

**Ein kombinatorisches Verfahren  
zur Charakterisierung  
verschiedener Subtypen von HIV-1  
anhand ihrer Seroreaktivität**

Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe - Universität  
in Frankfurt am Main

von

**Christian Hoffmann**

aus

Frankfurt am Main

Frankfurt am Main

2001

(DF 1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. W.E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. C. Griesinger  
PD Dr. H. v. Briesen

Datum der Disputation: 23.01.2002

*Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet*



*Wahrheit ist ewig,  
Wissen ist wandelbar  
—  
und die Verwechslung beider  
verheerend.*

*Madeleine L'Engle*



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1998 bis November 2001 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. C. Griesinger am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. C. Griesinger danke ich für die Überlassung des sehr anspruchsvollen interdisziplinären Themas, die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten, die stete Diskussionsbereitschaft und das nachhaltige Interesse am Fortgang der Arbeit sowie zahlreiche Anregungen.

Für die ergebnisreiche Kooperation, den regen intellektuellen Austausch mit dem Georg-Speyer-Haus und die Bereitstellung HIV-positiver Seren möchte ich Frau Dr. Ursula Dietrich, Herrn Christoph Königs sowie UNAIDS danken.

Herrn Prof. Dr. Michael Karas, Herrn Dr. Michael Thierolf und Herrn Dipl.-Chem. Ralf Krüger, Instrumentelle Analytische Chemie, danke ich für die ebenfalls sehr erfolgreiche Kooperation.

Frau Prof. Dr. S. Zolla-Pazner, Veterans Affairs Medical Center, New York, danke ich für die Bereitstellung humaner monoklonaler Antikörper.

Herrn Dr. Dierk Blechschmidt danke ich für die Zusammenarbeit bei *Biblio*. Meinen Laborkollegen Herrn Dr. Michael Baumann und Herrn Dipl.-Chem. Christian Volk danke ich für zahlreiche Gespräche und Anregungen während und außerhalb der Labortätigkeit.

Frau Ellen Lichte und Frau Elke Stirnal danke ich für die zahlreichen anspruchsvollen HPLC-Trennungen.

Dr. John B. Ferebee und Dr. Jens Meiler danke ich für die Hilfestellung bei statistischen Fragestellungen.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für das freundschaftliche und konstruktive Arbeitsklima.

Der Hermann-Wilkomm-Stiftung danke ich für die Gewährung von Reisestipendien.

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Humanes Immundefizienz-Virus</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Motivation und Zielsetzung</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Peptide</b>	<b>9</b>
3.1	Definition	9
3.2	Peptidsynthese an fester Phase	9
3.3	Schutzgruppenstrategien	11
3.4	Ankergruppen	15
3.5	Aktivierungsmethoden	16
3.6	Nebenreaktionen	21
3.7	Reaktionskontrolle	25
3.8	Kombinatorische Festphasenpeptidsynthese	28
<b>4</b>	<b>Entwurf und Planung eines kombinatorischen Immunassays</b>	<b>33</b>
4.1	Allgemeine Zielsetzung	33
4.2	Konzept der Codierung kombinatorischer Peptidbibliotheken durch adaptive Einführung von Kettenabbruchsequenzen	34
4.3	Konzept eines Testverfahrens für das iterative Screening festphasengebundener Substanzbibliotheken	37
4.4	Visuelle Darstellung des Gesamtkonzepts	39
<b>5</b>	<b>Entwicklung eines Verfahrens zur MS-Analyse kombinatorischer Peptidbibliotheken</b>	<b>41</b>
5.1	HPLC-Quantifizierung der gezielten Erzeugung von Rumpfsequenzen	41
5.2	Massenspektrometrische Sequenzierung von einzelnen Beads	46
5.3	Synthese N-terminal derivatisierter Aminosäuren	49
5.3.1	Allgemeine Anforderungen für Aminosäurederivate	49
5.3.2	Festphasenstrategie	49
5.3.3	Formylierung des Aminoterminus	50
<b>6</b>	<b>Deutschsprachige Fassung der Veröffentlichung über die massenspektrometrische Analyse kombinatorischer Peptidbibliotheken</b>	<b>53</b>

<b>7</b>	<b>Manuskript der Veröffentlichung über die massenspektrometrische Analyse kombinatorischer Peptidbibliotheken</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Entwicklung eines festphasengebundenen Immunfluoreszenzassays</b>	<b>101</b>
	8.1 Evaluation der Beadmatrix	101
	8.2 Evaluation des Testsystems	103
	8.3 Screening monoklonaler Antikörper	111
	8.4 Optimierung der sekundärantikörpervermittelten Detektion	113
	8.5 Entwicklung einer Trägermatrix für iteratives Screening	114
	8.6 Iteratives Festphasenscreening ausgewählter Modellpeptide	118
	8.7 Gesamtüberblick aller durchgeführten Entwicklungs- und Optimierungsschritte des Immunfluoreszenzassays	121
<b>9</b>	<b>Deutschsprachige Fassung der Veröffentlichung über den kombinatorischen Immunassay zur Charakterisierung verschiedener HIV-1-Subtypen an Hand ihrer Seroreaktivität</b>	<b>123</b>
<b>10</b>	<b>Manuskript der Veröffentlichung über den kombinatorischen Immunassay zur Charakterisierung verschiedener HIV-1-Subtypen an Hand ihrer Seroreaktivität</b>	<b>141</b>
<b>11</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>171</b>
<b>12</b>	<b>Anhang</b>	<b>175</b>
	12.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften	175
	12.1.1 Peptidchemie und organische Festphasensynthese	175
	12.1.2 MALDI-Massenspektroskopie	180
	12.1.3 Codierung und Decodierung kombinatorischer Bibliotheken	181
	12.1.4 Klebefixierung von TentaGel-Beads	185
	12.1.5 Protokolle der biologischen Tests	187
	12.2 Synthetische Daten	189
	12.2.1 Aminosäurederivate	189

12.2.1.1	N- $\alpha$ -4-Acetaminobenzoyl-N <sup>G</sup> -2,2,5,7,8-Pentamethyl- chroman-6-sulfonyl-L-Arginin	189
12.2.1.2	N- $\alpha$ -Propionyl-N <sup>G</sup> -2,2,5,7,8-Pentamethylchroman- 6-sulfonyl-L-Arginin	190
12.2.1.3	N- $\alpha$ -Benzoyl-N- $\gamma$ -trityl-L-Glutamin	191
12.2.1.4	N- $\alpha$ -Formyl-N- $\gamma$ -trityl-L-Glutamin	192
12.2.1.5	N- $\alpha$ -2-Naphtoyl-N-im-trityl-L-Histidin	193
12.2.1.6	N- $\alpha$ -Benzoyl-N- $\epsilon$ - <sup>tert.</sup> butyloxycarbonyl-L-Lysin	194
12.2.1.7	N- $\alpha$ -Benzoyl-O- <sup>tert.</sup> butyl-L-Serin	195
12.2.1.8	N- $\alpha$ -Formyl-O- <sup>tert.</sup> butyl-L-Threonin	196
12.2.1.9	N- $\alpha$ -Acetyl-N-in- <sup>tert.</sup> butyloxycarbonyl-L-Tryptophan	197
12.2.2	Peptide	198
12.2.2.1	GE9622	198
12.2.2.2	GE9701	199
12.2.2.3	RU9801	200
12.2.2.4	C-Myc-ref	201
12.2.2.5	Syntheseserie „12capLAGV“	202
12.2.2.6	Cap4G8	204
12.2.2.7	Cap11G11	206
12.2.2.8	Ac-GE9622-TG-A bzw. GE9622-TG-A („B-consensus“)	209
12.2.2.9	Ac-GE9622-TG-O bzw. GE9622-TG-O	211
12.2.2.10	Ac-C-Myc-TG-A bzw. C-Myc-TG-A	213
12.2.2.11	Ac-C-Myc-TG-O bzw. C-Myc-TG-O	215
12.2.2.12	B-R01	217
12.2.2.13	B-R03Q08	219
12.2.2.14	NoV3	221
12.2.2.15	1324E	223
12.2.2.16	91-5/p24	225
12.2.3	Peptidbibliotheken	227
12.2.3.1	V3B-PAM-Lib	227
12.2.3.2	Modellcap-Lib	232
12.2.3.3	Modellcap2-Lib	236
12.2.3.4	V3Bcap-Lib	240
12.2.3.5	V3AFcap-Lib	246

12.3	Liste der sequenzierten Peptide der Heptapeptidbibliothek „Modellcap2-Lib“	251
12.4	Verwendete Abkürzungen	254
12.5	Verwendete Geräte und Materialien	260
12.6	Literaturverzeichnis	265
Lebenslauf		272
Akademische Lehrer		273
Eidesstattliche Erklärung		274



# 1 Humanes Immundefizienz-Virus

Seit der ersten klinischen Manifestation<sup>[1]</sup> des Krankheitsvollbildes AIDS und der Identifikation des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) als dessen Auslöser sind bedeutende Fortschritte bei der Therapie dieser erworbenen Immunschwäche erzielt worden. Diese beruhen im Wesentlichen auf der Einführung einer multiplen Kombinationstherapie hochpotenter Virustatika mit verschiedenen Angriffsorten des viralen Replikationszyklus<sup>[2]</sup>:

- Nukleosidische Inhibitoren der Reversen Transkriptase ersetzen Nukleotide während der Transkription viraler RNA und führen zu einem Kettenabbruch der produzierten DNA,
- Nichtnukleosidische Inhibitoren der Reversen Transkriptase, so genannte NNRTIs, inhibieren das Enzym allosterisch,
- Proteaseinhibitoren binden an das aktive Zentrum der Protease und verhindern so die Freisetzung viraler Kernproteine sowie die Reifung infektiöser Viruspartikel.

Dem Krankheitsverlauf und dem Zustand des Patienten angepasste Therapieregime dieser hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) konnten Lebenserwartung und Lebensqualität von wenigen Wochen auf mehrere Jahre steigern<sup>[3],[4]</sup>. Weitere chemotherapeutische Ansätze sind in Erprobung. Das mit starken konformationellen Änderungen des Virushüllproteins gp120 einhergehende Eindringen eines Viruspartikels in die Wirtszelle<sup>[5]</sup> bietet zwei weitere Angriffspunkte einer Inhibition, zum einen die Blockade der Bindung von gp120 an CD4 und Chemokinrezeptoren der Wirtszelle, im Wesentlichen CCR5 und CXCR4, und zum anderen das Unterbinden der Membranfusion zwischen Virus und Wirt<sup>[6]</sup>. Verschiedene Substanzklassen, peptidische wie nichtpeptidische Wirkstoffe, befinden sich in präklinischen Tests<sup>[6]</sup>. Die HIV-1-Integrase schließlich, die für die Integration proviraler DNA in das Wirtsgenom notwendig ist, stellt ebenfalls ein Ziel für die Entwicklung geeigneter Inhibitoren dar<sup>[7]</sup>.

Eine vollständige Eradikation des Virus durch HAART allerdings gelingt nicht. Dies liegt zum einen an mangelnder und durch Resistenzentwicklungen im Laufe der Therapiedauer weiter abnehmender antiviraler Potenz und Verträglichkeit; schwerwiegender

jedoch ist die Bildung so genannter latenter Reservoirs<sup>[8]</sup>. HIV besitzt die Fähigkeit, sich in CD4-positiven T-Zellen zu verbergen; nach Beendigung der HAART steigt dann die Viruslast rapide auf das Niveau vor der Therapie an. Schätzungen von Finzi et al.<sup>[9]</sup> zufolge spricht die hohe Halbwertszeit dieses latenten Reservoirs von 44 Monaten für eine lebenslange Persistenz von HIV-1.

Latente Reservoirs sind metabolisch inaktiv<sup>[10]</sup>; um diese aufzulösen und die verbliebenen Viren der antiretroviralen Chemotherapie zugänglich zu machen, ist es daher notwendig, sie zu aktivieren. Erste diesbezügliche Versuche mit IL-2 in Kombination mit HAART<sup>[11]</sup> oder alleine<sup>[12]</sup> reduzierten die Viruslast in der Tat signifikant. Weitere Immunmodulatoren, wie die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 konnten latent infizierte T-Zellen *in vitro* ebenfalls aktivieren<sup>[13]</sup>.

Im Hinblick auf eine breit anwendbare, verträgliche und vor allem nachhaltig wirksame Therapie steht allerdings die Entwicklung eines therapeutischen HIV-spezifischen Impfstoffes im Vordergrund. Die gegenwärtigen Anforderungen an die Entwicklung eines solchen Impfstoffes lassen sich wie folgt zusammenfassen<sup>[14]</sup>:

- Identifikation von Immunogenen, die eine breite und lang anhaltende, durch cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) vermittelte Immunität hervorrufen,
- Definition von Strukturen und Immunisierungsstrategien, die die Bildung breit neutralisierender Antikörper hervorrufen,
- Findung der Wirkmechanismen der Immunabwehr in menschlichen oder tierischen Modellen,
- Entwicklung von Strategien, die die genetische Diversität von HIV berücksichtigen sowie die
- Weiterführung und Ausdehnung klinischer Versuche.

Solange im Besonderen die Wirkmechanismen protektiver Immunität gegen HIV nicht aufgeklärt sind, stehen Impfstoffkandidaten im Vordergrund, die mehrere Komponenten des Immunsystems gleichzeitig stimulieren<sup>[15]</sup>: benötigt wird eine Kombination aus langlebigen T-Gedächtniszellen, CD8-positiven cytotoxischen T-Lymphozyten und CD4-positiven T-Helferzellen. Gleichzeitig jedoch muss eine Strategie zur Induktion breit neutralisierender Antikörper gefunden werden, um eine hocheffektive, möglichst lebenslange Immunität hervorzurufen<sup>[14]</sup>. Des weiteren haben sich  $\beta$ -Chemokine und deren Rezeptoren (CCR5, CXCR4) als essentiell für die HIV-Infektion erwiesen<sup>[16],[17]</sup>; rare Beispiele für native

Immunität gegenüber HIV wird in Personen mit Mutationen im CCR5-Rezeptor gefunden<sup>[18],[19]</sup>. Immunogene, die die Bildung von Antikörpern hervorrufen, die ihrerseits die Bindung von HIV an die  $\beta$ -Chemokinrezeptoren verhindern, könnten sich hierbei als hilfreich erweisen<sup>[14]</sup>.

Zur Zeit befinden sich weltweit etwa drei Dutzend Impfstoffkandidaten in klinischer Erprobung<sup>[14],[20]</sup>, die auf rekombinanten nichtviralen und viralen Vektoren und deren Kombination beruhen. So wird etwa ein DNA-Impfstoff mit Cytokin-Fusionsproteinen bzw. Plasmiden, die diese codieren<sup>[21]</sup>, kombiniert. Ein Erfolg versprechender Ansatz, dessen Wirksamkeit zunächst im Tiermodell mit Rhesus-Makaken nachgewiesen wurde, stützt sich auf einen rekombinanten Kuhpocken-Impfstoff<sup>[22]</sup> in Kombination mit einer Erstimmunisierung mit DNA<sup>[22]</sup>. Rekombinanten des vesikulären Stomatitisvirus<sup>[23]</sup> erwiesen sich im Tiermodell mit Rhesus-Makaken als Beispiel für einen effektiven attenuierten Ganzvirusimpfstoff. Eine Arbeitsgruppe um Nunberg<sup>[24]</sup> konnte *in vitro* zeigen, dass formaldehydfixierte Ganzzellimpfstoffe neutralisierende Antikörper gegen 23 von 24 primären HIV-Isolaten der Subtypen A bis E hervorrufen konnten; jedoch konnten diese Befunde im Tiermodell bislang nicht untermauert werden.

Schließlich existieren auf rationalem Wirkstoffdesign basierende Ansätze, die konformationelle Epitope der Bindung der monoklonalen Antikörper 58.2<sup>[25]</sup> bzw. b12<sup>[26]</sup> bei Bindung an Epitope des viralen Hüllproteins gp120 imitieren und ebenfalls die Bildung neutralisierender Antikörper stimulieren.

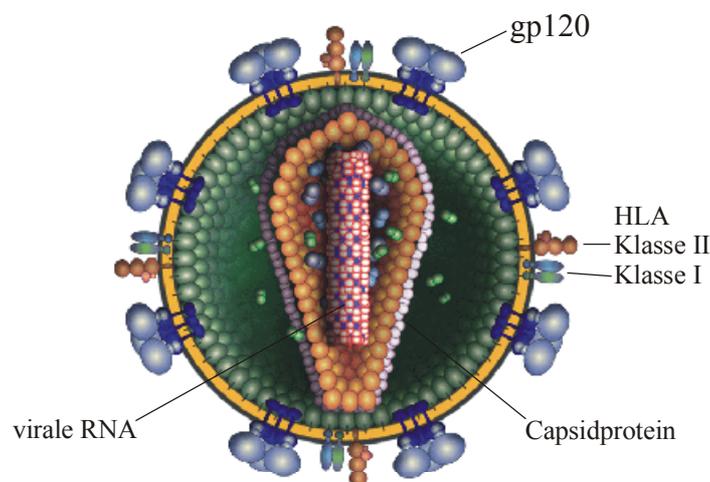


Abb. 1.1: Humanes Immundefizienzvirus 1 (HIV-1)<sup>[27]</sup>

Eine weitere Zielregion für die Entwicklung eines therapeutischen Impfstoffes stellt die dritte hypervariable Schleife des viralen Hüllproteins gp120 oder V3-Schleife dar. Schon früh wurde die V3-Schleife, insbesondere deren etwa acht Aminosäuren umfassende, um das Hauptmotiv GPGR(Q) angeordnete Spitze, als eine der Hauptdeterminanten der antikörpervermittelten Virusneutralisation (*principal neutralizing determinant, PND*) erkannt<sup>[28]-[32]</sup>. Sie ist ebenfalls die Hauptdeterminante des zellulären Tropismus<sup>[33]-[36]</sup> und der Korezeptorspezifität<sup>[37]-[42]</sup>; der V3-Schleife kommt somit eine Schlüsselfunktion beim Eindringen des Virus in die Wirtszelle zu<sup>[38],[41],[42]</sup>.

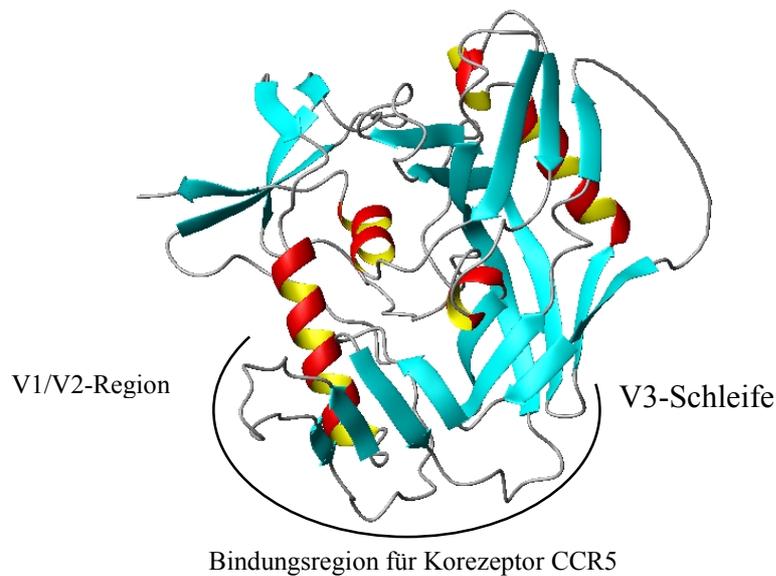


Abb. 1.2: Struktur von gp120 nach Wyatt et al.<sup>[43]</sup>

Gegen die V3-Region gerichtete Antikörper können zur protektiven Immunität<sup>[44]-[46]</sup> und zu einer Reduktion der Virämie in infizierten Tieren beitragen<sup>[47],[48]</sup>. Bislang jedoch existiert nur ein einziges Beispiel für eine partielle Virusneutralisation durch V3-spezifische Antikörper mit niedrigem Titer<sup>[49]</sup>. Der Hauptgrund für das bisherige Fehlschlagen einer breit neutralisierenden Antikörperantwort liegt in der bereits erwähnten enormen genetischen Variabilität des Virus<sup>[14]</sup>, die sich im Polymorphismus von gp120 niederschlägt: Man kennt mittlerweile zehn Subtypen innerhalb der größeren Gruppe M von HIV-1, die genetisch um je etwa 30 % divergieren; noch größere Divergenzen findet man in den Nebengruppen O und N (bzw. non-M non-O)<sup>[50]</sup>.

Erschwerend kommt hinzu, dass die Relation zwischen viralen Genotypen und der antigenen Variation unklar ist. Genetisch bestimmte, auf Sequenzhäufung<sup>[50]</sup> basierende virale Subtypen korrespondieren im Allgemeinen nicht mit den immunologisch definierten

Serotypen: Man beobachtet in immunologischen Tests, die auf V3-consensus-Peptiden beruhen, die verschiedenen genetischen Subtypen entnommen sind, und den entsprechenden HIV-1-positiven Patientenseren<sup>[51]-[53]</sup> große Kreuzreaktivitäten. Des Weiteren entsprechen serologische Gruppierungen, die das Neutralisationsverhalten primärer HIV-1-Isolate widerspiegeln, ebenfalls nicht den genetisch definierten Subtypen<sup>[51],[54]-[56]</sup>. Darüber hinaus treten vielfach intersubtyp-rekombinante Viren und Koinfektionen mit mehreren Subtypen auf<sup>[57]-[60]</sup>.

