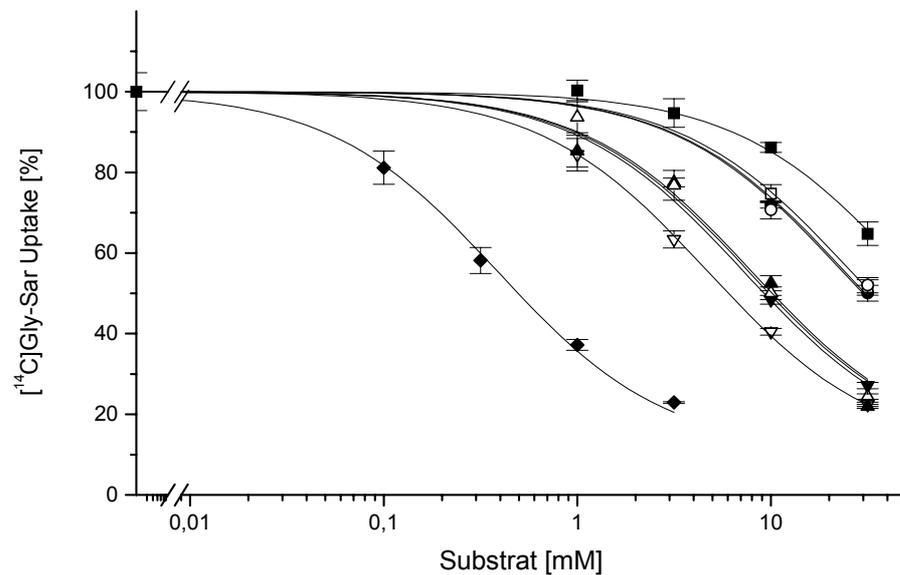


**Abb. 27** Hemmkurven der Verbindungen **134**, **135**, **135**, **136**, **133**, **127** und **126** (■; **134**) H-Ala-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>; (□; **135**) 6-Aminohexansäure (pH 7.0); (●; **135**) 6-Aminohexansäure (pH 6.0); (○; **136**) 8-Aminooctansäure; (▲; **133**) H-MeAla-Ala-OH; (△; **127**) H-Ala-Aib-OH; (▼; **126**) H-Ala-α-Abu-OH



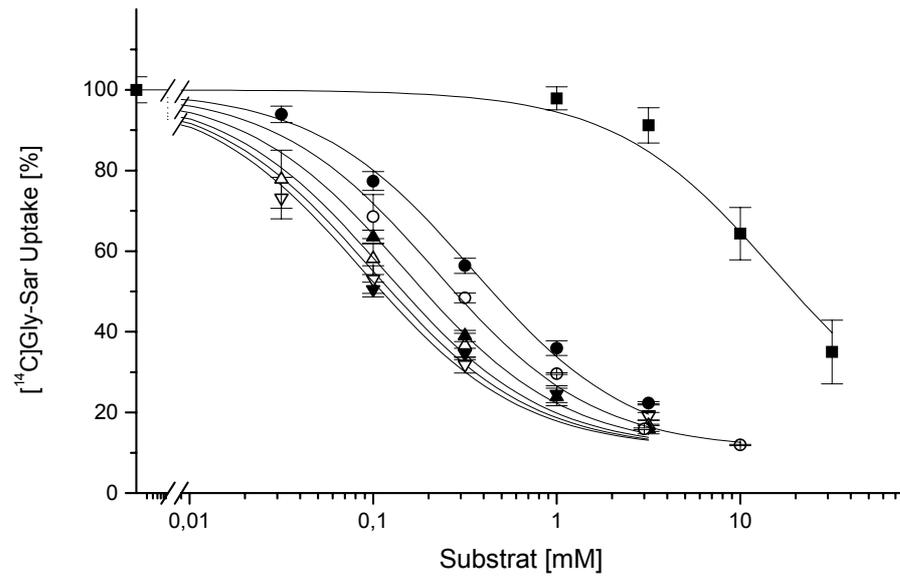
**Abb. 28** Hemmkurven der Verbindungen **139**, **140**, **129**, **138**, **132**, **130**, **131** und **128**

(■; **139**) H-β-Ala-β-Ala-OH; (□; **140**) H-Ahx-Ahx-OH; (○; **129**) H-Ala-β-Ala-OH; (▲; **138**) H-Gly-Gly-OH; (△; **132**) H-Ala-Adk-OH; (▼; **130**) H-Ala-γ-Abu-OH; (▽; **131**) H-Ala-ε-Ahx-OH; (◆, **128**) H-Ala-Gly-OH



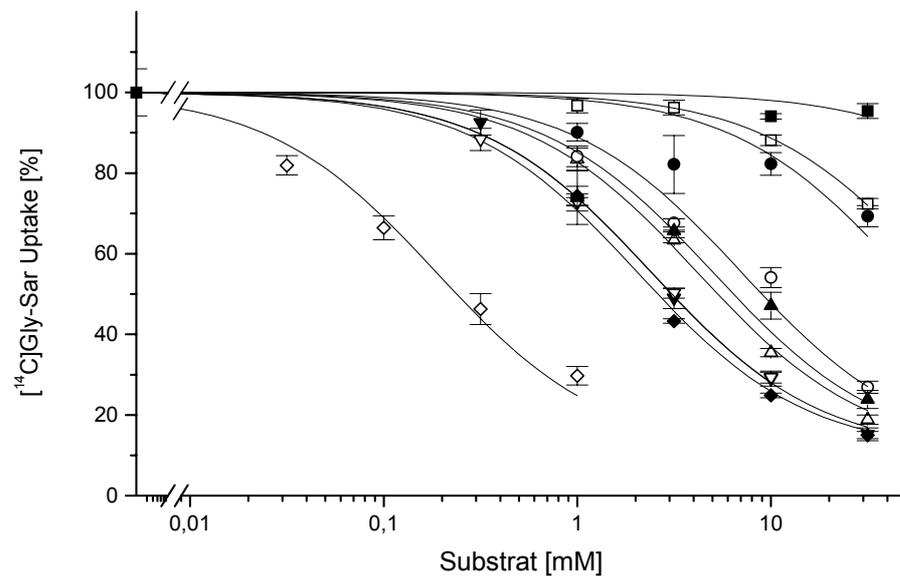
**Abb. 29** Hemmkurven der Verbindungen **122**, **123**, **119**, **124**, **120**, **121**, **118**, **117** und **116**