Somit liegt die Verfolgung von Ansätzen zur Identifikation immunologischer Beziehungen zwischen HIV-1-Varianten nahe, die von genetisch definierten Subtypen unabhängig sind. Ein Erfolg versprechender Ansatz von Zolla-Pazner<sup>[61]</sup> basiert auf der Analyse der Reaktivitätsmuster von gegen die V3-Schleife gerichteten monoklonalen Antikörpern und entsprechenden V3-abgeleiteten Peptiden. Diese führte zu einer begrenzten Anzahl so genannter „Immuntypen“, die in der Tat von genetisch definierten Subtypen weitgehend unabhängig sind. Eine weitere Studie<sup>[62]</sup> bestätigte, dass sich diese Immuntypen durch Epitope definieren und unterscheiden lassen und es weniger Immuntypen als Genotypen gibt.



## 2 Motivation und Zielsetzung

Wie bereits einleitend geschildert, verhindern die enorme genetische Variabilität<sup>[14],[50]</sup> von HIV-1 und die mangelnde Korrelation zwischen viralen genetisch definierten Subtypen und antigener Variation<sup>[51]-[56]</sup> bisher die Entwicklung eines Impfstoffs, der eine breite, HIV-1 neutralisierende Immunantwort hervorruft. Ein Ansatz der Gruppe um Zolla-Pazner<sup>[61]</sup> löst die alte, auf genetischer Sequenzhäufung basierende Subtypeneinteilung von HIV-1 zugunsten einer reaktivitätsbasierten Klassifikation auf. 21 gegen die V3-Schleife des viralen Hüllglycoproteins gp120 gerichtete monoklonale Antikörper wurden gegen 50 Peptide getestet, die ebener V3-Region entnommen waren. Starke Kreuzreaktivitäten wurden beobachtet. Nach Durchführung einer Clusteranalyse konnten die Antikörper in fünf und die Peptide in insgesamt sieben Cluster eingeteilt werden, die von den herkömmlichen genetischen Subtypen unabhängig sind.

Die fünf Antikörper-Cluster befinden sich in Übereinstimmung mit den Epitopen, die die Antikörper erkennen und auch die Peptide innerhalb ihrer Gruppen weisen eindeutige Sequenzmuster auf. Diese Muster reflektieren hochkonservierte Kernepitope im Bereich um die Spitze der V3-Schleife.

In einer weiter führenden Studie<sup>[62]</sup> wurden die immunologischen Beziehungen zwischen primären, nativen HI-Viren der genetischen Subtypen HIV-1 A bis H mit humanen monoklonalen Antikörpern, die gegen V3 und andere neutralisierende Epitope gerichtet sind, in Bindungsassays bestimmt. Eine multivariate Analyse zeigte auch hier, dass sich fünf Antikörper-Cluster definieren lassen. Des Weiteren können die HI-Viren in drei immunologisch differenzierende, so genannte „Immunotypen“ eingeteilt werden, die erneut nicht mit genetisch definierten Subtypen korrelieren. Der geographische Ursprung der Isolate und die Korezeptorabhängigkeit der Viren stellen ebenfalls keine brauchbaren Kriterien für eine adäquate Beschreibung der immunologischen Charakteristika dar.

Der Ansatz von Zolla-Pazner<sup>[61]</sup> beruhte auf der Verwendung von 21 monoklonalen Antikörpern, von denen 20 gegen Epitope des HIV-1-Subtyps B gerichtet sind. Es ist nicht ausgeschlossen, dass bei immunologischer Evaluation weiterer monoklonaler oder gar polyklonaler Antikörper, die an Epitope anderer HIV-1-Subtypen binden, zusätzliche Immunotypen gefunden werden.

Somit liegt es nahe, den ursprünglichen Ansatz auf eine breitere Basis sowohl von Antikörpern als auch von Peptiden zu stellen. Als Antikörperquelle kommen hierbei die polyklonalen Seren HIV-1-positiver Patienten in Betracht; man macht sich dabei das native HIV-spezifische Antikörperreservoir zu Nutze. Auf der Seite der Peptide als Zielmoleküle einer Ermittlung serologischer Reaktivität bietet sich ein kombinatorischer Zugang an.

Ziel der vorliegenden Arbeit war demnach die Entwicklung eines immunologischen Testsystems für das Screening humaner HIV-positiver Seren gegen kombinatorisch erzeugte Peptide mit dem Hintergrund, einen minimalen Satz reaktiver Peptide zu identifizieren, die eine serologisch basierte Subtypencharakterisierung erlauben. In nachfolgenden Studien könnte dann das Reaktivitätsmuster dieser Seren mit deren Neutralisationsverhalten bezüglich der korrespondierenden primären HIV-Isolate derselben und anderer Seroreaktivitätsgruppen korreliert werden.

Im Einzelnen wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Ziele verfolgt:

- Entwicklung eines Verfahrens zur schnellen und eindeutigen massenspektrometrischen Sequenzierung von Peptiden aus kombinatorischen Bibliotheken,
- Entwicklung eines immunologischen Testsystems für das iterative Screening HIV-positiver Seren gegen festphasengebundene Peptide,
- Screening von Serenpools verschiedener genetisch bestimmter Subtypen von HIV-1 gegen eine kombinatorische Peptidbibliothek, die die genetische Variation der V3-Region von gp120 reflektiert, und
- Multivariate Analyse der gefundenen Peptidsequenzen mit dem Ziel einer serologischen Interpretation der Reaktivität.

## 3 Peptide

### 3.1 Definition

Peptide können formal als Polymere von Aminosäuren angesehen werden, die über Amidbindungen miteinander verknüpft sind, wie man Anfang des 20. Jahrhunderts erkannte<sup>[63]</sup>. Während Oligopeptide maximal 10 – 15 Aminosäuren enthalten, gilt die Definition eines Polypeptids bis etwa 50 Aminosäuren; längere Aminosäurebiopolymere werden auch als Proteine bezeichnet. Eine Abgrenzung zwischen Polypeptiden und Proteinen neben dem Kriterium der Anzahl der Aminosäuren gelingt nicht scharf und basiert auf funktionalen Kriterien, wie z.B. der Faltung der Peptidkette in eine globuläre Struktur; Proteinen kommt eine Tertiärstruktur zu, Polypeptide hingegen weisen nur eine Sekundärstruktur auf.

Homöomere Peptide enthalten ausschließlich die zwanzig bekannten proteinogenen Aminosäuren, in heteromeren Peptiden hingegen findet man durch posttranslationale Modifikationen auch nichtproteinogene Bausteine, wie z.B. D-Aminosäuren, derivatisierte Aminosäuren (Selenocystein, Homoarginin) oder Hydroxyaminosäuren; N-terminale Aminosäuren können posttranslational acetyliert oder formyliert werden. Peptide, die nur Peptidbindungen enthalten, werden als homodete bezeichnet; heterodete Peptide weisen zusätzliche Disulfid-, Ester- oder Thioesterbindungen auf.

### 3.2 Peptidsynthese an fester Phase

Merrifield<sup>[64],[65]</sup> überwand durch die Einführung der Peptidsynthese an der festen Phase die entscheidenden Nachteile der klassischen Synthese in Lösung<sup>[66]</sup>, wie z.B. die notwendige Isolierung und Aufreinigung jedes Zwischenprodukts aus der Lösung; Schritte, die zwingend mit Ausbeuteverlusten einhergehen. Peptidfragmente, die seitenkettengeschützte Aminosäuren enthalten, erwiesen sich zudem als teilweise oder völlig unlöslich in den in Frage kommenden Lösemitteln des Kupplungsschrittes.

Die Festphasensynthese nach Merrifield stellt einen cyclisch geschlossenen Prozess dar, der durch wiederholte Entschützungs- und Kupplungsschritte charakterisiert ist (Abb. 3.1). Er bietet somit die Möglichkeit der Automation; ein Umstand, der entscheidend zum Aufschwung der Peptidchemie Ende des 20. Jahrhunderts beitrug. Zumeist wird die Synthese heterogen an einem unlöslichen polymeren Träger geführt; homogene Synthesen an löslichen Trägern sind aber auch möglich<sup>[67]</sup>. Die Einführung nicht-natürlicher oder radioaktiv

markierter Aminosäuren an beliebiger Position im Peptid unterstreichen die Vorteilhaftigkeit gegenüber der biochemischen Expression. Der große Erfolg der Festphasenmethode für Peptide initiierte die Entwicklung einer neuen Disziplin, der organischen Synthese an fester Phase<sup>[68]</sup>, die mittlerweile zum unverzichtbaren Repertoire jedes organisch-präparativen Chemikers gehört.

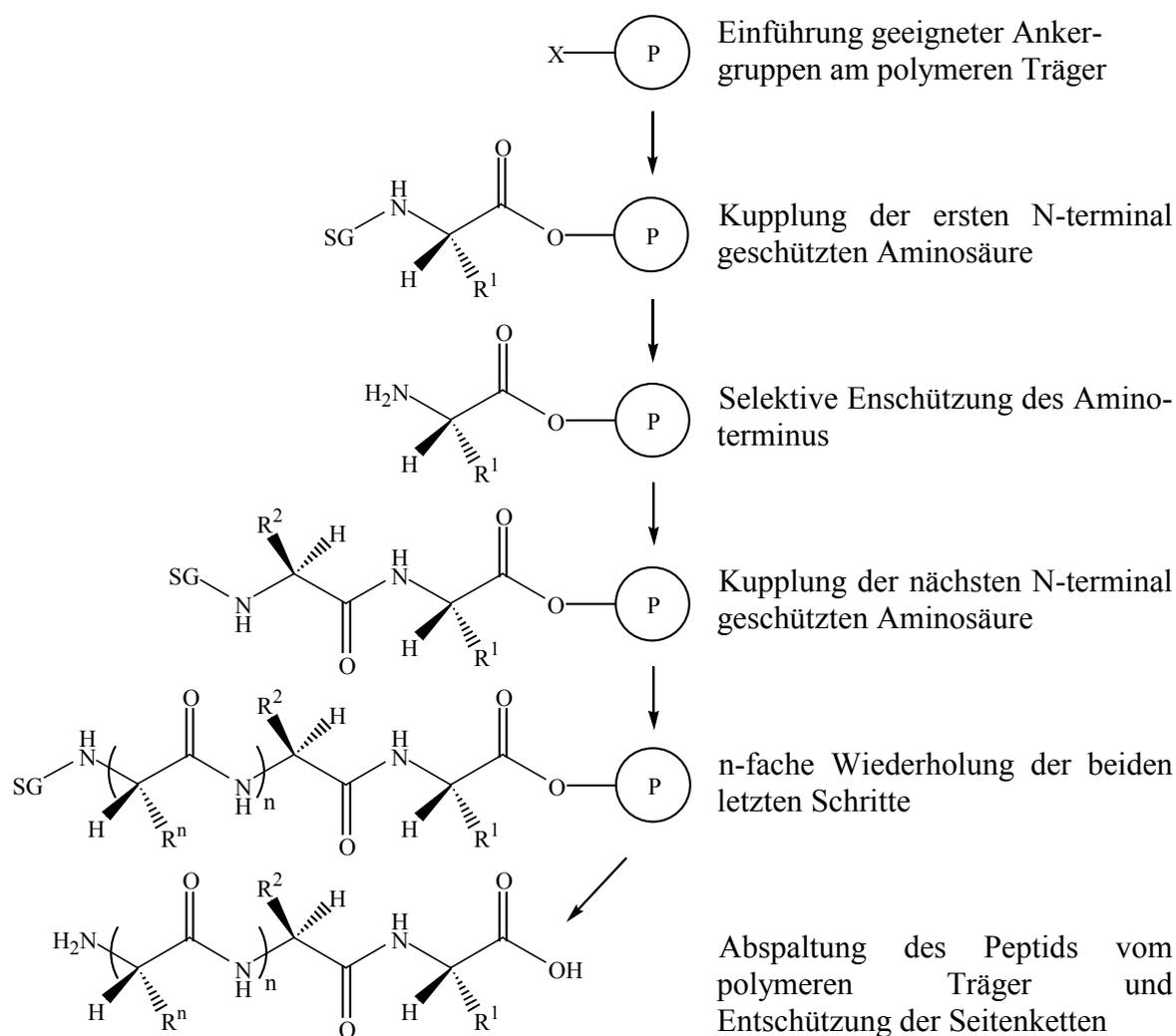


Abb. 3.1: Allgemeines Schema der Peptidsynthese an fester Phase

Der Träger der festen Phase, Harz genannt, ist ein unlösliches, in bezug auf die daran durchgeführten chemischen Umsetzungen inertes Polymer, das im verwendeten Lösemittel gut filtrierbar ist, um lösliche Komponenten leicht zu entfernen. Das polymere Gerüst der festen Phase besteht aus Polystyrol, welches mit 1 – 2 % Divinylbenzol quervernetzt ist. Mechanische Stabilität einerseits und Quellfähigkeit in verschiedenen organischen Lösemitteln andererseits sind so gewährleistet. Letzteres ist wichtig, um den reaktiven Komponenten auch in den inneren Oberflächen des Harzes liegende Bindungsstellen zugänglich zu machen. Propfcopolymere aus Polystyrol und Polyoxyethylen bzw.

Polythylenglycol, die unter dem Namen TentaGel<sup>[69]</sup> eingeführt wurden, sind auch in Wasser hervorragend quellfähig; eine Eigenschaft, die bei biologischen Tests von Bedeutung ist. Eine Ankergruppe trennt Peptid und den sterisch sehr anspruchsvollen polymeren Träger voneinander und definiert über ihre späteren Abspaltbedingungen auch die Synthese- und Schutzgruppenstrategie. Einige für die vorliegende Arbeit relevante Ankergruppen werden in Kap. 3.4 vorgestellt.

Nach Kupplung der ersten, N-terminal geschützten Aminosäure an die feste Phase wird die N<sup>α</sup>-Schutzgruppe selektiv entfernt und das Aminoacylpolymer mit der nächsten N<sup>α</sup>-geschützten Aminosäure umgesetzt. Die chemische Synthese erfolgt somit entgegen der biochemischen Synthese vom C- zum N-Terminus des Peptids, da eine prinzipielle auch mögliche Reaktionsführung vom N- zum C-Terminus mit einer größeren Racemisierungstendenz einhergeht<sup>[70]</sup>.

Entfernung der N-terminalen Schutzgruppe und Kupplung der nachfolgenden Aminosäure werden so oft wie gewünscht durchgeführt. Die umständliche Isolierung und Reinigung von Zwischenprodukten entfällt; überschüssige Reagenzien und Edukte werden durch wiederholte Wasch- und Filtrationsschritte entfernt. Mögliche Nebenreaktionen und eine geeignete Synthesekontrolle werden im weiteren Verlauf dieses Kapitels diskutiert. Schließlich wird die kovalente Bindung zwischen der C-terminalen Aminosäure und der Ankergruppe des Harzes gelöst. In Abhängigkeit vom gewählten Anker und den Abspaltbedingungen kann auch eine Entfernung der Schutzgruppen der Seitenketten der Aminosäuren vorgenommen werden; des weiteren bestimmt die Ankergruppe die Funktionalisierung des C-Terminus des Peptids. Es kann z.B. als freie Säure, als Peptidamid oder als Methylester abgespalten werden.

### 3.3 Schutzgruppenstrategien

Entsprechend dem Konzept der Synthese an der festen Phase bestehen unterschiedliche Anforderungen an die Schutzgruppen des N-Terminus und der Seitenketten eines Peptids. N-terminale Schutzgruppen verbleiben nur für einen Syntheseschritt und müssen quantitativ entfernbar sein, um die Aminogruppe für die nachfolgende Kupplung freizusetzen. Schutzgruppen dieses Typs werden *transient* genannt<sup>[71]</sup>.

Schutzgruppen für die Seitenketten der Aminosäuren hingegen verbleiben bis zum letzten Schritt der Synthese und werden entweder bei der Harzabspaltung oder erst danach entfernt. Schutzgruppen dieses Typs heißen *semipermanent*<sup>[71]</sup>.

Die klassische BOC-/Benzylstrategie, die dem von Merrifield eingeführten Konzept entspricht, basiert auf der abgestuften Acidolyse der transienten und semipermanenten Schutzgruppen.

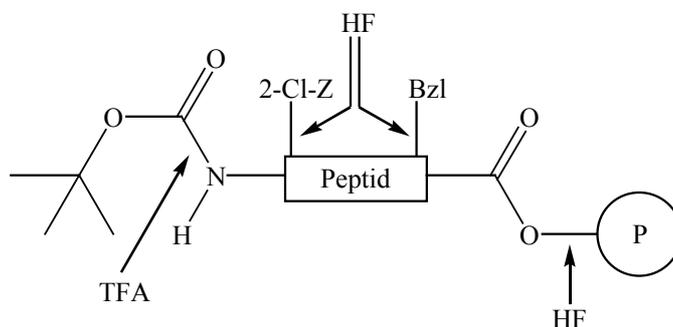


Abb. 3.2: BOC-/Benzyl-Schutzgruppenstrategie<sup>[72]</sup>

Die BOC-Gruppe dient hier als transiente und die Benzyl- bzw. *ortho*-Chlor-Carbobenzyoxy-Gruppe als semipermanente Schutzgruppen. Klassisch werden Benzylester- oder N-Benzylamidgruppen, aber vielfach auch eine Chlormethylgruppierung als Anker eingesetzt. Die Entfernung der BOC-Schutzgruppe gelingt mit einer 30 – 50 %igen Lösung von TFA in DCM quantitativ. Die Abspaltung der semipermanenten Schutzgruppen erfolgt wahlweise mit wasserfreiem Fluorwasserstoff oder mit Trifluormethansulfonsäure, bei ersterem ist der Einsatz von Teflonapparaturen unumgänglich. Allerdings sind beide Reagenzien hochreaktiv und verursachen erhebliche Ausbeuteverluste<sup>[72]</sup>.

Die genannten Nachteile überwindet die im Folgenden vorgestellte Fmoc-/tert.-Butyl-Schutzgruppenstrategie<sup>[73]</sup>.

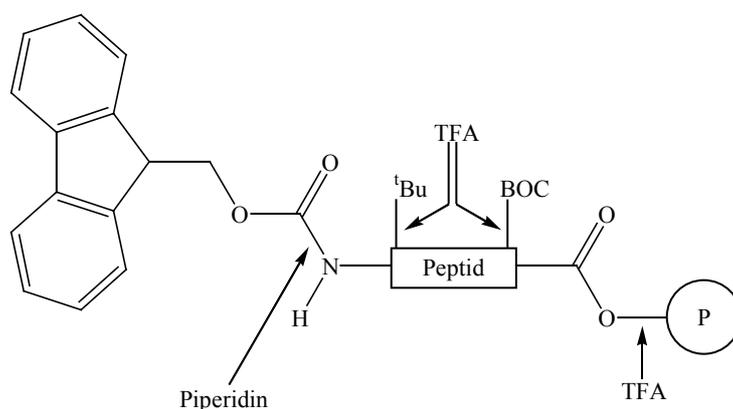


Abb. 3.3: Fmoc-/tert.-Butyl-Schutzgruppenstrategie

Die Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe, die im basischen Milieu abspaltbar ist, bildet hier den transienten Schutz für den N-Terminus des Peptids. BOC und andere basenstabile,

aber säurelabile Schutzgruppen werden semipermanent eingesetzt. Die Bedingungen der Abspaltung beider Schutzgruppentypen sind somit diametral entgegengesetzt; daher nennt man die Fmoc-tert.-Butyl-Schutzgruppenstrategie auch *orthogonal*.

Die spektralphotometrische Nachweisbarkeit der Fmoc-Gruppe im ultravioletten Bereich bei 300 nm stellt einen weiteren Vorteil dieser Strategie dar, die eine einfache Reaktionskontrolle ermöglicht (siehe dort). Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgt gemäß nachstehendem Mechanismus (Abb. 3.4):

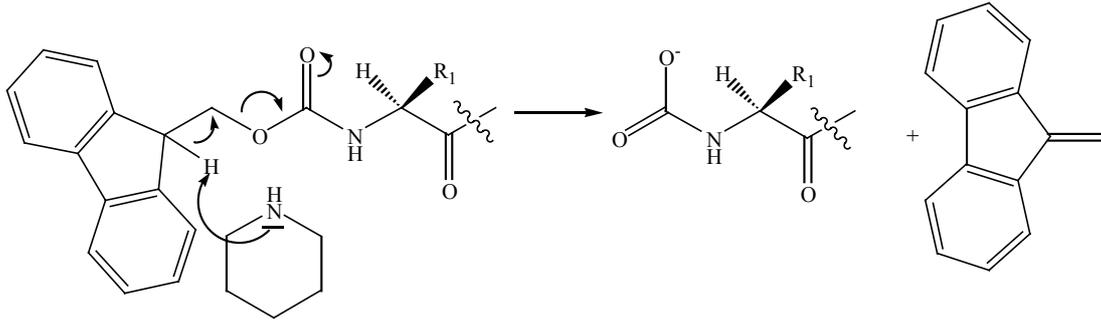


Abb. 3.4: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Das acide Proton in der nichtaromatischen C9-Position der Fmoc-Gruppe wird durch Piperidin abstrahiert. Die nachfolgende  $\beta$ -Eliminierung führt zu Dibenzofulven und einem Carbaminsäurederivat. Eines der beiden Protonen am quaternären Ammoniumstickstoff wird darauf hin vom freien Elektronenpaar des Stickstoffs am Carbaminsäurederivat abstrahiert; dieses decarboxyliert anschließend zum freien Amin. Dibenzofulven und Piperidin reagieren zu einem stabilen Addukt ab.

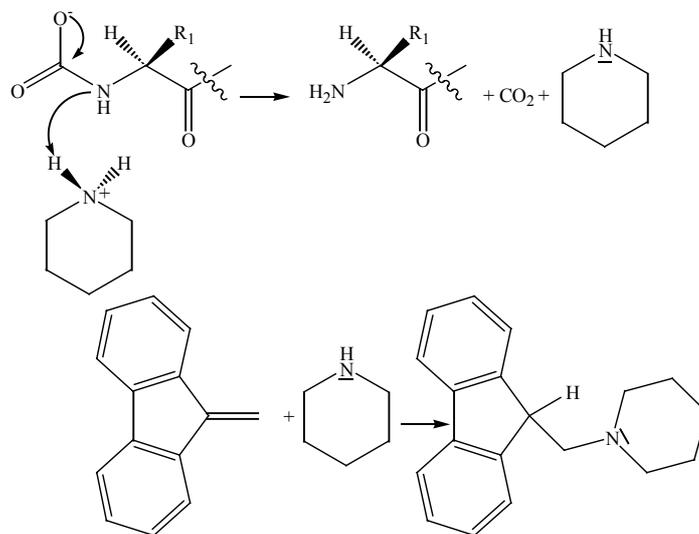
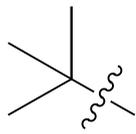


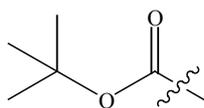
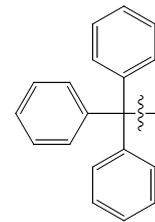
Abb. 3.5: Freisetzung des Amins und Bildung des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts

An die Seitenkettenschutzgruppen in der orthogonalen Schutzgruppenstrategie bestehen, wie bereits erwähnt, zwei wesentliche Anforderungen. Zum einen sollen sie im basischen Milieu stabil, zum anderen im sauren Milieu aber leicht abspaltbar sein. Folgende Schutzgruppen haben sich bei der Routinesynthese von Peptiden durchgesetzt:



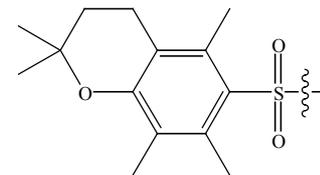
Die Alkoholfunktionen von Serin, Threonin und Tyrosin werden als *tert.*-Butylether, die Säurefunktionen von Asparagin und Glutaminsäure werden als *tert.*-Butylester geschützt (Abb. 3.6, links).

Die Thiolgruppe des Cysteins und die  $\tau$ -Stickstoffposition des Imidazolringes in der Seitenkette von Histidin werden mit der Triphenylmethyl- (Trityl-)gruppe geschützt, ebenso die Amidpositionen von Asparagin und Glutamin; eine mögliche Nitrilbildung wird verhindert (Abb. 3.7, rechts).



Die Butyloxycarbonyl- (BOC-)gruppe schützt die Aminogruppe von Lysin und die Aminfunktion von Tryptophan (Abb. 3.8, links).

Die Guanidiniumfunktion des Arginins schließlich wird mit der urethanischen 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl- (Pmc)-gruppe geschützt (Abb. 3.9, rechts).

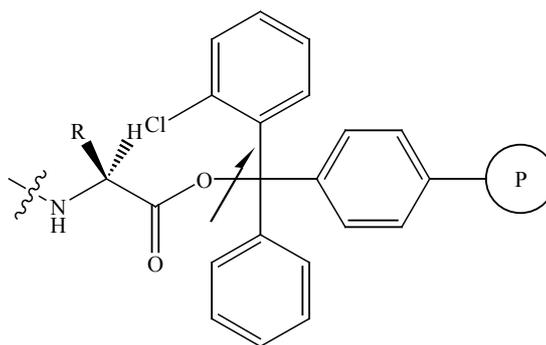


Bei der Abspaltung dieser Seitenkettenschutzgruppen der orthogonalen Fmoc-/tert.-Butyl-Schutzgruppenstrategie entstehen zahlreiche kationische Spezies<sup>[74]</sup>, die das Peptid elektrophil angreifen. Nucleophile Zusätze, *Scavenger* genannt, sollen diese Nebenreaktionen verringern:

- Ethandithiol deaktiviert das Pmc- und das Tritylkation<sup>[75]-[77]</sup>.
- Phenol schützt Tryptophan und Tyrosin vor Alkylierung, da sie konkurrierende Akzeptoren für alkylierende Spezies wie *tert.*-Butyl oder Tritylkationen sind<sup>[78]</sup>.
- Thioanisol verhindert als Reduktionsmittel die säurekatalysierte Oxidation von Methionin<sup>[79]</sup>.
- Wasser schließlich fängt ebenfalls Kationen durch Bildung des Alkohols ab<sup>[78]</sup>.

### 3.4 Ankergruppen

Eine der klassischen Ankergruppen für die Peptidsynthese an der festen Phase ist die von Barlos<sup>[80]-[82]</sup> eingeführte 2-Chlorotrytylchloridgruppe (Abb. 3.10, rechts; der Pfeil markiert die Spaltstelle). Die Kupplung der ersten Aminosäure gelingt problemlos unter Verwendung der



Auxiliarbase DIEA, die im Laufe der Reaktion entstehendes HCl unter Bildung des Hydrochlorids abfängt. Die 2-Chlorotrytylchloridgruppe ist säurelabil und erlaubt die Freisetzung des Peptids bereits unter milden Bedingungen mit Essigsäure und Trifluoethanol<sup>[83]</sup>. Die Schutzgruppen der Seitenketten bleiben bei dieser Prozedur intakt; man erhält das Peptid nahezu racemisierungsfrei<sup>[82]</sup>.

Die Einführung des Chlorsubstituenten in *ortho*-Position senkt die Säurelabilität allerdings etwas, um unerwünschte Harzabspaltungen bei Kontakt mit den schwach sauren Kupplungsreagenzien wie HOBt zu vermeiden. Der sterisch anspruchsvolle Anker unterdrückt die Diketopiperazinbildung bei C-terminalem Prolin oder Glycin<sup>[84]</sup>. Ein weiterer Vorteil dieses Ankers ist die Reaktionsträgheit des bei der Harzabspaltung entstehenden stabilen Trytylkations, das das Peptid nicht angreift.

Die drastischen Reaktionsbedingungen der klassischen BOC-/Benzylstrategie, bei der die transiente Schutzgruppe mit TFA, die semipermanenten Schutzgruppen mit HF oder Trifluormethansulfonsäure abgespalten werden, führen bereits bei den mit Trifluoressigsäure durchzuführenden Prozessschritten mit dem herkömmlichen Oxymethylanker zu Ausbeuteverlusten, da sich dieser als nicht säurestabil genug erwies. Daher wurde der Phenylacetamidomethyl- oder PAM-Anker entwickelt<sup>[85]</sup>, der eine um den Faktor 100 erhöhte Säurestabilität aufweist.

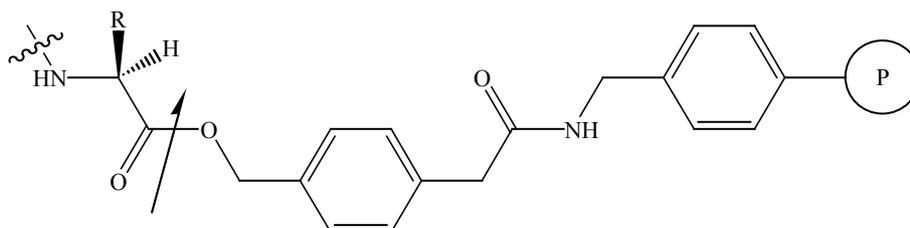


Abb. 3.11: Phenylacetamidomethyl- (PAM-)Ankergruppierung. Der Pfeil kennzeichnet die Spaltstelle.

Die Seitenkettenschutzgruppen lassen sich nun praktisch ohne Ausbeuteverlust selektiv abspalten. Somit liegt das Peptid C-terminal festphasengebunden, aber ansonsten frei vor. Dies ist von großer Bedeutung für biologische Tests (siehe dort). Die Harzabspaltung gelingt weiterhin mit HF oder mit Trifluormethansulfonsäure.

Die bisher genannten Ankergruppen finden hauptsächlich bei rein polystyrolbasierten Trägern Anwendung. Im Laufe der vorliegenden Arbeit erwies es sich aber als notwendig, auch Propfcopolymere des bereits erwähnten Typs TentaGel<sup>[69]</sup> auf eine Verwendung für biologische Tests zu prüfen (siehe Kap. 8). Es musste eine Ankergruppe gewählt werden, die ähnlich wie die PAM-Gruppe die Möglichkeit bietet, die Seitenketten selektiv abzuspalten, ohne die Bindung zum Harz zu beeinflussen. Dieses leistet der Hydroxymethylbenzoyl- (HMB-)Anker.

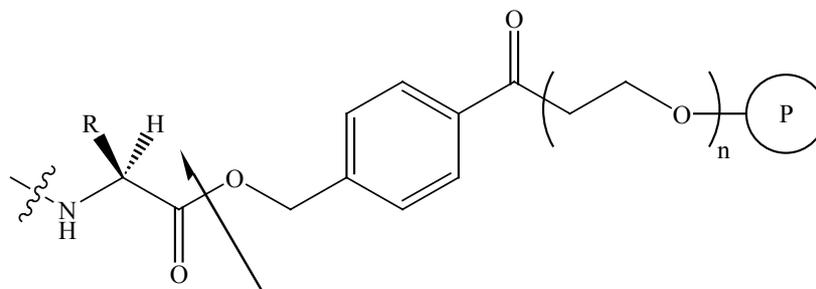


Abb. 3.12: Hydroxymethylbenzoyl- (HMB-)Ankergruppierung. Der Pfeil kennzeichnet die Spaltstelle.

Dieser Anker ist stabil gegen Trifluoressigsäure und Piperidin; das Peptid lässt sich jedoch leicht in wässrig-alkalischem Medium abspalten. Diese Bedingungen sind somit wesentlich milder im Vergleich zum PAM-Anker, dessen Vorzüge auch für den HMB-Anker zutreffen.

### 3.5 Aktivierungsmethoden

Zur Knüpfung einer Amidbindung aus der Carbonsäure- und der Aminkomponente muss Energie aufgewendet werden, da freie Aminosäuren bzw. die Hydrolyse von Peptiden thermodynamisch und entropisch begünstigt sind. Demzufolge muss die Elektrophilie des reaktiven Zentrums der Carboxyfunktion erhöht werden, um ihre Reaktivität gegenüber die nucleophilen Aminogruppe zu steigern. Die Darstellung des Säurechlorids<sup>[86]</sup> mittels Thionylchlorid ist eine der ersten angewandten Methoden, da Chlor eine wirksame Abgangsgruppe bildet. Gegenüber der hohen Reaktivität jedoch sind die meisten gängigen Schutzgruppen nicht stabil; zudem sind die Carbonsäurechloride gegenüber Spuren von

Wasser hydrolyseempfindlich. Folgende intramolekulare Reaktionen nach erfolgter Kupplung können ebenfalls auftreten:

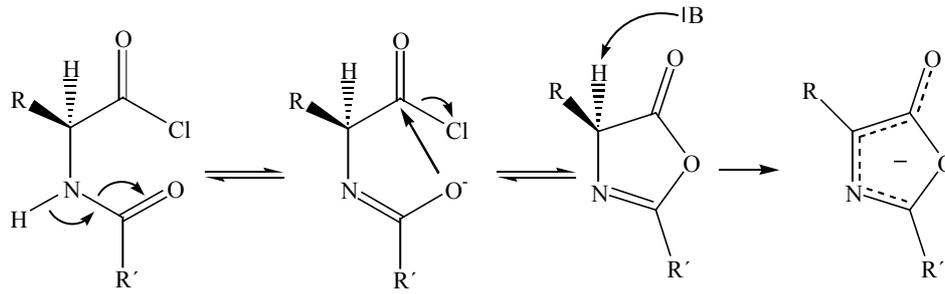


Abb. 3.13: Racemisierung nach Bildung des Azlactons

Unter den gewählten Bedingungen ist auch die Bildung eines N-Carboxy-Anhydrids möglich, des so genannten Leuchsschen Anhydrids:

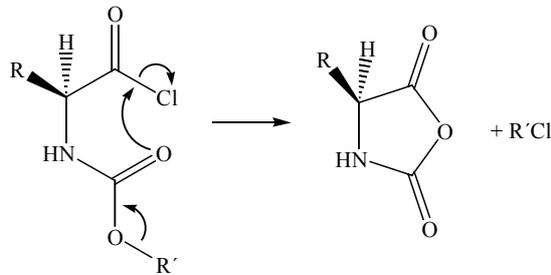


Abb. 3.14: Bildung des Leuchsschen Anhydrids

Bei der Säureazid-Methode<sup>[87]</sup> nach Curtius tritt kaum Racemisierung auf. Ein Carbonsäureester wird mit Hydrazin umgesetzt; dieses Derivat wird anschließend mit einem Alkylnitrit oder mit salpetriger Säure diazotiert:

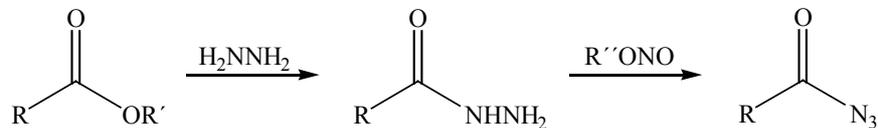


Abb. 3.15: Diazotierung der Carbonsäurekomponente nach Curtius

Allerdings besteht bei Temperaturen oberhalb 4 °C die Gefahr der Umlagerung zum Isocyanat, welches mit den Aminogruppen anderer Aminosäuren in kaum abtrennbare Harnstoffderivate übergeht:

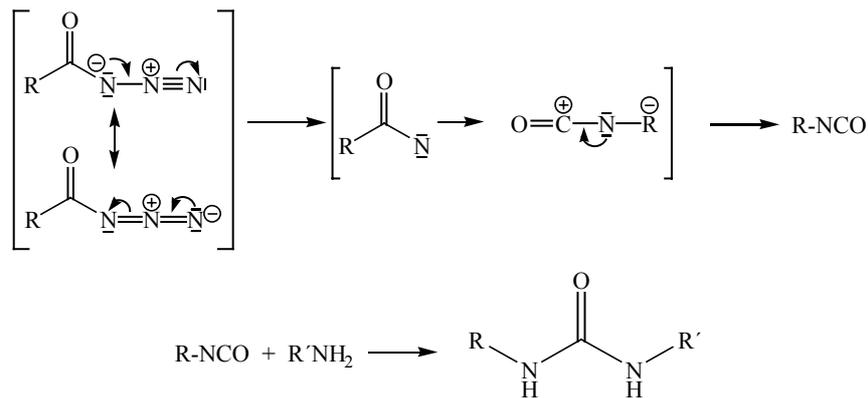


Abb. 3.16: Bildung des Isocyanats und Abreaktion zum Harnstoffderivat

Beim Anhydridverfahren werden die Carbonsäurefunktionalität zu symmetrischen<sup>[88]</sup> oder unsymmetrischen<sup>[89]</sup> Anhydriden umgesetzt. Im letztgenannten Fall erfolgt dies mit einer raumerfüllenden und Elektronen schiebenden Carbonsäure, etwa Isovaleriansäure. Die Kupplung mit dem N-Terminus des zu kuppelnden Peptids erfolgt bevorzugt, aber nicht ausschließlich mit der Aminosäure. Dieser Nachteil wird bei symmetrischen Anhydriden umgangen, aber mit einem Verlust von 50 % der eingesetzten Aminosäure erkauft. Zudem ist beim Anhydridverfahren die Bildung von Urethanderivaten nicht auszuschließen.

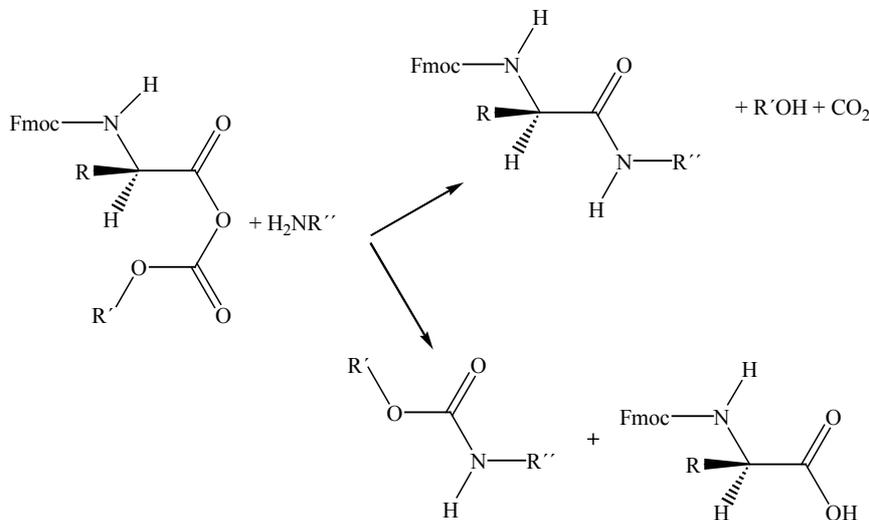


Abb. 3.17: Anhydridverfahren: oben: gewünschte Kupplung; unten: Bildung von Urethanderivaten und Freisetzung der zu kuppelnden Aminosäure

Das Aktivesterverfahren<sup>[90]</sup>, insbesondere die Carbodiimidvariante<sup>[91]</sup> hat sich für einen breiten Einsatz bei der Synthese von Peptiden durchgesetzt. Der Aktivester der Carbonsäurefunktionalität der Aminosäure wird *in situ* gebildet. Das entstehende Harnstoffderivat entzieht dem System Wasser im Sinne einer Verschiebung des

Reaktionsgleichgewichts auf die Produktseite. Verwendet man zudem DIC statt des zunächst eingesetzten DCC, ist der als Nebenprodukt entstehende Diisopropylharnstoff leicht durch Auswaschen zu entfernen.

König und Geiger<sup>[92],[93]</sup> führten das Auxiliar HOBt ein, das die Umlagerungs- und Racemisierungstendenz des nach Carbodiimidzugabe entstehenden O-Acylisoharnstoffderivates wirksam unterbindet, indem es die eigentliche Aktivkomponente durch Umesterung mit der Fmoc-geschützten Aminosäure bildet. Eine ebenfalls mögliche Azlactonbildung (mit anschließender Racemisierung) wird unterdrückt, da HOBt nucleophil und schwach sauer reagiert. Der Aktivester schließlich reagiert aminolytisch unter Freisetzung von HOBt zum gewünschten Fmoc-geschützten Peptid ab.

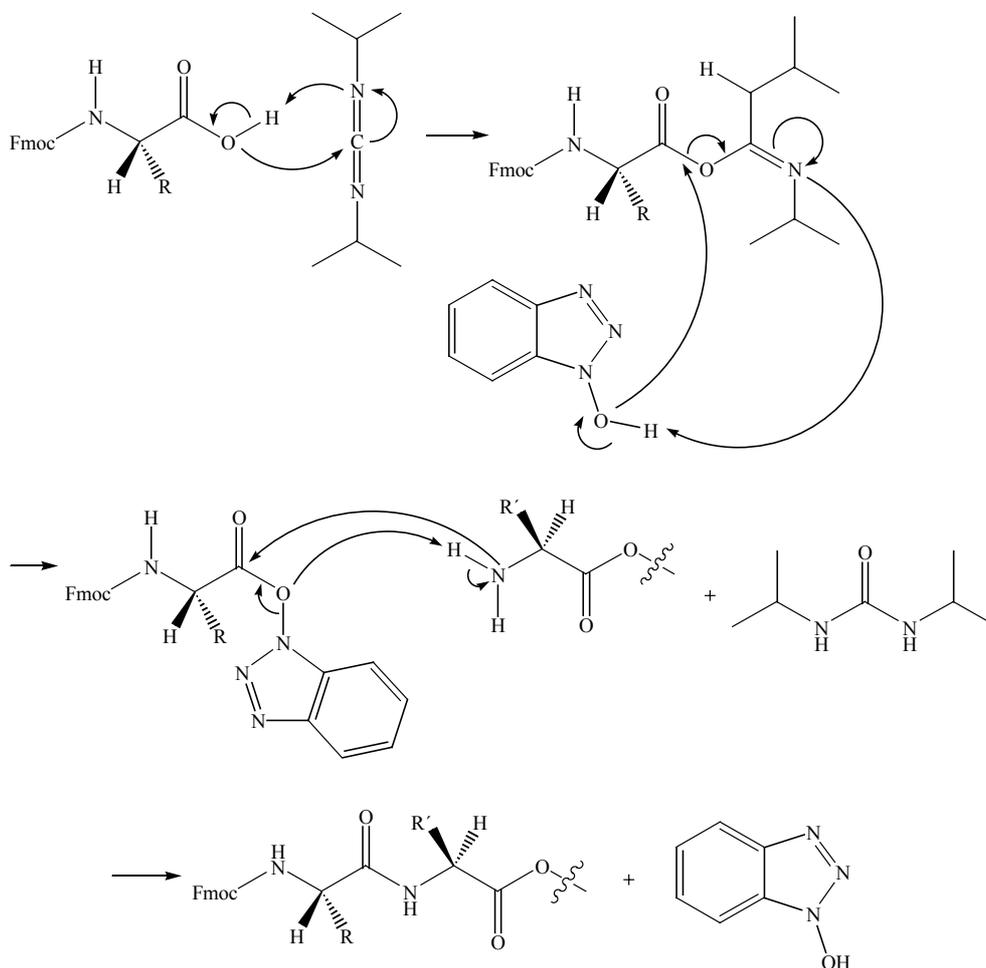


Abb. 3.18: Reaktionsmechanismus nach der DIC/HOBt-Variante

Carpino<sup>[94],[95]</sup> führte mit HOAt ein 7-Aza-Derivat des HOBt ein, das eine erhöhte Kupplungseffizienz gegenüber diesem aufweist. Man vermutet hier einen koordinierenden Nachbargruppeneffekt<sup>[94]</sup> des Stickstoffs im aromatischen Ring. Der N-Terminus des Peptids

soll auch bei sterisch anspruchsvollen Peptiden eine günstige Raumposition relativ zur Carbonylfunktion der zu kuppelnden Aminosäure haben (Abb. 3.19).