(■, **122**) H-Ahp-Ala-OH; (□; **123**) H-Aoc-Ala-OH; (●; **119**) H-γ-Abu-Ala-OH; (○; **124**) H-Aoc-Gly-OH; (▲; **120**) H-Apt-Ala-OH; (△; **121**) H-Ahx-Ala-OH; (▼; **118**) H-β-Ala-Gly-OH; (▽; **117**) H-β-Ala-Ala-OH; (◆; **116**) H-Gly-Ala-OH



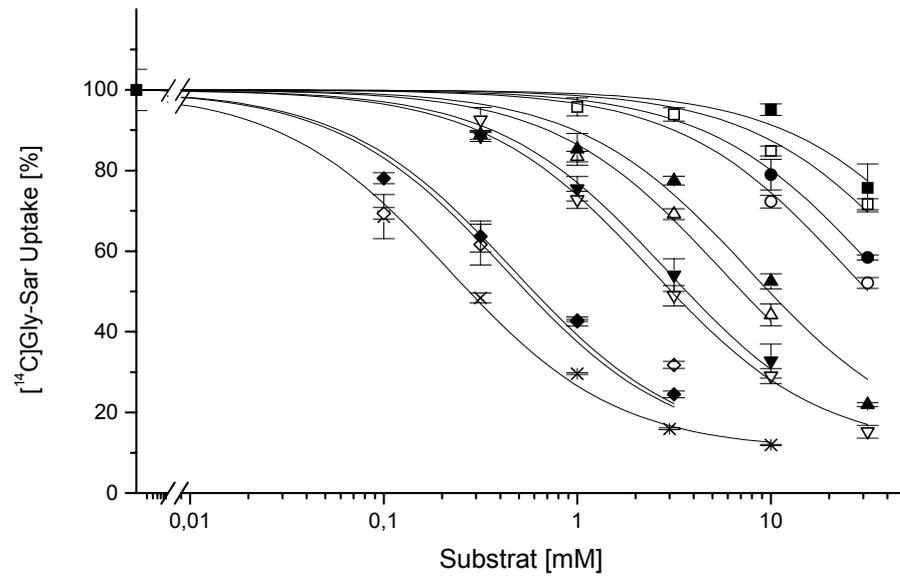
**Abb. 30** Hemmkurven der Verbindungen **16**, **65**, **62**, **66**, **15**, **63** und **58**

(■; **16**) H-Ala-D-Pro-OH; (●; **65**) H-Lys-Ala-OH; (○; **62**) H-Ala-Lys-OH; (▲; **66**) H-Nle-Ala-OH; (△; **15**) H-Ala-Pro-OH; (▼; **63**) H-Ala-Nle-OH; (▽; **58**) H-Ala-Ala-OH

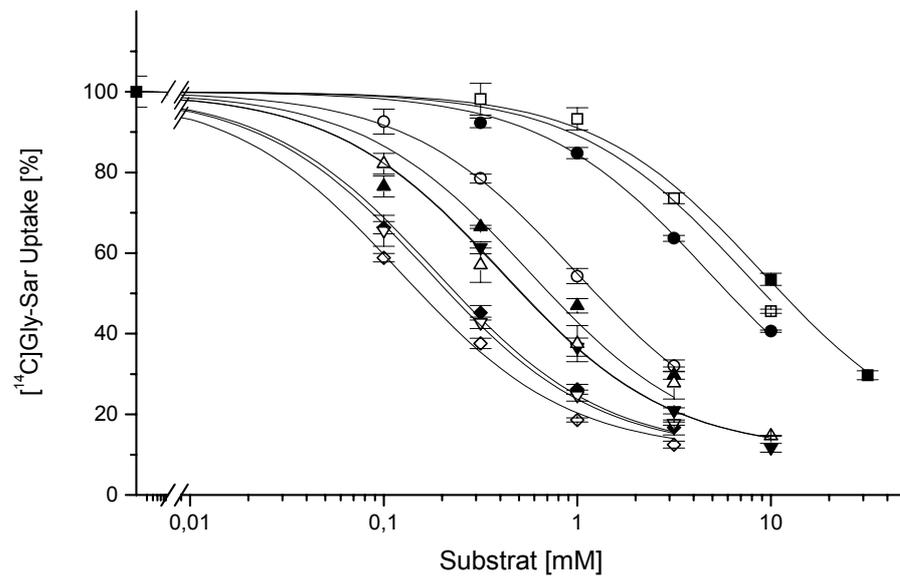


**Abb. 31** Hemmkurven der Verbindungen **76**, **80**, **79**, **78**, **113**, **76**, **111**, **112**, **75** und **126**

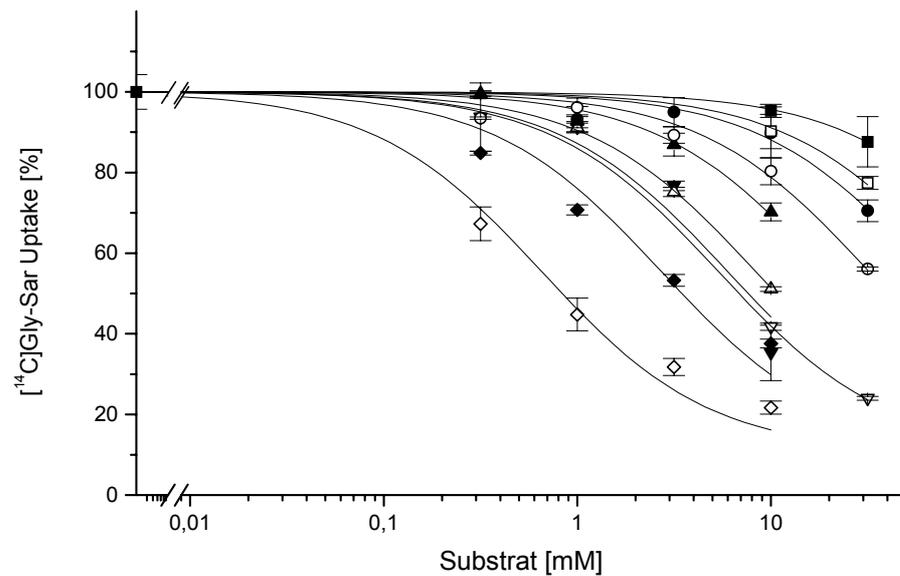
(■; **76**) H-D-Ala-D-Ala-OH; (□; **80**) H-D-Ala-D-Lys-OH; (●; **79**) H-Ala-D-Lys-OH; (○; **78**) H-D-Ala-Lys-OH; (▲; **113**) H-D-Ala-D-Lys(Z)-OH; (△; **76**) H-Ala-D-Ala-OH; (▼; **111**) H-D-Ala-Lys(Z)-OH; (▽; **112**) H-Ala-D-Lys(Z)-OH; (◆; **75**) H-D-Ala-Ala-OH; (◇; **106**) H-Ala-Lys(Z)-OH



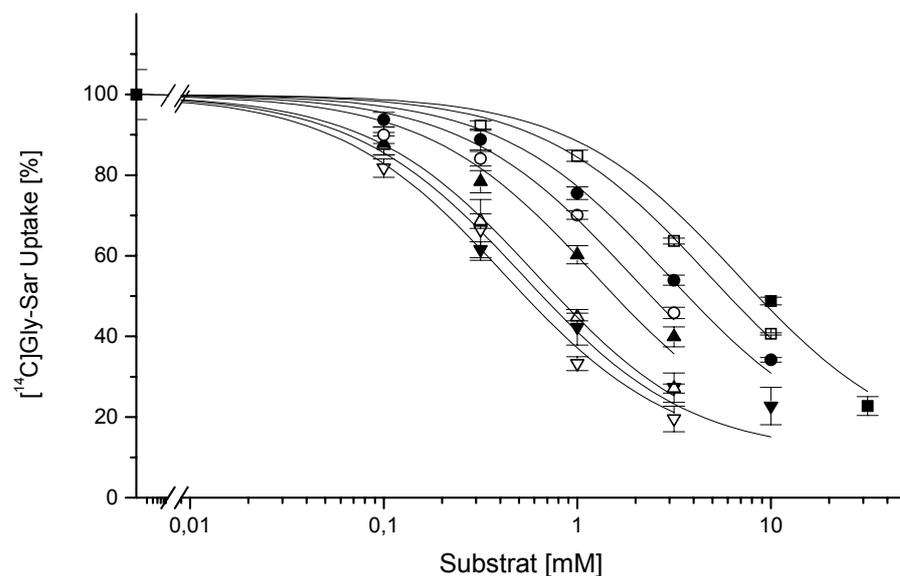
**Abb. 32** Hemmkurven der Verbindungen **86**, **85**, **97**, **98**, **99**, **84**, **96**, **92**, **93**, **95** und **94**  
 (■; **86**) Ac-Ala-Ala-OH; (□; **85**) Boc-Ala-Ala-OH; (●; **97**) H-Ala-Ala-NH-CH<sub>3</sub>; (○; **98**) H-Ala-Ala-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; (▲; **99**) H-Ala-Ala-anilid; (△; **84**) Z-Ala-Ala-OH; (▼; **96**) H-Ala-Ala-NH<sub>2</sub>; (▽; **92**) H-Ala-Ala-OMe; (◆; **93**) H-Ala-Ala-OBu; (◇; **95**) H-Ala-Ala-ONB; (X; **94**) H-Ala-Ala-OBzl



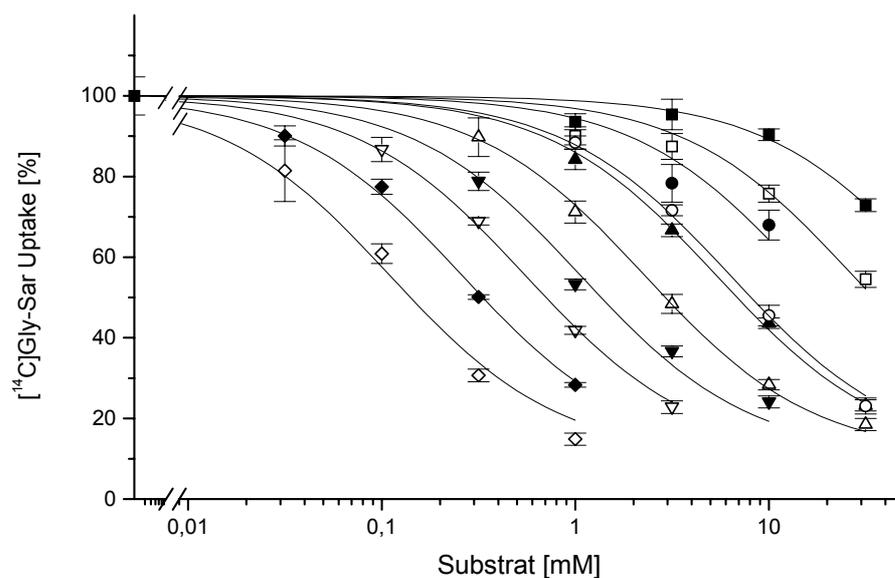
**Abb. 33** Hemmkurven der Verbindungen **175**, **176**, **162**, **163**, **164**, **165**, **171**, **174**, **161** und **157**  
 (■; **175**) H-Ala-Orn(H-Ala)-OH; (□; **176**) H-Ala-Orn(H-Ala)-Ala-OH; (●; **162**) H-Lys(H-Ala-Ala)-Ala-OH; (○; **163**) H-Lys(Z-D-Ala-Ala)-Ala-OH; (▲; **164**) H-Lys(Z-Ala-D-Ala)-Ala-OH; (△; **165**) H-Lys(Z-D-Ala-D-Ala)-Ala-OH; (▼; **171**) H-Lys(Z-Ala-Ala)-Sar-OH; (▽; **174**) H-Ala-Orn(Z-Ala)-OH; (◆; **161**) H-Lys(Z-Ala-Ala)-Ala-OH; (◇; **157**) H-Lys(Z-Ala)-Ala-OH