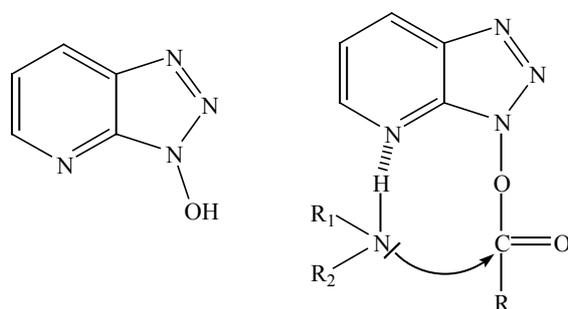


Abb. 3.19: HOAt (links), koordinierender Nachbargruppeneffekt von HOAt (rechts)

Eine Modifikation des Aktivester-Verfahrens bietet der Einsatz von präaktivierten HOBt-Derivaten, wie HBTU<sup>[96]</sup> oder PyBOP<sup>[97]</sup>, die eine weitere Effizienzsteigerung bei niedrigerer Racemisierung erbrachten. Deren 7-Aza-Derivate HATU und PyAOP (Abb. 3.20) sind inzwischen ebenfalls kommerziell verfügbar.

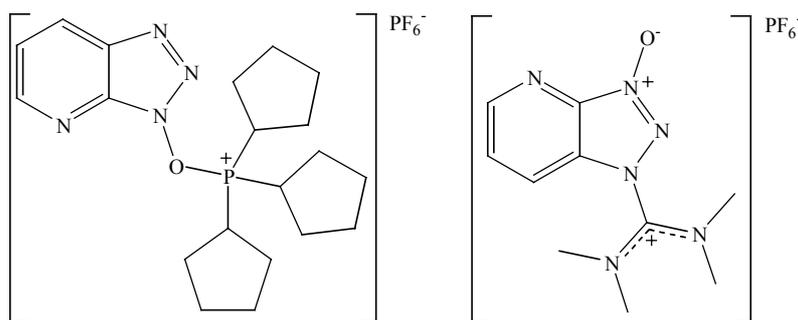


Abb 3.20: PyAOP (links), HATU (rechts)

Der Mechanismus nach der Variante präaktivierter HOBt-Derivate gestaltet sich wie folgt: eine tertiäre Base, meist DIEA, abstrahiert das acide Proton der Carbonsäuregruppe. Das carbodiimidanaloge Kation des HOBt-Derivats (hier: HBTU) bindet an das Carbonsäureanion unter Bildung des Uroniumesters. Der auf diese Weise freigesetzte Hydroxylsauerstoff des HOBt greift das Carbonylkohlenstoffatom des Aktivesters nucleophil an. Nach Eliminierung des Harnstoffderivats reagiert der Aktivester zum Peptid und HOBt wird freigesetzt (umseitig):

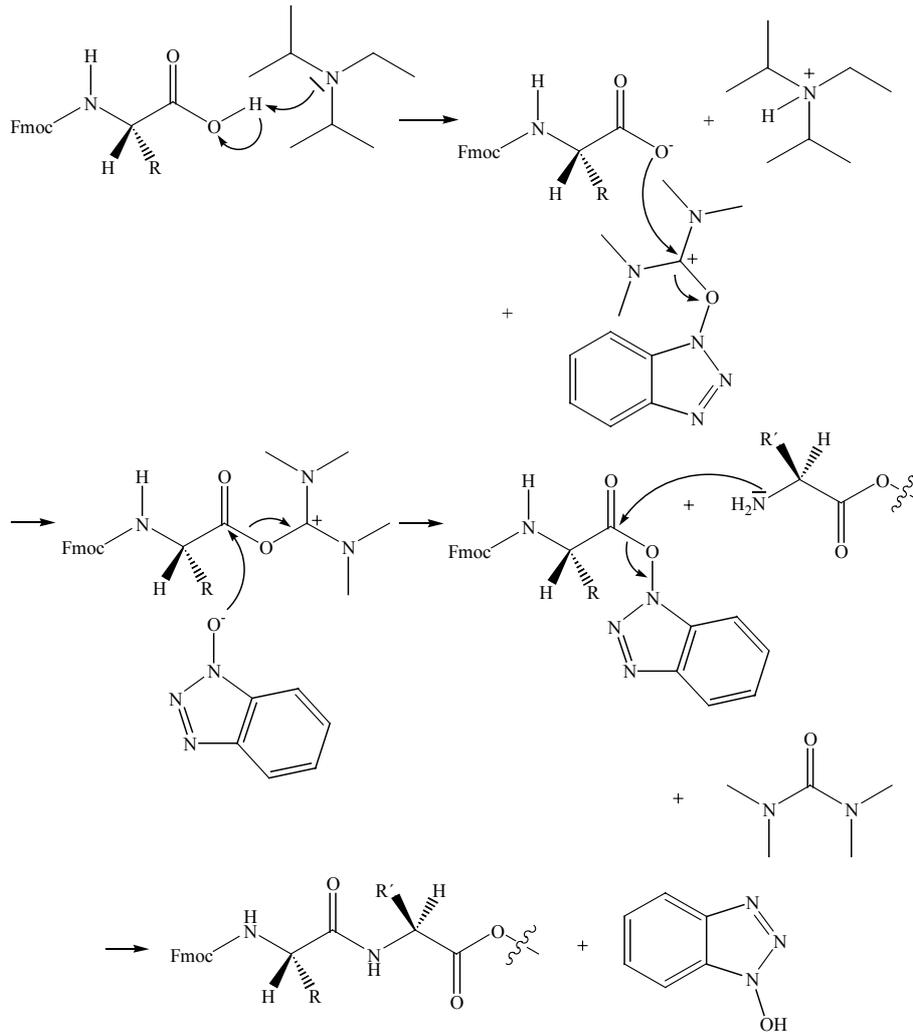


Abb. 3.21: Reaktionsmechanismus nach der Variante präaktivierter HOBT-Derivate

### 3.6 Nebenreaktionen

Ein wesentliches Hindernis bei der Synthese von Peptiden in hoher Ausbeute und Reinheit stellen, wie bereits für die Aktivierungsmethoden ausgeführt, mögliche Nebenreaktionen oder auch die Bildung von Rumpf- und Fehlsequenzen dar. Letztere treten vorzugsweise dann auf, wenn sekundärstrukturbildende Elemente, wie Wasserstoffbrücken,  $\beta$ -Faltblätter oder hydrophobe Aggregation einen effektiven Zugang des Lösemittels und der Reagenzien erschweren<sup>[98]-[105]</sup>.

Im Folgenden werden die wichtigsten Nebenreaktionen in den funktionellen Seitenketten der Aminosäuren beschrieben<sup>[84]</sup>. Eine latente Gefahr jeder Synthese ist die mögliche Epimerisierung jeder Aminosäure durch starke Säuren oder Basen<sup>[71]</sup>. HCl-Spuren in verunreinigtem DCM reichen aus, um Racemisierung hervorzurufen, die mit einem Verlust

der biologischen Aktivität des Peptids einhergeht. Im sauren Medium wird der Carbonylsauerstoff protoniert; die anschließende Enolisierung ist reversibel:

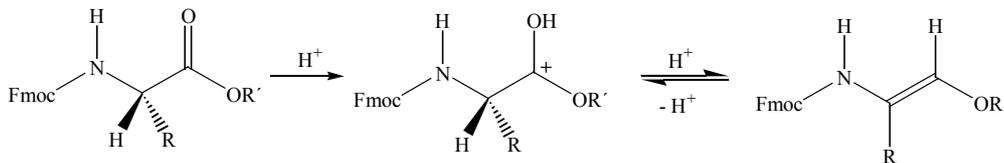


Abb. 3.22: reversible Enolisierung in saurem Medium

Im basischen Medium sind mehrere Mechanismen der Racemisierung bekannt; die Bildung von Azlactonen wurde bereits vorgestellt. Weiterhin möglich ist eine einfache, reversible Abstraktion des Protons in C $^{\alpha}$ -Position:

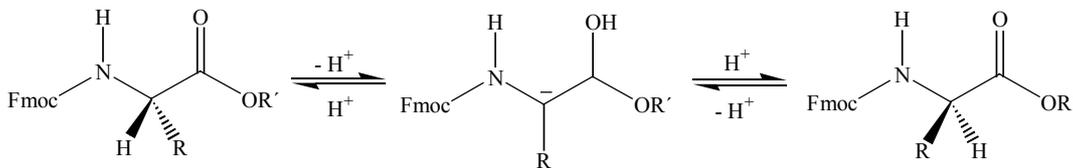


Abb. 3.23: reversible Deprotonierung mit anschließender Racemisierung

Liegen Cystein oder Serin vor, ist durch das Elektronen ziehende Heteroatom in der Seitenkette eine  $\beta$ -Eliminierung zum Enon begünstigt (X = S, O):

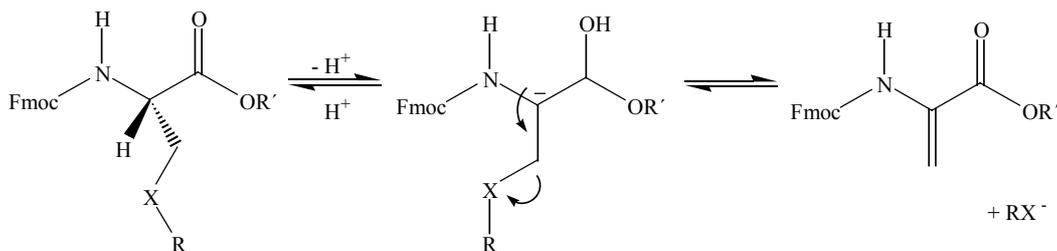


Abb. 3.24:  $\beta$ -Eliminierung zum Enon

Histidin kann intramolekular durch das Stickstoffatom in  $\tau$ -Position des Imidazolrings deprotoniert werden, daher wird diese Funktionalität zumeist mit der Tritylschutzgruppe maskiert.

Bei Peptiden auf der Stufe N-terminal entschützter Dipeptide kann es aus thermodynamischen Gründen zu einer Diketopiperazinbildung kommen, da der entstehende

Sechsring stabil ist. Die freie Aminogruppe greift den harzgebundenen C-Terminus nucleophil an und löst diese unter Bildung des Heterocyclus:

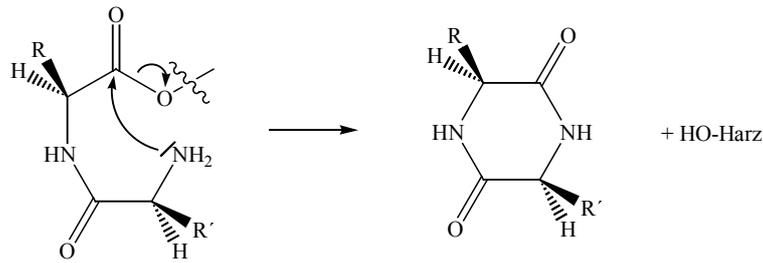


Abb. 3.25: Diketopiperazinbildung

Diketopiperazinbildung wird häufig bei Glycin, Isoleucin, Prolin und Valin beobachtet, aber auch bei D-konfigurierten oder N-methylierten Aminosäuren.

Werden Asparagin oder Glutamin ungeschützt eingesetzt, kann in der Gegenwart Wasser entziehender Reagenzien, z.B. DIC, eine Dehydratisierung mit anschließender Nitrilbildung auftreten:

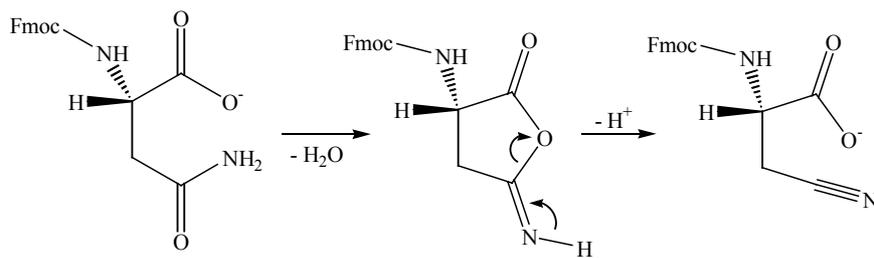


Abb. 3.26: Dehydratisierung mit anschließender Nitrilbildung

Ungeschütztes Asparagin kann basenkatalysiert eine Ringschlussreaktion zu einem Succinimid unterlaufen, besonders, wenn die nachfolgende Aminosäure ein sterisch kaum anspruchsvolles Glycin ist. Da bei Asparagin zwei Carbonsäurefunktionalitäten vorliegen, eröffnen sich zwei Positionen für einen nucleophilen Angriff. Im umseitig links dargestellten Weg wird die Peptidbindung gespalten. Rechts ausgeführt sind die baseninduzierte Ringöffnung unter Entstehung von  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Asparaginsäure (entsprechend  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Glutaminsäure, umseitig):

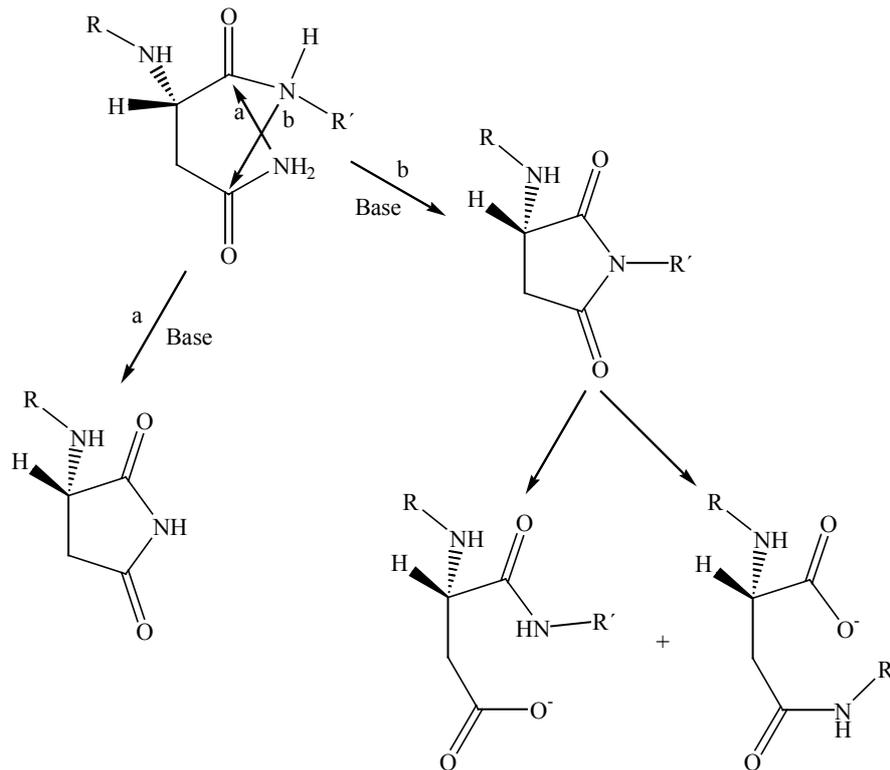


Abb. 3.27: Bildung des Succinimids (links); Bildung von  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Asparaginsäure

Ungeschützt ist Glutamin einer Pyroglutamatbildung ausgesetzt. HOBt katalysiert diese Reaktion während der Kupplung, sie ist aber auch während des Entschützungssteps möglich:

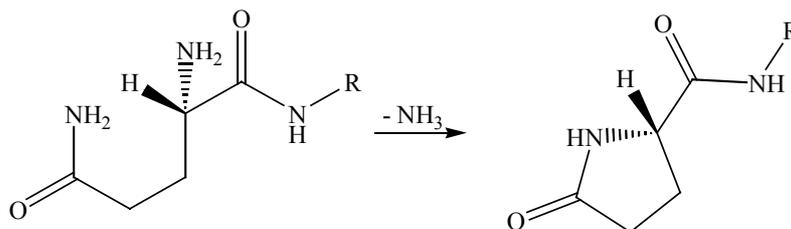
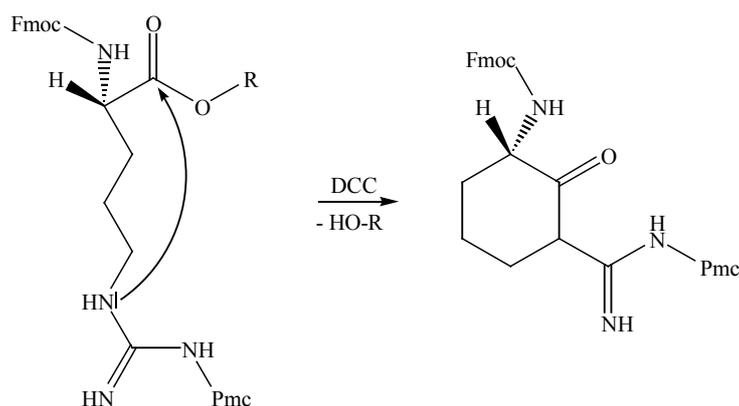


Abb. 3.28: Bildung des Pyroglutamats

Arginin schließlich kann ein thermodynamisch stabiles  $\delta$ -Lactam bilden. Selbst die sperrige Pmc-Schutzgruppe kann diese Nebenreaktion nicht vollständig unterdrücken, so dass gehäuft Fehlsequenzen auftreten, bei denen Arginin fehlt (umseitig):

Abb. 3.29: Bildung des  $\delta$ -Lactams

### 3.7 Reaktionskontrolle

Das Konzept der Synthese an der festen Phase sieht eine Isolierung und Reinigung von Zwischenprodukten nicht vor. Fehlsequenzen und Nebenprodukte verbleiben bis zum Ende der Synthese mit dem Hauptprodukt am Harz, verringern die Gesamtausbeute und stören bei der Aufreinigung des Produkts. Daher werden neben dem Schutz kritischer Funktionalitäten (siehe oben) der Grad des Reaktionsfortschritts beider repetitiver Schritte des Kettenwachstums überwacht, um deren Vollständigkeit zu gewährleisten.

Die transiente Fmoc-Schutzgruppe liefert im ultravioletten Spektrum bei 300 nm eine deutliche Absorptionsbande. Wenn, wie in Abb. 3.30, noch eine entsprechende Schulter detektiert wird, ist die Fmoc-Abspaltung noch nicht vollständig, da noch Dibenzofulven-Piperidin-Addukt in der Entschützungslösung nachgewiesen werden kann:

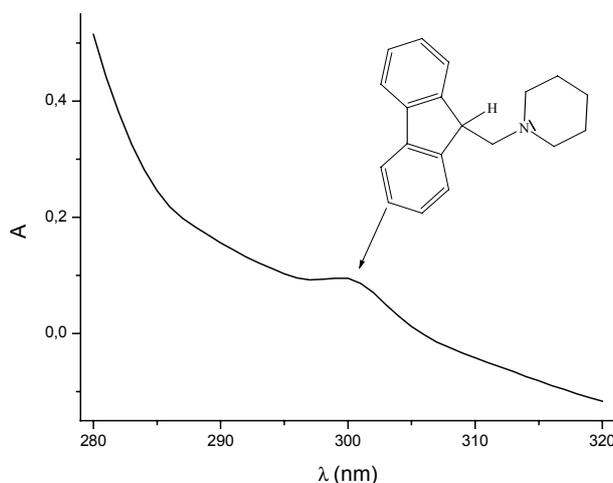


Abb. 3.30: UV-spektrometrisch bestimmte unvollständige Fmoc-Abspaltung

Allerdings gestattet dieser Test nur eine indirekte Aussage über die Vollständigkeit der Abspaltung von Fmoc, die bei einem negativen Test (keine Schulter bei 300 nm) impliziert wird. Möglicherweise befinden sich für Reagenzien aufgrund sterischer Hinderungen in den inneren Oberflächen der Beads unzugängliche Fmoc-geschützte Rumpfpptide, die nachfolgend unweigerlich zu Fehl- oder Abbruchsequenzen führen. Vorteilhaft bei dieser Methode jedoch ist, den Reaktionsverlauf ohne Substanzverluste kontrollieren zu können. Außerdem lässt sich die Fmoc-Abspaltung quantifizieren, um so den quantitativen Kaiser-Test (siehe unten) zu ersetzen.