**Abb. 34** Hemmkurven der Verbindungen **154**, **156**, **177**, **183**, **182**, **179**, **178**, **152**, **181** und **180**  
 (■; **154**) *cyclo*-(Gly-Pro-); (□; **156**) *cyclo*-(Lys(Z)-Sar-); (●; **177**) H-β-Asp-Ala-OH; (○; **183**) H-D-Asp(Ala-D-Ala-OH)-Ala-OH; (▲; **182**) H-D-Asp(Ala-D-Ala-OBzl)-Ala-OH; (△; **179**) H-Asp(Ala-OH)-OBzl; (▼; **178**) H-Asp(Ala-OH)-NH<sub>2</sub>; (▽; **152**) *cyclo*-(Lys-Ala-); (◆; **181**) H-Asp(Ala-D-Ala-OH)-Ala-OH; (◇; **180**) H-Asp(Ala-D-Ala-OBzl)-Ala-OH



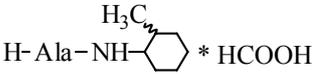
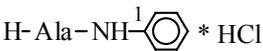
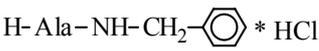
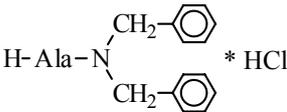
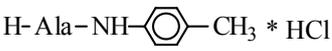
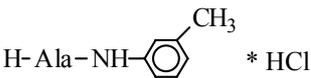
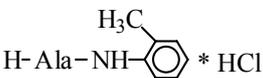
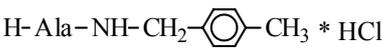
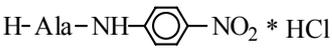
**Abb. 35** Hemmkurven der Verbindungen **173**, **160**, **172**, **168**, **167**, **166**, **158** und **159**  
 (■; **173**) H-Lys(H-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala)-Sar-OH; (□; **160**) H-Ala-Lys(H-Ala-Ala)-OH; (●; **172**) H-Lys(Z-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala)-Sar-OH; (○; **168**) H-Lys(Z-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala)-Ala-OH; (▲; **167**) H-Lys(Z-Ala-D-Ala-Ala-D-Ala)-Ala-OH; (△; **166**) H-Lys(Z-Ala-D-Ala-Ala)-Ala-OH; (▼; **158**) H-Ala-Lys(Z-Ala-Ala)-OH; (▽; **159**) H-Ala-Lys(Z-Ala-Ala)-OH

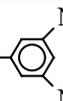
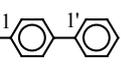


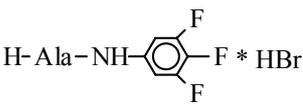
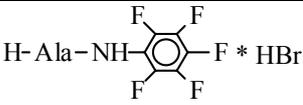
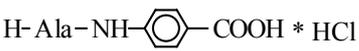
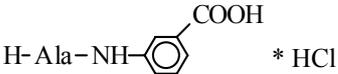
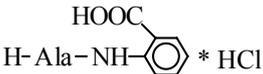
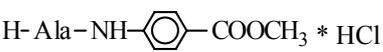
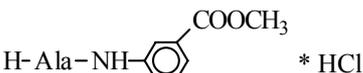
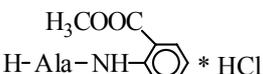
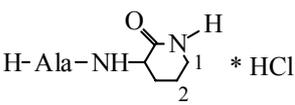
**Abb. 36** Hemmkurven der Verbindungen **90, 88, 114, 91, 87, 89, 105, 103, 104** und **102**  
(■; **90**) Boc-Lys-Ala-OH; (□; **88**) Boc-Ala-Lys-OH; (●; **114**) H-D-Lys(Z)-Ala-OH; (○; **91**) Ac-Lys-Ala-OH; (▲; **87**) Z-Ala-Lys-OH; (△; **89**) Z-Lys-Ala-OH; (▼; **105**) H-Lys(biotinyl)-Ala-OH; (▽; **103**) H-Lys(Boc)-Ala-OH; (◆, **104**) H-Lys(Ac)-Ala-OH; (◇; **102**) H-Lys(Z)-Ala-OH