Der Kaiser-Test<sup>[106],[107]</sup> dient zur Kontrolle der vollständigen Kupplung einer Aminosäure und nutzt dabei die Reaktion von Ninhydrin mit freien Aminotermini aus. Unter Dehydratisierung bildet sich zunächst ein Ketimin-Aldimin-Gleichgewicht aus. Anschließend weitere Dehydratisierung mit nachfolgender Transaminierung ergeben den Farbstoff *Ruhemanns Violett*, der eine mit intensiver Farbsättigung aufweist (siehe Abb. 3.32, umseitig).

Eine positive Farbreaktion ist selbst bei weniger als 0.1 % freiem Amin zu erkennen. Der Kaiser-Test detektiert allerdings nur primäre Amine; die Vollständigkeit der Kupplung von Prolin als einzigem sekundären Amin unter den proteinogenen Aminosäuren ist damit nicht zu bestimmen. Zudem werden für jeden Test einige Milligramm Harz benötigt, die der Gesamtmenge verloren gehen; dieses wirkt sich speziell bei der kombinatorischen Festphasensynthese nachteilig aus.

Der Kaiser-Test wird mit wachsender Kettenlänge immer unzuverlässiger. Etwa ab der siebten Kupplung ist die gelbe Färbung, die auf eine vollständige Kupplung hindeutet, u.U. nicht mehr eindeutig. Man erhält statt dessen eine grünliche bis gräuliche trübe Lösung. Alternativ kann Bromphenolblau<sup>[108]</sup> als Indikator für die Kontrolle der Kupplungseffizienz verwendet werden.

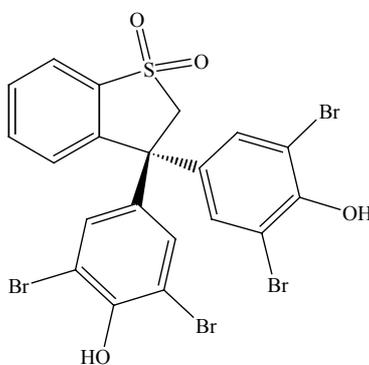


Abb. 3.31: Bromphenolblau

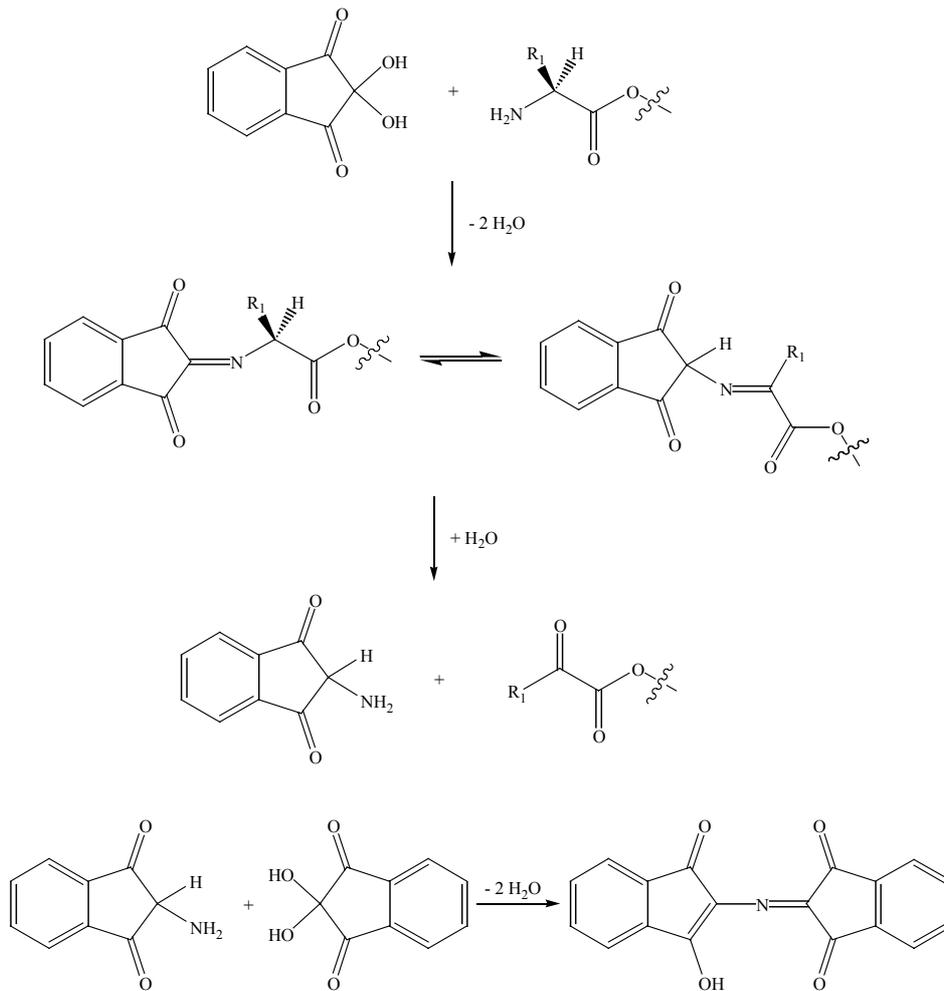


Abb. 3.32: Kaiser-Test

Bromphenolblau schlägt im Bereich von pH 3.0 bis 4.6 von gelb nach blau um; es ist gut löslich, unter den Reaktionsbedingungen der Peptidkupplung inert und lässt sich leicht mit einer Lösung von Piperidin oder DIEA auswaschen. Harzproben müssen im Gegensatz zum Kaiser-Test nicht entnommen werden; die Überwachung der Synthese ist im Reaktionsgefäß direkt sichtbar. Der Indikator funktioniert nach dem Schema eines pH-Indikators (siehe Abb. 3.33, umseitig).

Sind noch nicht alle Aminoenden der Peptidketten abgesättigt, zeigt sich eine bläuliche bis grüne Färbung. Die Vollständigkeit der Kupplung wird demnach durch eine gelbe Färbung angezeigt. Allerdings wird auch dieser Test bei zunehmender Kettenlänge unzuverlässiger, da sich immer seltener eine rein hellgelbe Färbung einstellt. Man erhält einen Gelbgrünton. Daher sollte man die Farbkonstanz als Entscheidungshilfe für das Beenden der Kupplungsreaktion heranziehen.

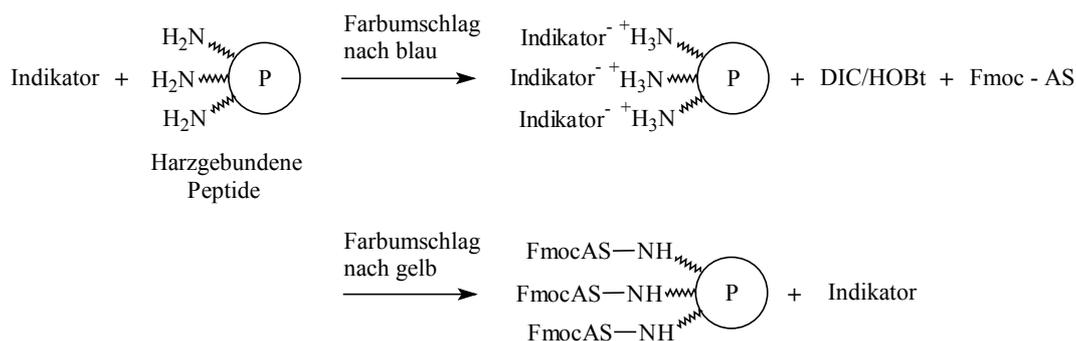


Abb. 3.33: Funktionsweise des Indikators Bromphenolblau

### 3.8 Kombinatorische Festphasenpeptidsynthese

Bei der Suche nach neuen Pharmaka oder anderen Wirkstoffen besteht eine der großen Herausforderungen in der Findung einer Leitstruktur, die am untersuchten Liganden, sei es ein Antikörper, ein aktives Zentrum eines Proteins oder ein Rezeptor, eine Wirkung, etwa eine Blockade, hervorruft. Aufgrund der Mannigfaltigkeit chemischer Verbindungen ist deren Anzahl prinzipiell beliebig hoch. Beschränkt man sich etwa nur auf alle mit den proteinogenen Aminosäuren denkbaren Hexapeptide, resultierten daraus  $20^6$ , d.h. 64 Millionen Verbindungen.

Durch die Einführung des Hochdurchsatz-Screenings ist es möglich geworden, eine große Anzahl von Substanzen in sehr kurzer Zeit in molekularen Testsystemen, wie Enzym- oder Rezeptorbindungstests, auf Aktivität hin zu untersuchen. Der limitierende Faktor bei der Identifikation von neuartigen Leitstrukturen ist nunmehr die Synthese der einzelnen in Frage kommenden Verbindungen. Die Notwendigkeit, eine Vielzahl von Peptiden innerhalb kurzer Zeit und niedrigem Aufwand zu synthetisieren, bildete den Ausgangspunkt für die Entwicklung der kombinatorischen Peptidsynthese. Sie kann definiert werden als die repetitive kovalente Verbindung von Synthesebausteinen unterschiedlicher Struktur, die in einer Gesamtheit, oder Bibliothek, unterschiedlich strukturierter Verbindungen resultiert.

Erste, erfolgreich angewandte Beispiele für multiple Peptidsynthesen<sup>[109]-[111]</sup> sind die Tea-bag-Methode, die Pin-Methode, die Spot-Synthese oder die biotechnologische Phage Display-Methode<sup>[112]</sup>. Das Konzept der kombinatorischen Chemie wurde mittlerweile auf das gesamte Spektrum der organischen Synthese ausgeweitet<sup>[113]</sup>.

Bei den genannten chemischen Methoden erhält man genau definierte und lokalisierbare Peptide in Mengen um ein Milligramm; sie sind jedoch auf ca.  $10^2$  bis  $10^4$  Verbindungen

beschränkt. Die biotechnologische Phage Display-Methode bietet die Möglichkeit, bis zu  $10^9$  Peptide gleichzeitig zu screenen, die auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert werden. Die Gewinnung der Sequenzinformation allerdings ist nur nach wiederholten Affinitätsscreening-, Reinigungs- und Amplifikationsschritten durch Sequenzierung des Genoms zugänglich. Zudem handelt es sich bei den im Phage Display betrachteten Peptiden um randomisierte Bibliotheken, die hier nicht in Frage kamen (siehe nachfolgende Kapitel 5 bis 7).

Eine weitere Möglichkeit bietet die in den vergangenen Jahren entwickelte Chip-Technologie<sup>[114]-[117]</sup>. Sie beruht auf dem Einsatz von Glaträgern als fester Phase, auf der die Biopolymere mittels photolithographischer Verfahren synthetisiert werden. Die Sequenz jedes Biopolymers ist durch dessen Position auf dem Glaträger festgelegt; mehrere Tausend bis Zehntausend verschiedene Spezies können auf diese Weise auf einem Chip erzeugt und getestet werden. Ursprünglich für die Verwendung von Peptiden<sup>[114],[115]</sup> entwickelt, findet sie als technologieintensive Methode heutzutage vor allem beim Screening von Oligonukleotiden Anwendung<sup>[116],[117]</sup>.

Die nun vorgestellte „One Bead One Peptide“-Methode<sup>[118]-[120]</sup> (Abb. 3.34, umseitig) wurde entwickelt, um die Begrenztheit der genannten chemischen Methoden zu überwinden und den notwendigen präparativen, aber auch apparativen Aufwand zu minimieren. Die geforderte Größe und Art der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Bibliotheken – mehrere Zehntausend bis mehrere Hunderttausend nicht randomisierte Peptide für eine biologisch relevante Zielregion definierter genetischer Variabilität – legte daher insbesondere diesen Ansatz nahe.

Eine gegebene Harzmengung wird in  $n$  gleiche Portionen aufgeteilt. Die Anzahl der Portionen ist gegeben durch die Diversität der zu synthetisierenden Bibliothek in dieser Aminosäureposition. Sind z.B. 12 Aminosäuren in der entsprechenden Position zu variieren, teilt man das Harz in 12 Teile. Nach der Kupplung der einzelnen Aminosäuren in der jeweiligen Position werden alle Portionen vereinigt und das Harz gründlich gemischt. Nach der Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe beginnt der Syntheszyklus von neuem mit Aufteilung in  $n$  beabsichtigte Positionen, Kupplung der Aminosäuren, Vereinigen der Harzmengung, mischen und Abspaltung der transienten Schutzgruppe. Es resultiert eine Bibliothek harzgebundener Peptide, bei der auf jedem Bead nur einheitliche, identische Sequenzen auftreten. Die Anzahl der harzgebundenen Peptide, also der Umfang der Bibliothek, ergibt sich als Produkt der Varianzen der Aminosäurepositionen. Durch eine

geeignete Wahl der Ankergruppierung (siehe oben) verbleiben die Peptide nach Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen am Harz. Sie sind biologischen Tests damit in nicht geschützter Form zugänglich; biologisch als aktiv erkannte Komponenten können nachfolgend durch Abspaltung vom Harz isoliert werden.

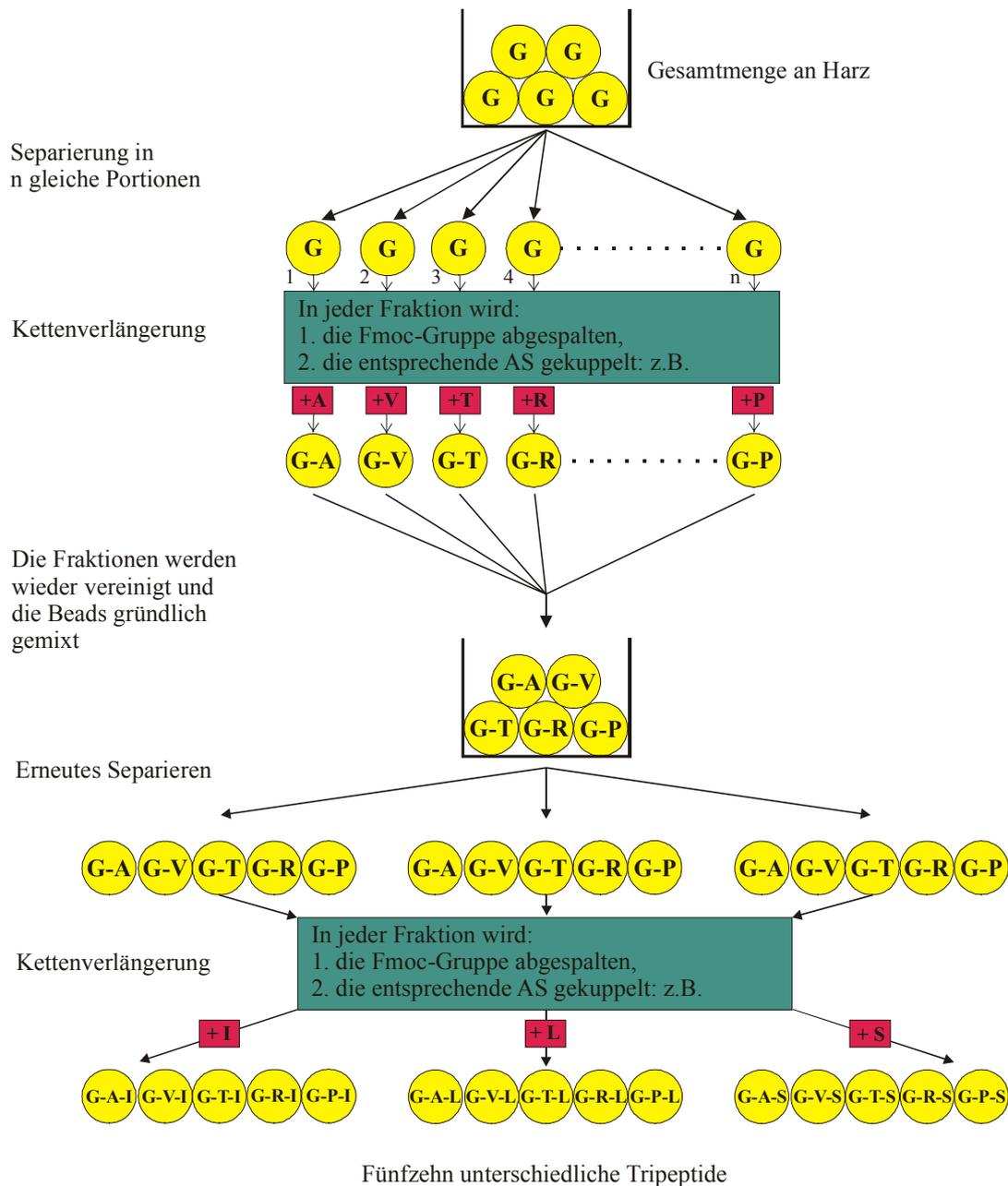


Abb. 3.34: Schema der „One Bead One Peptide“-Methode

Mit dieser Methode lassen sich – eine gewisse Redundanz der Bibliothek vorausgesetzt – in kurzer Zeit mehrere Hunderttausend Peptide synthetisieren, da ein Gramm des Harzes

etwa 3 Millionen Harzkugeln enthält und die Harzmenge somit im Labormaßstab handhabbare Mengen nicht übersteigt.

Eine Reaktionsführung gemäß diesem Konzept erfordert einen hohen Reifegrad der zugrunde liegenden Synthesechemie. Ausbeuten von über 99 % für jeden Schritt müssen erzielt werden, um eine zuverlässige kombinatorische Synthese zu gewährleisten. Dies ist für die Peptidchemie der Fall; andere organisch-chemische Reaktionen müssen auf ihre Eignung für die Synthese von Substanzbibliotheken u.U. erst optimiert werden.

Allerdings ist unbekannt, welches Peptid sich auf einer beliebig ausgewählten Harzkugel befindet. Den biologischen Tests nachgelagert muss somit eine analytische Methode sein, die die Sequenz des harzgebundenen Peptids ermittelt, das sich im Screening als reaktiv erwiesen hat. Die Entwicklung einer schnellen, zuverlässigen und unaufwändigen Methode ist Gegenstand der folgenden Kapitel der vorliegenden Arbeit.



## **4 Entwurf und Planung eines kombinatorischen Immunassays**

### **4.1 Allgemeine Zielsetzung**

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte kombinatorische Immunassay ist als Methode konzipiert, eine kombinatorische Bibliothek iterativ gegen ein gewähltes biologisches Zielsystem zu screenen. Die Wiederholbarkeit mit derselben Bibliothek dient hierbei vor allem der Ermittlung und dem Vergleich von Reaktivitätsmustern genetisch definierter Gesamtheiten des biologischen Zielsystems sowie der Identifikation und Selektion ausschließlich hochreaktiver Verbindungen. Diese sollen darüber hinaus gegenüber herkömmlichen Methoden (siehe unten) schnell, zuverlässig und unaufwändig bestimmt werden. Als genetisch definierte Gesamtheiten sollen hierbei Serenpools verschiedener Subtypen von HIV-1 herangezogen werden, um die mittlere kumulierte Aktivität der Seren eines Subtyps zu bestimmen und mit der Aktivität der Seren anderer Subtypen zu vergleichen.

Das allgemeine Konzept besteht aus drei Elementen:

- Synthese einer festphasengebundenen kombinatorischen Peptidbibliothek,
- Iteratives Screening dieser Bibliothek gegen Serenpools verschiedener HIV-1-Subtypen und
- Massenspektrometrische Analyse maximal unterschiedlich reagierender Peptide daraus.

Wie nachfolgend im Einzelnen dargelegt, sind der erste und der letzte Punkt dieses Konzepts unmittelbar voneinander abhängig. Somit teilte sich die Umsetzung dieses Konzepts in zwei parallel zu bearbeitende Stränge:

- Entwicklung eines zuverlässigen massenspektrometrischen Verfahrens zur Analyse kombinatorischer Peptidbibliotheken und
- Entwicklung eines biologischen Testsystems für festphasengebundene Peptidbibliotheken mit der Möglichkeit der multiplen Testführung.

## 4.2 Konzept der Codierung kombinatorischer Peptidbibliotheken durch adaptive Einführung von Kettenabbruchsequenzen

Wie bereits erwähnt, eröffnet die „One Bead One Peptide (OBOP)“-Methode von Furka<sup>[118]</sup> die Möglichkeit, innerhalb kurzer Zeit eine sehr große Anzahl von Peptiden gleichzeitig zu generieren. Dies macht sie zusammen mit der Eigenschaft, dass genau eine definierte Komponente auf einem Bead erzeugt wird, so interessant für den Zweck, die genetische Vielfalt der V3-Region des viralen Hüllproteins gp120 von HIV-1 abzubilden, die dann den biologischen Tests zugeführt wird. Allerdings muss die Peptidsequenz eines beliebigen Beads in einem nachfolgenden Schritt bestimmt werden, da die OBOP-Methode als solche im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden<sup>[109]-[111]</sup> keine räumlich codierten Peptide erzeugt, deren Sequenz aus deren Position auf dem Probenträger unmittelbar hervorgeht. Aufgrund von vielfachen Sequenzhomologien und dem Vorkommen isobarer Aminosäuren ist ein einfaches Massenspektrum speziell bei großen Bibliotheken nicht aussagekräftig genug; zu viele ähnliche Massen sind zu erwarten. Ein Standardverfahren zur Sequenzierung von Peptiden ist der automatisierte Kettenabbau nach Edman<sup>[71]</sup>. Dieses Verfahren allerdings benötigt spezielle Apparaturen, ist zeitaufwändig, auf natürliche Aminosäuren beschränkt und erfordert freie N-Termini derselben.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der chemischen Codierung der Beads mit Reportermolekülen, so genannten *Tags*. Eine verzweigte Ankergruppe am Harz enthält neben dem Peptid auch ein weiteres Biopolymer, ebenfalls ein Peptid<sup>[121]</sup> oder DNA<sup>[122]</sup>, welches das eigentliche Peptid codiert. Die Identität desselben wird durch Sequenzierung der Reportermoleküle ermittelt. Leider erhöht die Verwendung eines solchen Reportermoleküls die Anzahl notwendiger chemischer Prozeduren deutlich. Zudem enthält jedes Bead einen großen Anteil des codierenden Polymers; Wechselwirkungen dieser Tags mit dem biologischen Testsystem können nicht ausgeschlossen werden. Einer anderen Strategie zufolge<sup>[123]</sup> wird die wachsende Peptidkette mit Halobenzolderivaten markiert. Ausschließlich die Tags werden nachfolgend abgespalten und gaschromatographisch analysiert. Diese effektive Methode ist leider im Informationsgehalt beschränkt, den der verwendete binären Codes enthalten kann. Allen chemischen Codierungen ist zudem gemein, dass sie indirekt sind. Sie erlauben keine direkte Bestimmung der Qualität der Verbindungen einer kombinatorischen Bibliothek. Fehl- und Abbruchsequenzen, unvollständige Seitenkettenentschützungen oder weitere Nebenreaktionen könnten nicht überwacht werden, hätten aber einen signifikanten Einfluss auf die Qualität der Bibliothek.

Youngquist und Keough<sup>[124]</sup> entwickelten daher ihr Konzept der gezielten Einführung von Kettenabbruchsequenzen mit anschließender massenspektrometrischer Leitersequenzierung der zugrunde liegenden Peptide. Während der Synthese der Bibliothek wird ein kleiner Prozentsatz der wachsenden Peptidkette mit einer permanenten Schutzgruppe blockiert („Capping“), die auch nach der Abspaltung der semipermanenten Schutzgruppen der Seitenketten verbleibt. Jede Aminosäureposition der Bibliothek wird auf diese Weise gekennzeichnet, im beschriebenen Fall mit acetyliertem Alanin<sup>[124]</sup>. Diese sequenzspezifischen Terminationsprodukte liefern alle notwendigen Informationen für die Ablesung der codierten Peptidsequenz aus den Differenzen der einzelnen Signale eines MALDI-Massenspektrums<sup>[125]</sup>, das man nach Abspaltung aller Komponenten vom Bead aufnimmt. Der synthetische Zusatzaufwand gegenüber uncodierten Bibliotheken ist nur minimal größer. Nebenprodukte der Synthese o.ä. sind unmittelbar aus dem Massenspektrum abzulesen, somit sind Integrität und Qualität der Bibliothek direkt zugänglich. Allerdings werden Terminationssequenzen an allen Aminosäurepositionen eingeführt; die Menge an Hauptpeptid pro Bead reduziert sich bei größeren Bibliotheken, etwa Decapeptidbibliotheken, drastisch, wenn, wie im vorliegenden Fall<sup>[124]</sup> zehn Prozent jeder Aminosäureposition blockiert werden. Der Verlust an gewünschtem Hauptpeptid wiederum könnte die geplanten biologischen Tests negativ beeinflussen.

Das in der vorliegenden Arbeit verfolgte Konzept entwickelt den Ansatz von Youngquist und Keough<sup>[124]</sup> weiter. Grundgedanke ist die adaptive und gezielte Einführung von Terminationssequenzen während der Synthese der Bibliothek. Diese sollen nur noch dann erzeugt werden, wenn es für eine eindeutige Wiedererkennung der Sequenz in einem Massenspektrum unbedingt notwendig ist. Darüber hinaus sieht das Konzept vor, die chemische Umgebung des Hauptpeptids auf dem Bead nur so geringfügig wie möglich zu ändern. Dies bedeutet zum einen eine Reduzierung des relativen Anteils der Kettenabbruch erzeugenden Komponente („Cappingreagenz“); wichtiger jedoch ist die sequenztreue Einführung von Terminationssequenzen, d.h. das Cappingreagenz sollte derjenigen Aminosäure entsprechen, deren Position gecappt werden soll, lediglich verändert um die N-terminale, permanente Schutzgruppe.

Es ist unmittelbar einsichtig, dass die Berechnung eines nach diesen Kriterien zu entwerfenden Cappingmusters für größere Bibliotheken und deren Decodierung ab etwa 100 Spezies manuell nicht mehr zu bewältigen ist. In Zusammenarbeit mit D. Blechschmidt wurde daher ein Computerprogramm entwickelt, um diese Aufgabe rechnergestützt abzuwickeln. Das Programm *Biblio*<sup>[126]-[128]</sup>, dessen Funktionsweise in den Kapiteln 6 bzw. 7 der

vorliegenden Arbeit beschrieben ist, löst das Problem isobarer Aminosäuren und multipler Sequenzhomologien und optimiert das Capping hinsichtlich folgender Parameter:

- Minimierung der Anzahl notwendiger Cappingschritte,
- Ermöglichung der sequenztreuen Codierung durch Einführung des der Aminosäureposition entsprechenden Cappingreagenzes sowie
- Minimierung der Anzahl notwendiger Cappingreagenzien.

Jede Aminosäureposition ist frei wählbar; die Diversität einer kombinatorischen Bibliothek ist somit nicht mehr durch limitierte Möglichkeiten der Codierung beschränkt. Darüber hinaus wird die Menge an Hauptpeptid pro Bead maximiert, da die potentielle Beeinflussung biologischer Tests auf ein minimal notwendiges Maß zurückgeführt wird.

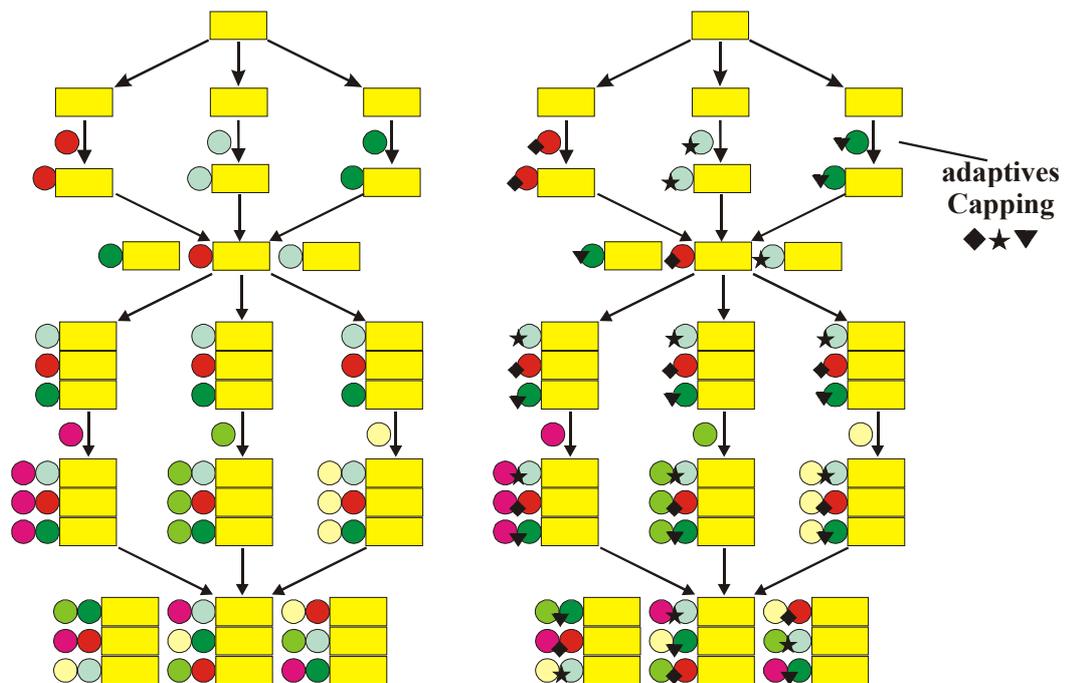


Abb. 4.1: Klassisches OBOP-Schema nach Furka<sup>[118]</sup> (links); im Vergleich dazu das Schema der adaptiven Einführung von Terminationssequenzen: Nur die erste Aminosäureposition wird gecappt; nach der zweiten Kupplung resultieren neun voll codierte Dipeptide (rechts).

Die Entwicklung eines geeigneten synthetischen Zugangs zu auf diese Weise codierten Bibliotheken und der MALDI-massenspektrometrische Analyse codierter Peptide sind Gegenstand des Kapitels 5 der vorliegenden Arbeit. Aufgrund des kumulativen Charakters dieser Arbeit sind die Ergebnisse dieser Entwicklung an Hand der Beispiele dreier kombinatorischer Bibliotheken in den Kapiteln 6 bzw. 7 ausgeführt.

### 4.3 Konzept eines Testverfahrens für das iterative Screening festphasengebundener Substanzbibliotheken

Wichtigste Voraussetzung für die Wiederholbarkeit einer Screeningprozedur ist die Überführung des zu testenden Substrats, hier die festphasengebundene Peptidbibliothek, nach dem Test in den ursprünglichen Zustand. Somit dürfen die Bestandteile des Substrats keine nicht vollständig reversiblen chemischen Umsetzungen eingehen. Eine weitere Anforderung an ein tragfähiges Konzept für ein iteratives Screening besteht in der Wiederauffindbarkeit reaktiver Beads der Bibliothek; sie müssen also räumlich fixiert werden.

Die zu testenden festphasengebundenen Peptide der Bibliothek sollen gegen humane polyklonale Antikörper gescreent werden. Der Ansatz einer solchen Serotypisierung wurde mit Consensus-Peptiden, die der Spitze der V3-Schleife von gp120 entnommen sind, schon erfolgreich eingeführt<sup>[129]</sup>, allerdings fanden diese Tests in Lösung und nur mit einer im Vergleich zu kombinatorischen Bibliotheken geringen Anzahl an Peptiden statt.

Startpunkt für ein iterativ anwendbares Verfahren für die feste Phase muss demzufolge die Entwicklung eines immunologischen Testsystems sein, das die Bindung primärer Antikörper an Peptide der Bibliothek visualisiert. Dies geschieht in der Regel durch Bindung des primären an einen markierten sekundären Antikörper, der eine sichtbare Farb- oder Enzymreaktion hervorruft; man bedient sich hierbei bekannter molekularbiologischer Methoden, z.B. dem ELISA<sup>[130]</sup>. Ausgehend von solchen Standardprotokollen werden diese den Anforderungen eines Festphasenscreenings angepasst und optimiert. Im Einzelnen bedeutet dies:

- Evaluation einer geeigneten Beadmatrix, die daran gebundene Peptide der umgebenden Lösung optimal zugänglich macht,
- Evaluation eines geeigneten immunologischen Testsystems für das Screening der Peptide an der festen Phase,
- Screening gegen die V3-Region gerichteter monoklonaler Antikörper gegen die entsprechenden festphasengebundenen Peptide, um die Funktionsfähigkeit des immunologischen Assays sicherzustellen,
- Optimierung des immunologischen Assays hinsichtlich maximierter Empfindlichkeit.

Ist der immunologische Assay für das Screening der Beads als Suspension etabliert, wird das System auf die feste Phase, einer Klebmatrix zur räumlichen Fixierung der Beads,

übertragen. Diese muss den Anforderungen hinsichtlich der chemischen Stabilität, etwa dem Einfluss der Lösemittel oder den pH-Werten des Assays, entsprechen, ansonsten gegenüber den Testbedingungen aber inert sein. Schließlich muss die volle Reversibilität des Assays gewährleistet werden, was an Hand ausgewählter Modellpeptide getestet wird.

Kapitel 8 der vorliegenden Arbeit beinhaltet alle o.g. Schritte der Entwicklung eines solchen Assays; wie sich zeigte, erwies sich ein Ansatz mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern als nützlich. Das Screening der Bibliothek, die Sequenzen der reaktiven Peptide und weiter führende Ergebnisse sind in den Kapiteln 9 und 10 dieser Arbeit ausgeführt.

#### 4.4 Visuelle Darstellung des Gesamtkonzepts

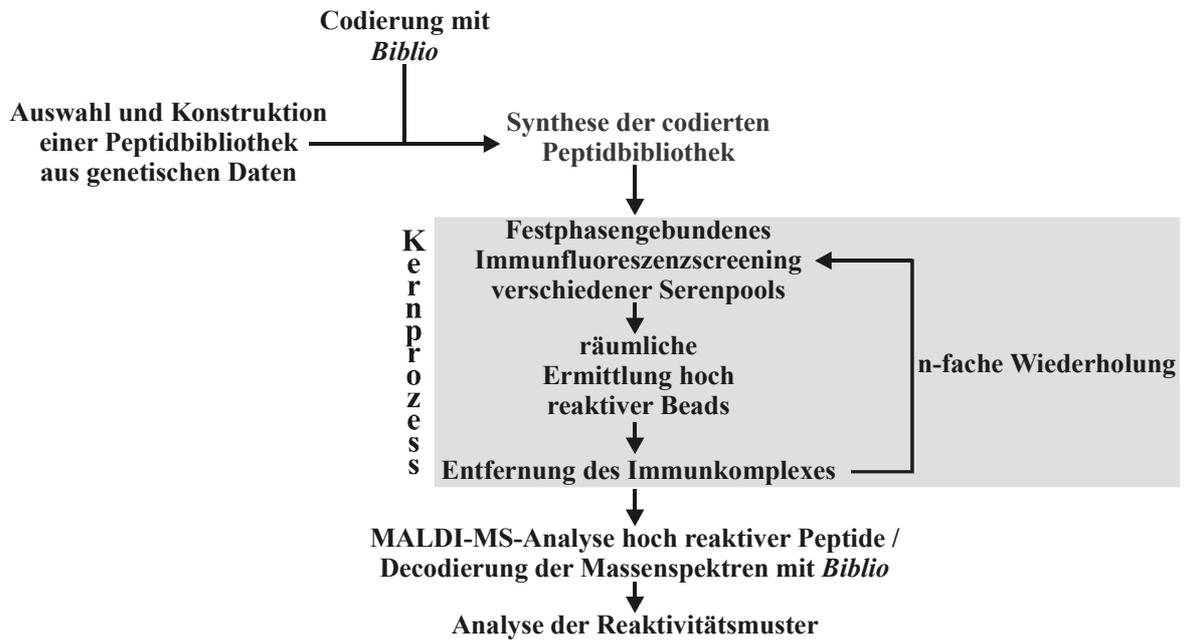


Abb. 4.2: Gesamtdarstellung des Konzepts für einen iterativen kombinatorischen Immunassay zur serologischen Bestimmung von reaktiven Wechselbeziehungen zwischen genetisch definierten Gruppen der biologischen Zielgesamtheit



## 5 Entwicklung eines Verfahrens zur MS-Analyse kombinatorischer Peptidbibliotheken

### 5.1 HPLC-Quantifizierung der gezielten Erzeugung von Rumpfsequenzen

Im ursprünglichen Ansatz von Youngquist und Keough<sup>[124]</sup> wurden 10 % jeder Aminosäureposition der kombinatorischen Bibliothek durch die Einführung von Kettenabbruchsequenzen blockiert („gecappt“). Bewerkstelligt wurde dies mit einer Mischung aus jeweiliger Fmoc-geschützter Aminosäure und dem terminierenden Agens N-Acetyl-Alanin im molaren Verhältnis 9:1 in der Reaktionslösung. Beide Reaktanden wurden über eine Amidbindung mit der festen Phase verknüpft. Ein solches Vorgehen impliziert, dass die thermodynamischen und kinetischen Faktoren der Kupplung beider Aminosäurederivate zumindest sehr ähnlich sind, um ein dem molaren Verhältnis der Mischung entsprechendes Produktgemisch zu erzeugen. Ist dies jedoch nicht der Fall, können in Abhängigkeit der Reaktivitätsdifferenz beider Komponenten zwei unterschiedliche synthetische Konsequenzen eintreten:

- $k_{Cap-AS} \gg k_{Fmoc-AS}$ , d.h. die N-terminal permanent geschützte Aminosäure könnte wesentlich schneller an die feste Phase kuppeln als die Fmoc-geschützte Aminosäure. Dies wäre wahrscheinlich, wenn der sterische Einfluss der Fmoc-Schutzgruppe einen Zugang zu reaktiven Positionen speziell im Inneren der Beadmatrix verhindert oder zumindest gegenüber sterisch weniger anspruchsvollen Aminosäurederivaten stark verlangsamt. Eine Überrepräsentation permanent geschützter Aminosäuren auf dem Bead wäre die Konsequenz und hätte eine dramatische Abnahme des Anteils gewünschten Hauptpeptids zur Folge. Speziell bei größeren als den verwendeten Pentapeptidbibliotheken<sup>[124]</sup> stünde deren Integrität in Frage.
- $k_{Cap-AS} \ll k_{Fmoc-AS}$ , d.h. die Fmoc-geschützte Aminosäure könnte wesentlich schneller an die feste Phase kuppeln als die N-terminal blockierte Aminosäure. Sterische Unterschiede blieben ohne Wirkung; vielmehr kämen hier die molaren Verhältnisse der eingesetzten Komponenten zum Tragen. Youngquist und Keough<sup>[124]</sup> verwenden einen neunfachen molaren Überschuss der Fmoc-

geschützten Komponente gegenüber der Cappingkomponente; will man weniger Hauptpeptid verlieren und erhöht dieses Verhältnis auf 95:5, liegt eine Komponente gar in 19fachem Überschuss vor. Somit ist denkbar, dass die im deutlichen Unterschuss auftretende blockierte Aminosäure nur wenige bis gar keine freien Bindungsstellen des Beads besetzen kann. Im Gegensatz zum ersten Fall wäre die Integrität der kombinatorischen Bibliothek nicht gefährdet, aber eine Codierung schließe fehl.

Somit wird deutlich, dass die Anwendbarkeit des Einsatzes von nicht äquimolaren Aminosäuremischungen zur Codierung kombinatorischer Bibliotheken hinsichtlich der Einhaltung der gegebenen molaren Verhältnisse quantitativ überprüft werden muss. Da die MALDI-Massenspektroskopie, die ja alle auf dem Harz befindlichen Massen abbildet, keine quantitativen Aussagen erlaubt<sup>[125]</sup>, werden hier die Verhältnisse der Peakflächen im HPLC-Chromatogramm<sup>[131]</sup> zugrunde gelegt. Hierbei macht man vereinfachend die Annahme gleicher Extinktionskoeffizienten für alle UV-spektrometrisch detektierten Substanzen; dies gilt um so mehr, je weniger sich die Analyten chemisch unterscheiden. Eine genauere Näherung, die die additiven Beiträge der Extinktionskoeffizienten der absorbierenden chemischen Gruppen in den jeweiligen Peptiden bei der betreffenden Wellenlänge (220 nm) berücksichtigt und diese so berechneten Gesamtextinktionskoeffizienten um den erwarteten Mengenanteil dieser Peptide im HPLC-Lauf gewichtet, bestätigt die zu erwartenden Peakflächenverhältnisse innerhalb der Fehlergrenzen dieses Modells (siehe Kap. 6 bzw. 7), so dass die erstgenannte Annahme gleicher Extinktionskoeffizienten der Peptide<sup>[131]</sup> für alle in diesem Kapitel diskutierten Chromatogramme zu Grunde gelegt wird.

Der erste Ansatz zur HPLC-chromatographischen Analyse besteht aus einem Modellpentapeptid, dessen N-Terminus gecappt wird. Die N-terminale Aminosäuremischung besteht aus 90 % der jeweiligen Fmoc-Aminosäure und zu 10 % aus einer N-terminal blockierten Aminosäure. Man erwartet also ein Peakflächenverhältnis des Hauptpeptids zum gecappten Peptid von 9:1.

Als Terminationsgruppen wurden die Acetyl-, BOC-, Benzoyl- und die Formylgruppe gewählt. Die Synthese des Modellpeptids XLAGV mit X = Ala, Gly oder Phe wurde aufgrund der leichten Abspaltbarkeit auf o-Chlorotriylchlorid-Harz durchgeführt. Da die Fmoc-Schutzgruppe im UV-Bereich stark absorbiert, wurde sie vor der HPLC-Analyse abgespalten.