**<sup>1</sup>H-NMR-Daten**

H-Ala-NH-CH <sub>3</sub> * HCl	δ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.34 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup>β</sup> H <sub>3</sub> ), 2.64 (3H, d, J=4.6, -NH-CH <sub>3</sub> ), 3.78 (H, q, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup>α</sup> H), 8.23 (2H, br.s, H <sub>2</sub> N-), 8.46 (H, br.d, J=4.3, -NH-)
H-Ala-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * HCl	δ [ppm] (CDCl <sub>3</sub> ): 1.61 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup>β</sup> H <sub>3</sub> ), 2.97 (3H, s, -NH-CH <sub>3</sub> ), 3.09 (3H, s, -NH-CH <sub>3</sub> '), 4.68 (H, q, <sup>3</sup> J=6.9, Ala-C <sup>α</sup> H), 8.39 (2H, br, H <sub>2</sub> N-)
H-Ala-N(CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * HCl	δ [ppm] (CDCl <sub>3</sub> ): 1.12 (3H, t, <sup>3</sup> J=7.1, -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ), 1.27 (3H, t, <sup>3</sup> J'=7.2, -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> '), 1.62 (3H, d, <sup>3</sup> J=6.8, Ala-C <sup>β</sup> H <sub>3</sub> ), 3.39 (4H, m, 2 -CH <sub>2</sub> -), 4.53 (H, q, <sup>3</sup> J=6.9, Ala-C <sup>α</sup> H), 8.46 (2H, br, H <sub>2</sub> N-)
H-Ala-N <sup>2</sup>  * HCl	δ [ppm] (CDCl <sub>3</sub> ): 1.52 (2H, br., C2H <sub>2</sub> -), 1.65 (3H, d, <sup>3</sup> J=6.8, Ala-C <sup>β</sup> H <sub>3</sub> ), 1.74 (2H, br., C6H <sub>2</sub> -), 3.49 (6H, m, C3H <sub>2</sub> , C4H <sub>2</sub> , C5H <sub>2</sub> ), 4.63 (H, q, <sup>3</sup> J=6.8, J'=6.8, J''=6.8, Ala-C <sup>α</sup> H), 8.41 (2H, br. s, H <sub>2</sub> N-)
H-Ala-NH-  * HCOOH	δ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.14 (3H, m, C4H, C6H <sub>2</sub> ), 1.19 (3H, d, <sup>3</sup> J=6.9, Ala-C <sup>β</sup> H <sub>3</sub> ), 1.26 (2H, m, C3H <sub>2</sub> ), 1.55 (1H, m, C4H), 1.69 (4H, m, C2H <sub>2</sub> , C5H <sub>2</sub> ), 3.45 (1H, q, <sup>3</sup> J=6.9, Ala-C <sup>α</sup> H), 3.52 (1H, m, C1H), 5.08 (2H, br., NH <sub>2</sub> -), 7.88 (1H, d, <sup>3</sup> J=7.7, -NH-), 8.32 (1H, s, HCOOH)
H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -  * HCOOH	δ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 0.87 (2H, m, C3H, C6H), 1.14 (3H, m, C3H, C4H, C6H), 1.20 (3H, d, <sup>3</sup> J=6.9, Ala-C <sup>β</sup> H <sub>3</sub> ), 1.39 (1H, m, C1H), 1.62 (1H, m, C4H), 1.65 (4H, m, C2H <sub>2</sub> , C5H <sub>2</sub> ), 2.93 (2H, m, N-CH <sub>2</sub> ), 3.49 (1H, q, <sup>3</sup> J=6.9, Ala-C <sup>α</sup> H), 4.74 (2H, br., NH <sub>2</sub> -), 8.00 (1H, br. t, -NH-), 8.31 (1H, s, HCOOH)
H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -  * HCOOH	δ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 0.85 (2H, m, C6H <sub>2</sub> ), 1.15 (3H, m, C3H <sub>2</sub> , C4H), 1.18 (3H, d, <sup>3</sup> J=6.8, Ala-C <sup>β</sup> H <sub>3</sub> ), 1.23 (1H, m, C1H), 1.29 (2H, m, CH <sub>2</sub> ), 1.59 (1H, m, C4H), 1.65 (4H, m, C2H <sub>2</sub> , C5H <sub>2</sub> ), 3.08 (2H, m, N-CH <sub>2</sub> ), 3.45 (1H, q, <sup>3</sup> J=6.5, Ala-C <sup>α</sup> H), 4.70 (2H, br., NH <sub>2</sub> -), 7.99 (1H, br. s, -NH-), 8.31 (1H, s, HCOOH)
H-Ala-NH-  -CH <sub>3</sub> * HCOOH	δ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): Hauptisomer (53%): 0.86 (3H, d, <sup>3</sup> J=6.5, CH <sub>3</sub> ), 0.97 (2H, m, C6H <sub>2</sub> ), 1.14 (2H, m, C3H <sub>2</sub> ), 1.18 (3H, d, <sup>3</sup> J=6.8, Ala-C <sup>β</sup> H <sub>3</sub> ), 1.28 (1H, m, C4H), 1.66 (2H, m, C5H <sub>2</sub> ), 1.75 (2H, m, C2H <sub>2</sub> ), 3.46 (1H, m, C1H), 3.41 (1H, q, <sup>3</sup> J=6.9, Ala-C <sup>α</sup> H), 4.86 (2H, br., NH <sub>2</sub> -), 7.83 (1H, d, <sup>3</sup> J=7.8, -NH-), 8.32 (1H, s, HCOOH); Nebenisomer (47%): 0.89 (3H, d, <sup>3</sup> J=6.5, CH <sub>3</sub> ), 1.20 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup>β</sup> H <sub>3</sub> ), 1.28 (2H, m, C3H <sub>2</sub> ), 1.48 (6H, C2H <sub>2</sub> , C5H <sub>2</sub> , C6H <sub>2</sub> ), 1.55 (1H, m, C4H), 3.52 (1H, q, <sup>3</sup> J=6.9, Ala-C <sup>α</sup> H), 3.77 (1H, m, C1H), 4.86 (2H, br., NH <sub>2</sub> -), 7.89 (1H, d, <sup>3</sup> J=7.5, -NH-), 8.32 (1H, s, HCOOH)