Ausgehend von vier Cappinggruppen und drei verschiedenen N-terminalen Aminosäuren wurden insgesamt zwölf „codierte“ Peptide im Multimilligramm-Maßstab synthetisiert. Deren HPLC-Analyse nach der Abspaltung vom Harz lieferte leider ein uneinheitliches Bild. Zwei typische Chromatogramme sind im Folgenden aufgeführt. Abb. 5.1 (oben) zeigt das mit BOC gecappte Peptid ALAGV – neben nichtpeptidischen Artefakten und Verunreinigungen der Harzabspaltung – beide zu erwartenden Komponenten im gewünschten Verhältnis. Abb. 5.1 (unten) jedoch liefert für dieses Peptid, diesmal mit der Formylgruppe gecappt, ein Peakflächenverhältnis von nahezu 2:1.

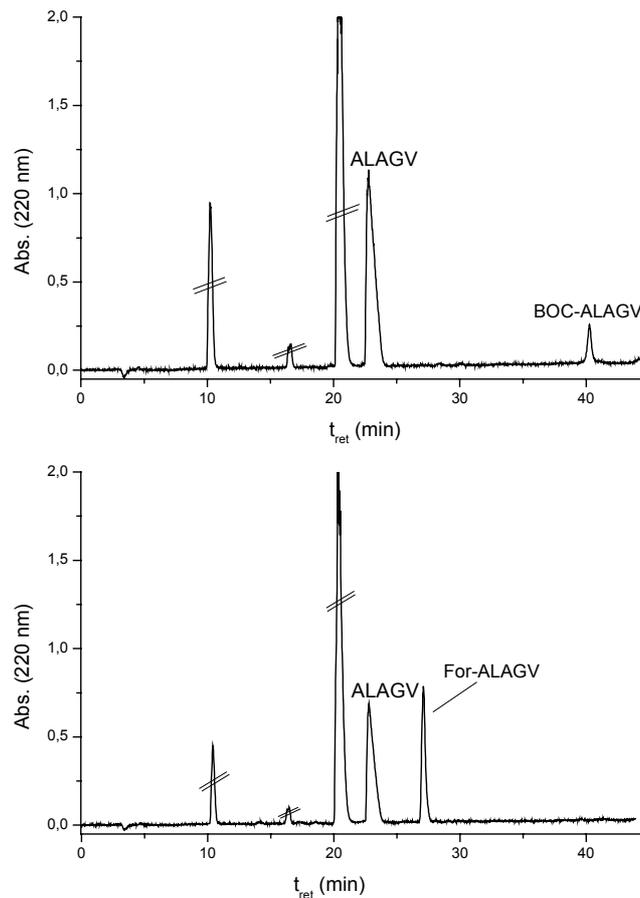


Abb. 5.1: HPLC-Chromatogramme von ALAGV und BOC-ALAGV (oben) und von ALAGV und For-ALAGV (unten). Die Synthese erfolgte auf Polystyrolharz mit *o*-Chlorotrylchloridanker. Säulenbedingungen: Eurospher RP 18, 0-40 % ACN + 0.1 % TFA, 45 min.

Nur in drei von zwölf HPLC-Läufen ließ sich das erwartete Peakflächenverhältnis von 9:1 nachweisen. In den restlichen neun Proben wurden ausschließlich kleinere Verhältnisse zugunsten der Cappingkomponente gefunden. Dieser Trend wurde durch das Chromatogramm eines weiteren Modellpeptids bestätigt. Bei ansonsten identischer Syntheseführung wurde das Octapeptid GAFALAGV an den vom N-Terminus an gerechneten vier ersten Aminosäurepositionen wie folgt gecappt:

- N-Benzyl-Glycin
- N-BOC-Alanin
- N-Formyl-Phenylalanin
- N-Acetyl-Alanin

Im entsprechenden HPLC-Chromatogramm (Abb. 5.2) sind somit fünf Peaks zu erwarten: fände sich das eingesetzte molare Verhältnis der Komponenten von je 9:1 wieder, müsste der Hauptpeak etwa  $0.9^4 \approx 66\%$  der Gesamtfläche aller peptidischen Peaks enthalten.

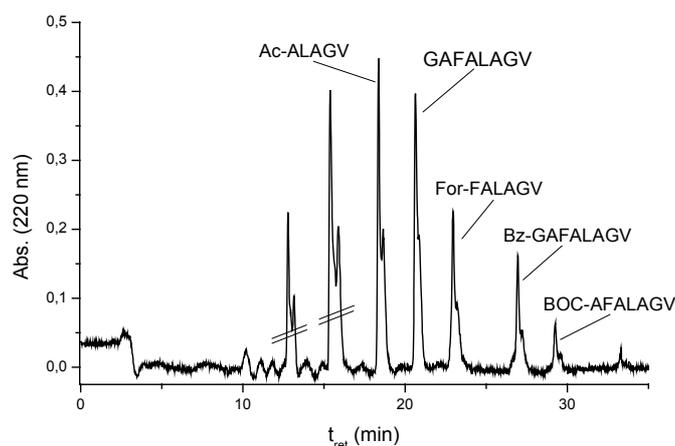


Abb. 5.2: HPLC-Chromatogramm des vierfach gecappten Octapeptids GAFALAGV. Die beiden vorderen Peaks sind Artefakte der Harzabspaltung. Die Synthese erfolgte auf Polystyrolharz mit *o*-Chlorotriethylchloridanker. Säulenbedingungen: Eurospher RP 18, 0-100 % ACN + 0.1 % TFA, 50 min.

Die Fläche des Hauptpeaks umfasst hier weniger als ein Drittel der Gesamtfläche. Somit wird deutlich, dass der sterische Einfluss der Aminosäurederivate einen erheblichen Effekt auf die Kupplungseffizienz hat, insbesondere dann, wenn nicht alle Bindungsstellen für sterisch anspruchsvolle Reagenzien aufgrund der Rigidität der Polystyrolmatrix der Beads zugänglich sind.

Dieses Problem wird durch die Einführung zusätzlicher Polyoxyethylengruppen in die Matrix gelöst; die bereits erwähnten TentaGel-Beads (siehe Kap. 3) sind solche Propfcopolymere. Sogar Enzyme wie Trypsin oder Elastase können die Beads problemlos durchdringen<sup>[69]</sup>; es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sowohl Relaxationsraten der NMR als auch die Kinetik der Kupplung von Aminosäuren an das Harz im Wesentlichen durch die Polyoxyethylenkette und nicht durch die Polystyrolmatrix bestimmt werden<sup>[132]</sup>. Auch im Zusammenhang mit der Entwicklung eines biologischen Testsystems sollten sich TentaGel-Beads bewähren (siehe Kap. 8). Daher wurden sämtliche Peptidbibliotheken der vorliegenden Arbeit auf TentaGel-Beads synthetisiert; das molare Verhältnis von Fmoc-

geschützter und gecappter Aminosäure wurde auf 95:5 eingestellt, da aufgrund der obigen Ergebnisse ein Fehlschlagen der Einführung von Terminationssequenzen nicht befürchtet werden musste. Das folgende HPLC-Chromatogramm (Abb. 5.3) enthält ein Modellpeptid, dessen synthetischer Hintergrund in den Kap. 6 bzw. 7 näher ausgeführt wird. Das acetylierte Decapeptid Ac-RIHIGPGRAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A mit einem hexapeptidischen Linker für eine optimierte massenspektrometrische Detektion wurde im Multimilligramm-Maßstab auf TentaGel-Harz synthetisiert und im molaren Verhältnis von je 95:5 insgesamt fünf mal gecappt, d.h. das Hauptpeptid sollte  $0.95^5 \approx 77\%$  der Gesamtfläche umfassen. Abb. 5.3 zeigt das HPLC-Chromatogramm, das alle sechs Komponenten am besten auflöst. Das Hauptpeptid dominiert klar; der „Fuß“ des Hauptpeaks schließt drei Cappingsequenzen ein. Das gemeinsame Integral der vier Peptide überstreicht  $88.3\%$  der Gesamtfläche des Chromatogramms. Unter der Annahme gleicher Extinktionskoeffizienten aller beteiligten Peptide<sup>[131]</sup> erwartet man einen Flächenanteil von  $91.6\%$  für diesen Peak, nach dem Ansatz gewichteter Extinktionskoeffizienten einen Flächenanteil von  $81.1\%$ ; beide Näherungen bestätigen den erwarteten Flächenanteil innerhalb der Fehlergrenze, die mit  $10\%$  des Gesamtintegrals anzusetzen ist<sup>[131]</sup>.

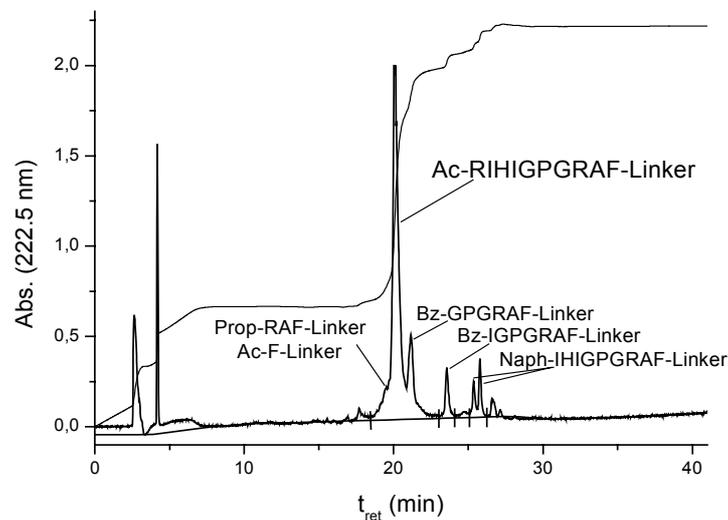


Abb. 5.3: HPLC-Chromatogramm des mit fünf Terminationssequenzen codierten Peptids Ac-RIHIGPGRAF. Die Synthese erfolgte auf TentaGel-Harz mit HMB-Anker. Säulenbedingungen: Eurospher RP 18, 0-100 % ACN + 0.1 % TFA, 50 min.

## 5.2 Massenspektrometrische Sequenzierung von einzelnen Beads

Je nach verwendetem Harztyp und durchschnittlicher Belegung enthält ein einzelnes Bead ca. 10 bis 100 pMol Substanz; dies ist, wie ursprünglich gezeigt, nicht nur für eine MALDI-massenspektrometrische Analyse ausreichend<sup>[124],[126]</sup>, sondern auch für eine konventionelle Leitersequenzierung oder eine Kombination aus beiden<sup>[133]</sup>. Allerdings erscheint aufgrund des in Kap. 5.1 Gesagten eine Rückführung des Anteils Kettenabbruch erzeugender Bestandteile von den ursprünglichen 10 %<sup>[124]</sup> oder gar – wie für den Fall von Tetrapeptiden demonstriert – von bis zu 20 %<sup>[134]</sup> auf einen geringeren, massenspektrometrisch noch zuverlässig messbaren Anteil, geboten. Für die nachfolgend behandelten codierten Peptide wurde daher der Anteil der Terminationskomponente auf 5 % bezüglich der jeweiligen Harzbelegung reduziert. Um dessen Eignung für eine zuverlässige Codierung zu überprüfen, wurde den Harzen jeweils ein einzelnes Bead entnommen, die Peptide abgespalten und MALDI-massenspektrometrisch analysiert.

Das erste Peptid, SIHIGPGRAF, ist die Consensus-Sequenz der Spitze der V3-Region des HIV-1-Subtyps B. Dieses Peptid wurde auf mit Glycin vorbeladenem PAM-Harz synthetisiert (siehe Anhang). Es wurden insgesamt zehn Terminationssequenzen eingeführt, so dass hier eine echte Leitersequenzierung möglich wäre, könnten alle erwarteten Signale detektiert werden.

Das Einzelbead-Massenspektrum von SIHIGPGRAFG ist umseitig gezeigt (Abb. 5.4). Die Terminationssequenzen 1 bis 3 (s. Tab. 5.1) ließen sich massenspektrometrisch nicht nachweisen. Dies ist auf den Einfluss der Matrix zurückzuführen, die in etwa  $10^6$  fachem Überschuss gegenüber dem Analyten vorliegt; in guter Übereinstimmung mit empirischen Daten<sup>[125]</sup> liegt der Schwellenwert der Matrixüberlagerung bei ca. 500 D und verdeutlicht die Notwendigkeit, einen Linker einzuführen, der die Masse selbst des kleinsten möglichen Terminationspeptids deutlich über 500 D anhebt. In den nachfolgend synthetisierten Peptiden wurde daher die Sequenz  $^{\beta}\text{APPPR}^{\beta}\text{A}$  ( $M = 607.7$  D) C-terminal als peptidischer Linker eingeführt.

Nr.	Peptid	messbar
HF	SIHIGPGPRAFG	+
10	Ac-A-IHIGPGRAFG	+
9	Ac-A-HIGPGRAFG	+
8	Ac-A-IGPGRAFG	+
7	Ac-A-GPGRAGF	+
6	Ac-A-PGRAGF	+
5	Ac-A-GRAGF	+
4	Ac-A-RAGF	+
3	Ac-A-AGF	-
2	Ac-A-FG	-
1	Ac-A-G	-

Tab. 5.1: erwartete und detektierte Peptide der codierten Sequenz SIHIGPGRAFG

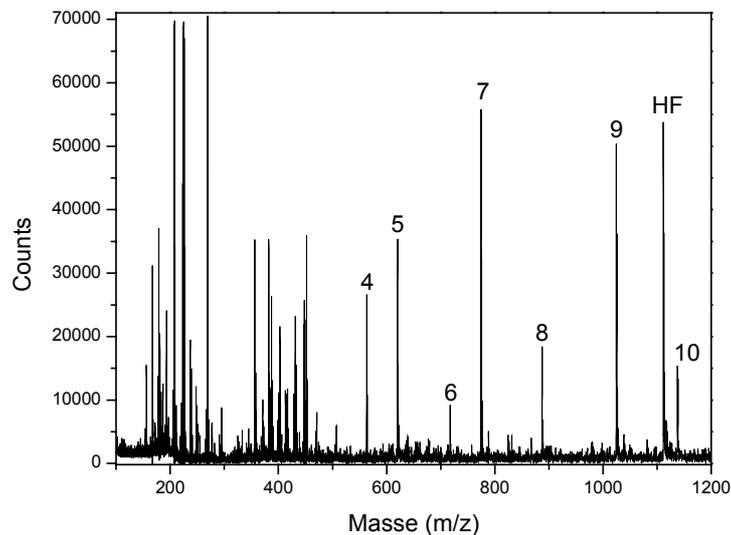


Abb. 5.4: Einzelbead-MALDI-Massenspektrum des codierten Peptids SIHIGPGRAFG. Das Peptid wurde auf Polystyrol-PAM-Harz synthetisiert. Die berechneten und gemessenen Massen sind im Anhang der vorliegenden Arbeit aufgeführt.

Die beiden folgenden Peptide, ebenfalls dem HIV-1-Subtyp B entnommen, sind gemäß einem von *Biblio* berechneten Cappingschema codiert, das in der in den Kapiteln 6 bzw. 7 beschriebenen Decapeptidbibliothek Anwendung findet. Synthetische Einzelheiten und ihre immunologische Bedeutung sind in Kap. 8 näher ausgeführt. Beide Peptide wurden auf TentaGel-Beads synthetisiert und besitzen C-terminal den besagten Linker.

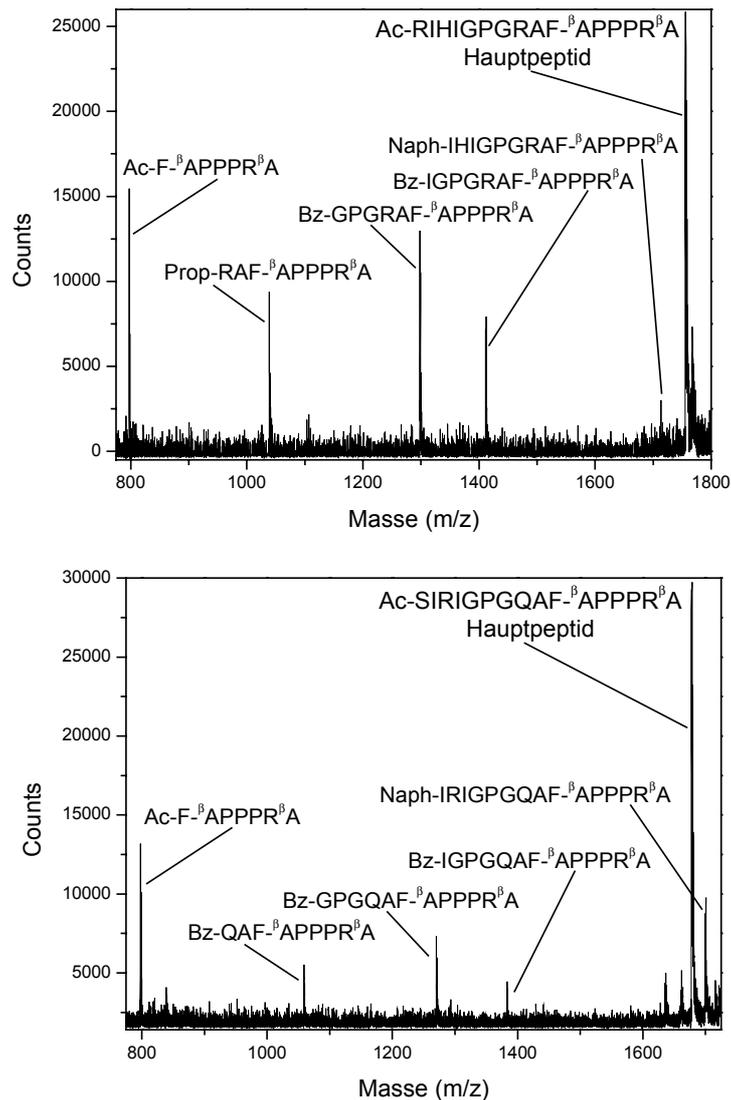


Abb. 5.5: MALDI-MS-Analyse der codierten Decapeptide Ac-RIHIGPGRAF (oben) und Ac-SIRIGPGQAF (unten). Beide Peptide wurden auf TentGel-HMB-Harz synthetisiert.

Die Hauptpeptide und alle erwarteten Terminationssequenzen sind eindeutig massenspektrometrisch bestimmbar. Berücksichtigt man die Restriktion für Massen oberhalb von 500 D, gilt diese Aussage unabhängig von der Beadmatrix. Eine weitere Rückführung des Anteils an Terminationssequenzen wurde allerdings nicht in Betracht gezogen, da die kleinsten beobachteten Peaks der Terminationssequenzen bereits schwierig zu bestimmen waren. So beträgt das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis für das Cappingpeptid Naph-IHIGPGRAF im oberen Spektrum der Abb. 5.5 gerade 3:1.

## 5.3 Synthese N-terminal derivatisierter Aminosäuren

### 5.3.1 Allgemeine Anforderungen für Aminosäurederivate

Das Konzept des adaptiven und sequenztreuen Cappings erfordert die Synthese von Aminosäurederivaten, die N-Terminal speziell funktionalisiert sind, die Seitenketten und deren Schutzgruppen aber den Fmoc-geschützten Aminosäuren entsprechen. Die eigentlichen Terminationsgruppen müssen eine hinreichende Stabilität gegenüber allen chemischen Bedingungen des geplanten Gesamtverfahrens besitzen; insbesondere müssen sie gegenüber der Behandlung mit TFA bei der Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen stabil sein. Die Knüpfung einer Amidbindung zwischen Terminationsgruppe und Aminosäure liegt nahe, da die Peptide selbst gegenüber allen Bedingungen des Gesamtverfahrens stabil sind.

Die Terminationsgruppen selbst sollten möglichst einfach sein, um das resultierende Peptid so gering wie möglich zu verfälschen und den sterischen Anspruch zu minimieren. Als wichtig sollte sich außerdem die Bedingung erweisen, dass die Aminosäurederivate keine Autofluoreszenz aufweisen, die zu einem unnötig starken Hintergrund im Fluoreszenzlicht führen würden.

Somit kamen primär Formyl-, Acetyl-, Propionyl- und andere homologe Gruppen in Betracht. Diese wurden in *Biblio* eingegeben und man ließ die gewünschte Bibliothek (siehe Kap. 6 bzw. 7) probenhalber berechnen. Erst wenn diese kleine Auswahl nicht ausreichte, um die Bibliothek vollständig zu codieren, zog man auch Gruppen wie die Benzoyl- oder die 2-Naphtoylgruppe in Betracht.