	<p><math>\delta</math> [ppm] (DMSO-<math>d_6</math>): Hauptisomer (52%): 0.81 (3H, d, <math>^3J=6.6</math>, CH<sub>3</sub>), 1.00 (1H, m, C6H), 1.15 (2H, m, C3H, C4H), 1.23 (3H, d, <math>^3J=6.9</math>, Ala-C<math>^\beta</math>H), 1.23 (1H, C5H), 1.30 (1H, m, C2H), 1.60 (1H, br. d, C4H), 1.69 (3H, m, C3H, C5H, C6H), 3.23 (1H, m, C1H), 3.45 (1H, m, Ala-C<math>^\alpha</math>H), 4.52 (2H, br., NH<sub>2</sub>-), 7.84 (1H, d, <math>^3J=8.9</math>, -NH-), 8.31 (1H, s, HCOOH); Nebenisomer (48%): 0.83 (3H, d, <math>^3J=6.5</math>, CH<sub>3</sub>), 1.20 (3H, d, <math>^3J=6.9</math>, Ala-C<math>^\beta</math>H), 1.30 (1H, m, C2H), 1.41 (1H, m, C6H), 1.54 (1H, m, C6H), 3.45 (1H, m, Ala-C<math>^\alpha</math>H), 3.85 (1H, m, C1H), 4.86 (2H, br., NH<sub>2</sub>-), 7.79 (1H, d, <math>^3J=8.7</math>, -NH-) (C3H<sub>2</sub>, C4H<sub>2</sub>, C5H<sub>2</sub> nicht zugeordnet)</p>
	<p><math>\delta</math> [ppm] (DMSO-<math>d_6</math>): 1.47 (3H, d, <math>^3J=6.9</math>, Ala-C<math>^\beta</math>H<sub>3</sub>), 4.06 (H, q, <math>^3J=7.0</math>, Ala-C<math>^\alpha</math>H), 7.11 (H, t, C<sub>4</sub>H, Aromat), 7.35 (2H, t, C<sub>3,5</sub>H, Aromat), 7.64 (2H, d, C<sub>2,6</sub>H, Aromat), 8.31 (2H, br.s, H<sub>2</sub>N-), 10.73 (H, br.s, -NH-)</p>
	<p><math>\delta</math> [ppm] (DMSO-<math>d_6</math>): 1.39 (3H, d, <math>^3J=7.0</math>, Ala-C<math>^\beta</math>H<sub>3</sub>), 3.87 (H, q, <math>^3J=7.0</math>, Ala-C<math>^\alpha</math>H), 4.33 (2H, d, <math>^3J=5.9</math>, -CH<sub>2</sub>-), 7.29 (5H, m, C<sub>2,6</sub>H, C<sub>3,5</sub>H, C<sub>4</sub>H, Aromat), 8.23 (2H, br.s, H<sub>2</sub>N-), 8.98 (H, t, J=5.7, J'=6.0, -NH-)</p>
	<p><math>\delta</math> [ppm] (CDCl<sub>3</sub>): 1.33 (3H, d, <math>^3J=6.86</math>, Ala-C<math>^\beta</math>H<sub>3</sub>), 4.24, 4.45 (2H, 2d, N-CH<sub>2</sub>), 4.34 (H, q, <math>^3J=6.86</math>, Ala-C<math>^\alpha</math>H), 4.69 (2H, 2d, N-CH<sub>2</sub>'), 7.29 (10H, m, Aromaten), 8.03 (2H, br, H<sub>2</sub>N-)</p>
	<p><math>\delta</math> [ppm] (DMSO-<math>d_6</math>): 1.46 (3H, d, <math>^3J=6.9</math>, Ala-C<math>^\beta</math>H<sub>3</sub>), 2.26 (3H, s, Aromat-CH<sub>3</sub>), 4.04 (H, q, <math>^3J=7.0</math>, Ala-C<math>^\alpha</math>H), 7.15 (2H, d, C<sub>3,5</sub>H, Aromat), 7.52 (2H, m, C<sub>2,6</sub>H, Aromat), 8.28 (2H, br.s, H<sub>2</sub>N-), 10.61 (H, br.s, -NH-)</p>
	<p><math>\delta</math> [ppm] (DMSO-<math>d_6</math>): 1.46 (3H, d, <math>^3J=7.1</math>, Ala-C<math>^\beta</math>H<sub>3</sub>), 2.29 (3H, s, Aromat-CH<sub>3</sub>), 4.05 (H, q, <math>^3J=6.9</math>, Ala-C<math>^\alpha</math>H), 6.92 (H, d, C<sub>4</sub>H, Aromat), 7.22 (H, m, C<sub>5</sub>H, Aromat), 7.45 (2H, d, C<sub>2,6</sub>H, Aromat), 8.28 (2H, br.s, H<sub>2</sub>N-), 10.62 (H, s, -NH-)</p>
	<p><math>\delta</math> [ppm] (DMSO-<math>d_6</math>): 1.50 (3H, d, <math>^3J=6.9</math>, Ala-C<math>^\beta</math>H<sub>3</sub>), 3.31 (3H, s, Aromat-CH<sub>3</sub>), 4.14 (H, q, <math>^3J=7.0</math>, Ala-C<math>^\alpha</math>H), 7.14 (H, m, C<sub>4</sub>H, Aromat), 7.19 (H, m, C<sub>5</sub>H, Aromat), 7.24 (H, d, C<sub>3</sub>H, Aromat), 7.36 (H, dd, C<sub>6</sub>H, Aromat), 8.31 (2H, br.s, H<sub>2</sub>N-), 10.01 (H, br.s, -NH-)</p>
	<p><math>\delta</math> [ppm] (DMSO-<math>d_6</math>): 1.38 (3H, d, <math>^3J=7.0</math>, Ala-C<math>^\beta</math>H<sub>3</sub>), 2.28 (3H, s, Aromat-CH<sub>3</sub>), 3.85 (H, q, <math>^3J=7.0</math>, Ala-C<math>^\alpha</math>H), 4.28 (2H, d, <math>^3J=5.9</math>, -CH<sub>2</sub>-), 7.15 (4H, m, C<sub>2,6</sub>H, C<sub>3,5</sub>H, Aromat), 8.22 (2H, br.s, H<sub>2</sub>N-), 8.92 (H, t, <math>^3J=5.8</math>, -NH-)</p>
	<p><math>\delta</math> [ppm] (DMSO-<math>d_6</math>): 1.49 (3H, d, <math>^3J=7.1</math>, Ala-C<math>^\beta</math>H<sub>3</sub>), 4.16 (H, q, <math>^3J=7.0</math>, Ala-C<math>^\alpha</math>H), 7.92 (2H, m, C<sub>3,5</sub>H, Aromat), 8.26 (2H, m, C<sub>2,6</sub>H, Aromat), 8.36 (2H, br, H<sub>2</sub>N-)</p>

H-Ala-NH-  * HCl	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.50 (3H, d, <sup>3</sup> J=6.9, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 4.12 (H, q, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), 7.66 (H, t, C <sub>4</sub> H, Aromat), 7.99 (2H, m, C <sub>2,5</sub> H, Aromat), 8.33 (2H, br.s, H <sub>2</sub> N-), 8.66 (H, t, C <sub>6</sub> H, Aromat),
H-Ala-NH-  * HBr	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.48 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.1, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 4.12 (H, br.t, <sup>3</sup> J=6.6, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), 7.47 (H, m, C <sub>4</sub> H, Aromat), 7.57 (H, m, C <sub>5</sub> H, Aromat), 7.76 (H, m, C <sub>3</sub> H, Aromat), 7.99 (H, dd, C <sub>6</sub> H, Aromat), 8.19 (2H, br.s, H <sub>2</sub> N-), 10.79 (H, s, -NH-)
H-Ala-NH-  * HBr	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.52 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.1, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 4.13 (H, br.s, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), 8.28 (2H, br.s, H <sub>2</sub> N-), 8.57 (H, t, C <sub>4</sub> H, Aromat), 8.87 (2H, d, C <sub>2,6</sub> H, Aromat), 11.37 (H, br.s, -NH-)
H-Ala-NH-CH <sub>2</sub> -  * HCl	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.42 (3H, d, <sup>3</sup> J=6.9, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 3.93 (H, q, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), 4.47 (2H, d, J=4.9, -CH <sub>2</sub> -), 7.56 (2H, d, C <sub>3,5</sub> H, Aromat), 8.20 (2H, d, C <sub>2,6</sub> H, Aromat), 8.24 (2H, br.s, H <sub>2</sub> N-), 9.21 (H, t, <sup>3</sup> J=6.0, -NH-)
H-Ala-NH-  * HCl	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.46 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.1, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 4.07 (H, q, <sup>3</sup> J=7.1, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), 7.41 (2H, m, C <sub>3,5</sub> H, Aromat), 7.68 (2H, m, C <sub>2,6</sub> H, Aromat), 8.29 (2H, br, H <sub>2</sub> N-), 10.94 (H, br, -NH-)
H-Ala-NH-  * HCl	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.47 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 4.08 (H, br.t, <sup>3</sup> J=6.1, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), 7.17 (H, m, C <sub>4</sub> H, Aromat), 7.38 (H, t, C <sub>5</sub> H, Aromat), 7.56 (H, m, C <sub>2</sub> H, Aromat), 7.83 (H, t, C <sub>6</sub> H, Aromat), 8.34 (2H, br.s, H <sub>2</sub> N-), 11.04 (H, br.s, -NH-)
H-Ala-NH-  * HCl	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.51 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 4.17 (H, br.s, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), 7.27 (H, m, C <sub>4</sub> H, Aromat), 7.38 (H, m, C <sub>5</sub> H, Aromat), 7.56 (H, d, C <sub>3</sub> H, Aromat), 7.61 (H, d, C <sub>6</sub> H, Aromat), 8.36 (2H, br.s, H <sub>2</sub> N-), 10.21 (H, br.s, -NH-)
H-Ala-NH-  * HCl	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.49 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.1, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 4.09 (H, q, <sup>3</sup> J=6.9, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), von 7.32 bis 7.75 (9H, 4m, Aromaten), 8.39 (2H, br H <sub>2</sub> N-), 10.81 (H, br.s, -NH-)
H-Ala-NH-  * HCl	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.49 (3H, <sup>3</sup> d, J=7.0, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 4.09 (H, q, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), 7.39 bis 7.94 (9H, 4m, Aromaten), 8.31 (2H, br.s, H <sub>2</sub> N-), 10.87 (H, br.s, -NH-)
H-Ala-NH-  * HCl	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.26 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.1, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 3.89 (H, q, <sup>3</sup> J=7.1, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), 7.39 (9H, m, Aromaten), 8.19 (2H, br.s, H <sub>2</sub> N-), 9.92 (H, br.s, -NH-)
H-Ala-NH-  * HCl	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.46 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 4.05 (H, q, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), 7.19 (2H, t, C <sub>3,5</sub> H, Aromat), 7.67 (2H, dd, C <sub>2,6</sub> H, Aromat), 8.31 (2H, br.s, -NH <sub>2</sub> ), 10.85 (H, br.s, -NH-)
H-Ala-NH-  * HBr	$\delta$ [ppm] (DMSO-d <sub>6</sub> ): 1.49 (3H, d, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup><math>\beta</math></sup> H <sub>3</sub> ), 4.13 (H, q, <sup>3</sup> J=7.0, Ala-C <sup><math>\alpha</math></sup> H), 7.34 (2H, t, C <sub>3,5</sub> H, Aromat), 8.40 (2H, br, H <sub>2</sub> N-)

 <p>H-Ala-NH-C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>F<sub>3</sub> * HBr</p>	<p>δ [ppm] (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.46 (3H, d, <sup>3</sup>J=7.0, Ala-C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>), 4.03 (H, q, <sup>3</sup>J=6.9, Ala-C<sup>α</sup>H), 7.54 (2H, dd, C<sub>2,6</sub>H, Aromat), 8.19 (2H, br.s, H<sub>2</sub>N-), 10.79 (H, br, -NH-)</p>
 <p>H-Ala-NH-C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>F<sub>4</sub> * HBr</p>	<p>δ [ppm] (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.50 (3H, d, <sup>3</sup>J=7.1, Ala-C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>), 4.18 (H, q, <sup>3</sup>J=7.1, Ala-C<sup>α</sup>H), 8.77 (2H, br, H<sub>2</sub>N-)</p>
 <p>H-Ala-NH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOH * HCl</p>	<p>δ [ppm] (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.03 (H, s, -COOH), 1.48 (3H, d, <sup>3</sup>J=6.9, Ala-C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>), 4.11 (H, q, <sup>3</sup>J=7.1, Ala-C<sup>α</sup>H), 7.77 (2H, d, C<sub>3,5</sub>H, Aromat), 7.92 (2H, d, C<sub>2,6</sub>H, Aromat), 8.39 (2H, br, H<sub>2</sub>N-), 11.07 (H, br.s, -NH-)</p>
 <p>H-Ala-NH-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(COOH) * HCl</p>	<p>δ [ppm] (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.48 (3H, d, <sup>3</sup>J=6.9, Ala-C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>), 4.08 (H, q, <sup>3</sup>J=6.9, Ala-C<sup>α</sup>H), 7.48 (H, t, C<sub>4</sub>H, Aromat), 7.68 (H, m, C<sub>5</sub>H, Aromat), 7.87 (H, m, C<sub>3</sub>H, Aromat), 8.27 (H, t, C<sub>6</sub>H, Aromat), 8.45 (2H, br, H<sub>2</sub>N-), 10.92 (H, br.s, -NH-)</p>
 <p>H-Ala-NH-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(COOH)<sub>2</sub> * HCl</p>	<p>δ [ppm] (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.52 (3H, <sup>3</sup>d, J=7.0, Ala-C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>), 3.16 (H, s, -COOH), 4.20 (H, q, <sup>3</sup>J=6.9, Ala-C<sup>α</sup>H), 7.25 (H, t, C<sub>4</sub>H, Aromat), 7.64 (H, m, C<sub>5</sub>H, Aromat), 7.99 (H, d, C<sub>3</sub>H, Aromat), 8.24 (H, d, C<sub>6</sub>H, Aromat), 8.41 (2H, br.s, H<sub>2</sub>N-), 11.32 (H, br.s, -NH-)</p>
 <p>H-Ala-NH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOCH<sub>3</sub> * HCl</p>	<p>δ [ppm] (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.48 (3H, d, <sup>3</sup>J=7.0, Ala-C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>), 3.83 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 4.12 (H, q, <sup>3</sup>J=7.0, Ala-C<sup>α</sup>H), 7.80 (H, d, C<sub>3,5</sub>H, Aromat), 7.96 (H, d, C<sub>2,6</sub>H, Aromat), 8.34 (2H, br.s, H<sub>2</sub>N-), 11.16 (H, br.s, -NH-)</p>
 <p>H-Ala-NH-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(COOCH<sub>3</sub>) * HCl</p>	<p>δ [ppm] (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.48 (3H, d, <sup>3</sup>J=7.0, Ala-C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>), 3.86 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 4.07 (H, q, <sup>3</sup>J=7.0, Ala-C<sup>α</sup>H), 7.52 (H, t, C<sub>4</sub>H, Aromat), 7.70 (H, d, C<sub>5</sub>H, Aromat), 7.89 (H, m, C<sub>2</sub>H, Aromat), 8.31 (H, br.s, C<sub>6</sub>H, Aromat), 8.31 (2H, br.s, H<sub>2</sub>N-), 10.98 (H, br.s, -NH-)</p>
 <p>H-Ala-NH-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(COOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> * HCl</p>	<p>δ [ppm] (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.50 (3H, d, <sup>3</sup>J=7.0, Ala-C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>), 3.84 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 4.17 (H, q, <sup>3</sup>J=7.0, Ala-C<sup>α</sup>H), 7.30 (H, t, C<sub>4</sub>H, Aromat), 7.65 (H, m, C<sub>5</sub>H, Aromat), 7.89 (2H, m, C<sub>3,6</sub>H, Aromat), 8.34 (2H, br.s, H<sub>2</sub>N-), 10.82 (H, br.s, -NH-)</p>
 <p>H-Ala-NH-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N * HCl</p>	<p>δ [ppm] (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.37 (3H, d, <sup>3</sup>J=7.0, Ala-C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>), 1.61 (H, m, C<sub>3</sub>H), 1.79 (4H, m, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>), 1.99 (H, m, C<sub>3</sub>H'), 3.14 (2H, br.s, C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>), 3.79 (H, m, Ala-C<sup>α</sup>H), 4.20 (H, m, C<sub>4</sub>H), 7.68 (H, br.s, -NH- [Ring]), 8.21 (H, d, J=4.3, H<sub>2</sub>N-), 8.59 (H, d, J=8.3, -NH-)</p>
<p>H-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH</p>	<p>δ [ppm] (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.11 (3H, d, J=6.8, Ala-C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>), 3.12 (2H, q, <sup>3</sup>J=4.9, -NH-CH<sub>2</sub>-), 3.22 (H, q, <sup>3</sup>J=6.9, Ala-C<sup>α</sup>H), 3.39 (2H, t, <sup>3</sup>J=6.0, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.65 (H, br.s, -OH), 7.79 (H, br.s, -NH-)</p>

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. K. Neubert danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seinen zahlreichen Hinweisen und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie seinen hilfreichen Diskussionen und die gewährte Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Frau Dr. B. Hartrodt danke ich für die Einführung in die Peptidchemie und ihre intensive, ideenreiche und gute Betreuung. Ihre tatkräftige und ausdauernde Unterstützung war mir in allen Phasen dieser Arbeit eine wertvolle Hilfe.

Herrn Dr. habil. M. Brandsch danke ich für die engagierte Unterstützung, für die fachlichen Diskussionen und Anregungen und die Einführung in die Zellkulturtechnik.

Frau I. Knütter und Dr. F. Hirche danke ich für ihre Unterstützung bei der Zellkulturarbeit und der Überlassung einiger Daten.

Frau Dr. C. Mrestani-Klaus danke ich für die Anfertigung der NMR-Spektren und den hilfreichen Hinweisen bei der Auswertung.

Frau Dr. A. Schierhorn und ihrem Team danke ich für die Anfertigung der MS-Spektren.

Für die Einführung in die CE - Technik und den wertvollen Hinweisen bei der Auswertung der Daten danke ich Frau Dr. I. Born.

Allen Mitarbeitern der AG „Peptidchemie“ danke ich für die ständige Diskussion und Hilfsbereitschaft. Hier gilt mein besonderer Dank Frau Ch. Langer, für die allseits gewährte synthesesetchnische Unterstützung.

## Lebenslauf

Angaben zur Person	Volker Börner Lindenstr. 17 01561 Zottewitz
	geb. am 15.10.1966 in Jessen/E. ledig, keine Kinder
Schulbildung	1973 – 1983 POS „Thomas Müntzer“ Klöden
Berufsausbildung	1983 – 1986 Maschinen- und Anlagenmonteur mit Abitur VEB LIA Nauen
Berufstätigkeit	1986 Monteur VEB Landtechn. Anlagenbau Gerbisbach
	1986 Abfüller VEB Synthesewerk Schwarzheide
	1986 – 1988 NVA Grundwehrdienst
	1988 Abfüller VEB Synthesewerk Schwarzheide
	1988 – 1990 Student TH „Leuna-Merseburg“ FB Werkstofftechnik
	1990 – 1991 Wachmann „Wachschutz“ GmbH Halle/S.
	1991 – 1996 Student MLU Halle-Wittenberg FB Chemie
	1996 – 2000 Doktorand MLU Halle-Wittenberg FB Biochemie/Biotechnologie
	2000 – 2001 Wiss. Mitarbeiter FEW Chemicals GmbH, Wolfen
	2001 Wiss. Mitarbeiter IPF e.V., Dresden

Volker Börner

Halle, 02.08.2002

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen aus veröffentlichten Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher an keiner weiteren Hochschule oder Universität zur Promotion eingereicht.

Volker Börner