### 5.3.2 Festphasenstrategie

Die Möglichkeiten der Auswahl beliebiger Aminosäurepositionen in einer Peptidbibliothek und deren Codierung sollten nicht durch mangelnde Verfügbarkeit gecappter Aminosäuren eingeschränkt werden; daher wurde ein für alle benötigten Aminosäurederivate einheitliches synthetisches Verfahren angestrebt, um das jeweils gewünschte Derivat zügig und in ausreichenden Mengen zu erhalten. Diese Überlegungen führten zu einem templatgestützten festphasensynthetischen Ansatz<sup>[135]</sup>. Grundgedanke ist die Kupplung der betreffenden, noch Fmoc-geschützten Aminosäure an die feste Phase, die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und die Umschätzung des N-Terminus mit der von *Biblio* vorgegebenen permanenten Schutzgruppe. Als Ankergruppe der festen Phase wurde hier erneut die o-Chlorotrylchloridgruppierung gewählt, da sich das gewünschte Aminosäurederivat unter

milden Bedingungen abspalten lässt. Die in den allgemeinen Arbeitsvorschriften der vorliegenden Arbeit aufgeführten synthetischen Parameter entsprechen denjenigen für die reguläre Peptidsynthese an diesem Harz. Wie das folgende typische ESI-Massenspektrum zeigt, gelingt die Synthese ohne die Notwendigkeit, einen Reinigungsschritt nach der Harzabspaltung durchzuführen, glatt und in Ausbeuten von 85 – 90 % bezüglich der gewählten Harzbelegung.

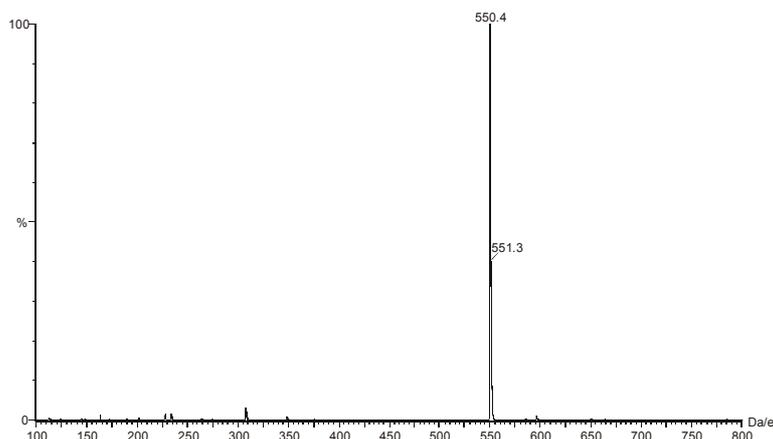


Abb. 5.6: ESI-Massenspektrum von Naph-His(Trt)-OH, berechnete Masse ( $M-H^+$ ): 550.5 D

### 5.3.3 Formylierung des Aminoterminus

Lediglich die N-terminal formylierten Aminosäurederivate konnten auf diese Weise nicht gewonnen werden. Es zeigte sich, dass die säurelabilen Schutzgruppen, hier die *tert.*-Butyl- bzw. die Tritylgruppe<sup>[136]</sup> unter dem Einfluss eines Überschusses Ameisensäure abgespalten werden. Durch Bildung des formylierenden Reagenzes *in situ* ließen sich diese Nebenreaktionen unterbinden. WSC<sup>[137]</sup> (Abb. 5.9 links, umseitig) bildet mit einem Äquivalent Ameisensäure das hochreaktive Ameisensäureanhydrid; das gewünschte Derivat, hier For-Gln(Trt)-OH, wird ohne Angriff der Tritylgruppe synthetisiert, wie das ESI-Massenspektrum zeigt:

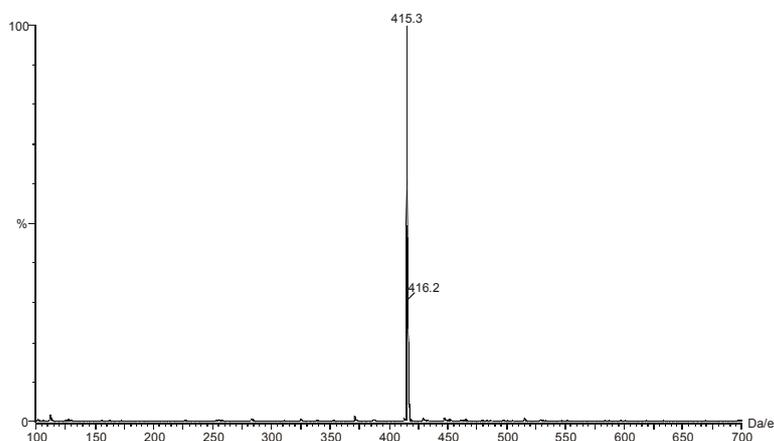


Abb. 5.7: ESI-Massenspektrum von For-Gln(Trt)-OH, berechnete Masse ( $M-H^+$ ): 415.5 D

Die *tert.*-Butylgruppe allerdings wurde auch unter diesen schonenden Bedingungen abgespalten. Zur Synthese eines Derivats, dessen Seitenkette derart geschützt ist, erwies sich hier EEDQ<sup>[138],[139]</sup> (Abb. 5.9 rechts) als brauchbar, das analog zu WSC mit einem Äquivalent Ameisensäure ebenfalls Ameisensäureanhydrid bildet. Beide Verfahren lieferten die formylierten Derivate erneut in 85 – 90 %iger Ausbeute bezüglich der gewählten Harzbelegung. Das ESI-Massenspektrum von For-Thr(*t*Bu)-OH weist lediglich eine geringe Natriumlast auf:

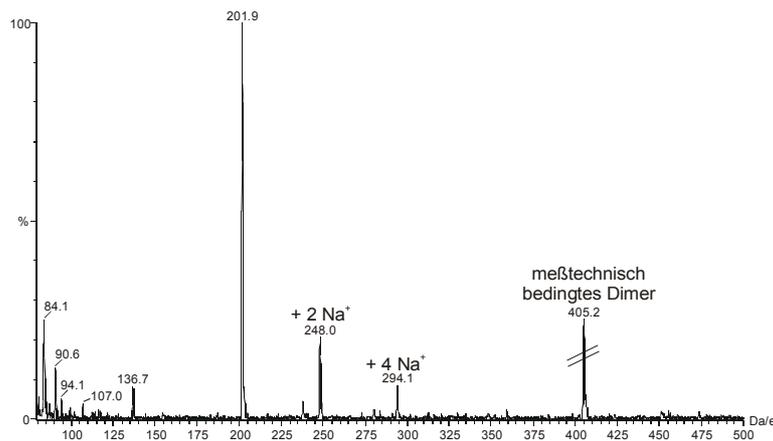


Abb. 5.8: ESI-Massenspektrum von For-Thr(*t*Bu)-OH, berechnete Masse ( $M-H^+$ ): 202.3 D

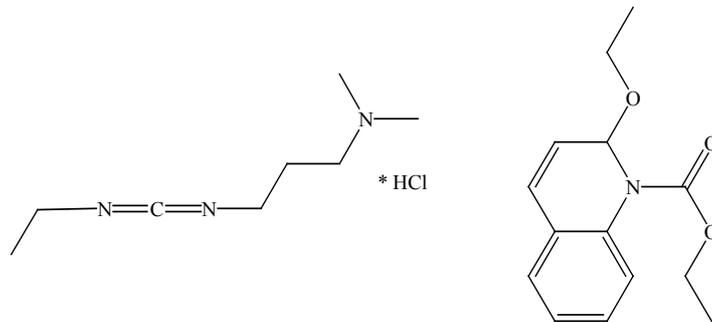


Abb. 5.9: Die Reagenzien WSC (links) und EEDQ (rechts) zur Formylierung an der festen Phase



## 6 Deutschsprachige Fassung der Veröffentlichung über die massenspektrometrische Analyse kombinatorischer Peptidbibliotheken

### Massenspektrometrische Sequenzierung individueller Peptide aus kombinatorischen Bibliotheken durch gezielte Erzeugung kettenabbrechender Sequenzen

von Christian Hoffmann, Dierk Blechschmidt, Ralf Krüger, Michael Karas und  
Christian Griesinger

**Kurzinhalt:** Kombinatorische Peptidbibliotheken sind eine vielseitige Methode für die Entwicklung von Wirkstoffen. Festphasengebundene Testsysteme identifizieren reaktive Peptide durch ELISA und nachfolgender Sequenzierung durch Kettenabbau nach Edman. Unglücklicherweise ist die letztgenannte Methode teuer, zeitaufwändig und erfordert freie N-Termini der Peptide.

Hiermit führen wir eine Methode ein, die Peptide schnell und eindeutig mit Hilfe der syntheseimplementierten Erzeugung von Terminationssequenzen mit anschließender MALDI-massenspektrometrischer Analyse identifiziert.

Die benötigten gecappten Sequenzen werden von einem Algorithmus für eine gegebene Peptidbibliothek bestimmt und optimiert, der im Programm *Biblio* implementiert ist. 99.7 % einer Probe einer Heptapeptidbibliothek konnten unter Verwendung eines einzelnen Beads pro Spektrum decodiert werden. Um diese Bibliotheken zu synthetisieren, wird ein optimierter Cappingansatz präsentiert.

**Einleitung:** [Allgemeine Grundlagen und Einsatz kombinatorischer Bibliotheken wurden bereits in den Kapiteln 3 und 4 der vorliegenden Arbeit ausgeführt.] Die hier beschriebene Methode entwickelt ein ursprünglich von Youngquist und Keough eingeführtes Konzept<sup>16</sup> weiter. Es erlaubt die Ermittlung einer Peptidsequenz, die als biologisch aktiv bestimmt wurde, einfach durch die Abspaltung des Peptids vom Bead und der Aufnahme eines Massenspektrums.

Dieser Ansatz umfasst die folgenden Schritte: Eine kombinatorische Bibliothek wird üblicherweise mit der „Split, Mix & Combine“-Methode von Lam<sup>1</sup> und Furka<sup>17</sup> synthetisiert. Die Harz-Gesamtmenge wird in  $m$  Portionen geteilt, mit  $m$  als der Anzahl der Aminosäuren

an der betreffenden Position. Die Aminosäuren werden an das Harz gekuppelt; danach werden alle Fraktionen vereinigt und gründlich gemischt. Nach Entfernung der N-terminalen Schutzgruppe wird der Syntheszyklus neu begonnen, und am Ende resultiert ein bestimmtes Peptid pro Bead. Um zwischen den verschiedenen Peptiden einer Bibliothek zu unterscheiden, die isobare Aminosäuren und vielfältige Sequenzähnlichkeiten enthalten, werden gecappte Sequenzen an speziellen Aminosäurepositionen eingeführt. In Ergänzung zur gewünschten Peptidsequenz enthält jedes Bead somit auch einen Satz an gecappten Sequenzen. Die Synthese wird durch den Einsatz von Mischungen aus Fmoc-geschützter Aminosäure und dem permanent blockierten Derivat bewerkstelligt, zum Beispiel mit einer Acetyl- oder Benzoylgruppe.

Der Anteil der Cappingreagenzien beträgt fünf Prozent bezüglich der Harzbelegung. Eine genaue Steuerung dieses Anteils ist möglich, da Fmoc-geschützte Aminosäure und permanent blockierte Aminosäure eine etwa gleiche Kinetik bei der Kupplungsreaktion auf TentaGel-Harz aufweisen (nicht gezeigt). Wie später gezeigt wird, ist dieses Verhältnis für eine massenspektrometrische Analyse ausreichend; das gewünschte Peptid verbleibt aufgrund unseres optimierten Cappingschemas als Hauptkomponente auf dem Bead. Darüber hinaus ermöglicht unser Ansatz, der auf Aminosäuremischungen aufbaut, eine praktikable und handhabbare Anwendung des Capping-Konzepts auf große Bibliotheken mit mehreren Tausend Spezies.

Im Gegensatz zum Originalkonzept<sup>16</sup> mit festen Cappingsschritten und -reagenzien setzen wir eine adaptive Cappingstrategie ein, die die Anzahl notwendiger Cappingpositionen und die Menge der terminierten Sequenzen minimiert. Ferner wird die beschränkte Diversität einer mit „fester“ Cappingstrategie synthetisierter Bibliothek durch unser Konzept aufgehoben. Da die gecappten Peptide den Hauptpeptiden so verwandt wie möglich sind, ist es unwahrscheinlich, dass die Terminationssequenzen eine von den Hauptpeptiden abweichende biologische Aktivität aufweisen.

Unser Ansatz, der im Programm *Biblio* implementiert ist, optimiert die Cappingmuster einer gegebenen Bibliothek bezüglich der Anzahl der Cappingsschritte, d.h. sogar in sehr großen Bibliotheken muss nicht jede Aminosäureposition gecappt werden. In jedem Fall jedoch ist die Wahl der Aminosäure an jeder beliebigen Position frei.

Somit löst unser Ansatz das Problem isobarer Aminosäuren und Sequenzähnlichkeiten, die in großen Bibliotheken gehäuft auftreten. Frühere Ansätze, das Problem isobarer Massen zu lösen, erforderten die Verwendung von Halogenen<sup>18</sup> oder den Einsatz von Isotopen<sup>19</sup>. Ohne den synthetischen Aufwand einer solchen chemischen Codierung ist die Größe einer

gewählten Bibliothek auch mit unserer Methode nicht durch isobare Komponenten beschränkt. Wie im Folgenden an Hand eines Modelldecapeptids gezeigt wird, wird die Menge and Hauptpeptid maximiert.

## Ergebnisse und Diskussion

### Der Algorithmus von *Biblio*

*Biblio* erfüllt zwei Aufgabenstellungen. In einem ersten Schritt berechnet es für eine gegebene Bibliothek das für die massenspektrometrische Analyse optimale Cappingmuster und übersetzt in einem zweiten Schritt einen Satz von Massenpeaks in die wahrscheinlichste Peptidsequenz der Bibliothek. Für diesen Schritt beruht der verwendete Algorithmus auf der Tatsache, dass jedes Peptid in einer bestimmten Bibliothek durch seine einzigartigen Massenpeaks beschrieben wird, die durch die Cappingprozedur erzeugt werden. Eine Masse ist durch das Hauptpeptid gegeben. Die anderen Massen hängen von der jeweiligen Peptidsequenz und dem Cappingmuster der Bibliothek ab. Die Ermittlung dieses Musters mit einer minimalen Anzahl an Cappingschritten, also der Codierung der Bibliothek, wird durch *Biblio* bewerkstelligt und ist in Abbildung 6.1 beschrieben.

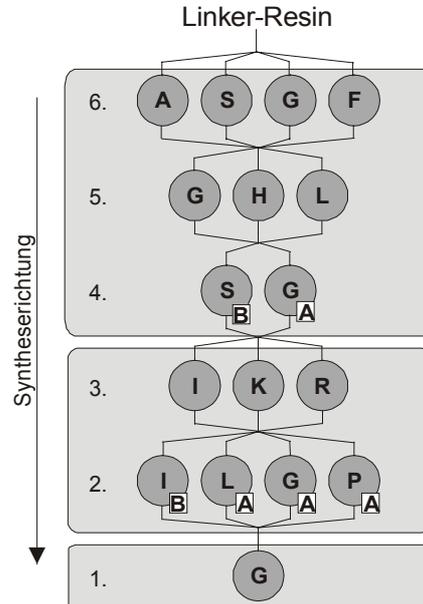


Abb. 6.1: Verschiedene Schritte, eine Beispielbibliothek mittels des Algorithmus *Biblio* zu codieren. Das Peptid wird an einem Linker festphasengebunden synthetisiert. Die ersten Cappingposition ist die Aminosäure 4, da identische Massen auftreten, namentlich die Sequenzen SGG und GGS. Capping mit verschiedenen Cappingreagenzien, hier dargestellt mit A bzw. B, löst diese Uneindeutigkeit auf. Das nächste Capping wird an Position 2 durchgeführt, da die Dipeptide IL und LI isobar sind. Für dies Bibliothek sind somit zwei Cappingschritte ausreichend.

Zunächst werden die Massen der Monopeptide, d.h. die C-terminalen Aminosäuren, berechnet und verglichen. Im Falle von isobaren Aminosäuren wäre Capping bereits im ersten Syntheseschritt notwendig. Wenn dies, wie hier, nicht notwendig ist, wird die zweite Aminosäureposition in die Berechnung mit einbezogen. Die Massen der möglichen Dipeptide (AH, AL, SG, SH etc.) werden berechnet und verglichen. Diese Schritte werden so lange wiederholt, bis ähnliche oder identische Massen gefunden werden. Zwei Massen gelten als ähnlich oder identisch, wenn sie sich um weniger als  $\pm 1$  D unterscheiden. Nach der dritten Aminosäure treten in der Bibliothek Kombinationen mit ähnlichen Massen auf (Abbildung 6.1, oben). Die Tripeptide GXS und SXG haben identische Massen (X ist eine beliebige Aminosäure an Position 2). Somit ist Capping notwendig. Das richtige Cappingmuster wird durch Permutation des gegebenen Satzes an Cappingreagenzien bestimmt; diese sind in Tabelle 6.2 aufgeführt. Ein korrektes Cappingmuster stellt die Unterschiedlichkeit aller Peptide der Bibliothek bis zum Schritt drei sicher. Da alle Aminosäuren an Position drei der Bibliothek in Abb. 6.1 gecappt werden, ist die Bibliothek bis zu diesem Punkt eindeutig bestimmt. Somit kann dieser Teil der Bibliothek von den weiteren Berechnungen für die Synthese ausgeschlossen werden. Beginnend mit der vierten Aminosäureposition, werden die Massen der Monopeptide (I, K, R) berechnet und verglichen. Ähnlichkeiten werden nicht festgestellt. Die fünfte Position wird hinzugezogen. Die Masse der möglichen Dipeptide (II, IL, IG, IP, KI, KL etc.) werden berechnet und verglichen. Peptide mit identischen Massen werden gefunden, da I und L isobar sind. Nach Bestimmung des Cappingmusters ist die Bibliothek eindeutig bis zur fünften Position bestimmt. In der in Abb. 6.1 gegebenen Beispielbibliothek besteht die sechste Position nur aus Glycin, so dass die Berechnung beendet ist (Abb. 6.1, unten).

Die Hexapeptidbibliothek dieses Beispiels benötigt somit nur zwei Cappingschritte für eine eindeutige Analyse, d.h. eine vollständige Codierung und Decodierung. Jede Peptidsequenz wird durch eine einzigartige Massenkombination repräsentiert. Der verwendete Algorithmus behält eine geringe Redundanz vor und führt nicht in jedem Fall zum theoretischen Minimum an Cappingschritten, da alle Aminosäuren einer spezifischen Position gecappt werden. In der Beispielbibliothek etwa wäre das Cappen von G und P an der fünften Position nicht notwendig, um eine eindeutige Codierung zu erzeugen. Jedoch würde ein unvollständiges Capping von Aminosäurepositionen die Einteilung der gesamten Bibliothek in Untergruppen vereiteln, was im Gegenzug eine erhöhte Rechenzeit zur Analyse insbesondere größerer Bibliotheken bedeutete. Somit ist das vorgeschlagene adaptive

Codierungsschema leicht redundant; dies stellt sicher, dass diese Methode Massenfehler in der MS-Analyse und ggf. fehlende Massenpeaks toleriert.

Die Decodierung der Bibliothek wird ebenso mit dem Programm *Biblio* bewerkstelligt, indem ein gegebener Satz an Massen aus der MS-Analyse mit denen der codierten Bibliothek verglichen wird. Für jede Masse wird die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Sequenz durch Vergleich des beobachteten mit den theoretisch vorhergesagten Mustern bestimmt. Die Übereinstimmung der Massen wird durch einen Qualitätsfaktor Q wie folgt definiert: Q ist gleich 1, 0.8 oder 0.3, wenn eine experimentell bestimmte Masse innerhalb  $\pm 1$ ,  $\pm 2$  bzw.  $\pm 3$  D übereinstimmt. Ist die Massenabweichung größer als  $\pm 3$  D, beträgt der Qualitätsfaktor Null. Diejenige Sequenz, die die höchste Summe aller Qualitätsfaktoren erreicht, gibt das richtige Ergebnis wieder. Eine Sequenzbestimmung mittels dieses parametrischen Ansatzes erwies sich als robust gegenüber Artefakten; sogar wenn mehr Massenpeaks in einem Spektrum auftraten, wurde dennoch die richtige Masse bestimmt. Die niedrigeren Qualitätsfaktoren 0.8 und 0.3 werden eingeführt, um kleinere zufällige Messungenauigkeiten zu berücksichtigen.

**Konstruktion codierter festphasengebundener kombinatorischer Bibliotheken.** Die kombinatorischen Bibliotheken wurden auf TentaGel S HMB-Harz mit der „Split, Mix & Combine“-Methode<sup>17</sup> auf Basis der Fmoc-Schutzgruppenstrategie<sup>20</sup> synthetisiert. Gecappte Peptide werden durch den Einsatz von Mischungen aus der Fmoc-geschützten Aminosäure und ihrem permanent blockierten („gecappten“) Derivat erzeugt. Capping wird nur an den von *Biblio* berechneten Positionen durchgeführt. Ein peptidischer Linker,  $\beta$ Ala-Pro-Pro-Arg- $\beta$ Ala, wird C-terminal zwischen dem HMB-Harz und der funktionellen Aminosäuresequenz eingeführt, um folgende Anforderungen zu erfüllen: Zum einen vergrößert ein Linker die Distanz zwischen HMB-Harz und der Peptidsequenz, erhöht deren Mobilität und die Zugänglichkeit für das biologische Zielmolekül. Der Linker erwies sich in einem Test, bei dem ein HIV-negatives Serum gegen den harzgebundenen Linker getestet und mit einer BCIP/NBT-Farbpräzipitatfällung<sup>16</sup> visualisiert wurde, als biologisch inert. Differenzen zu Negativkontrollen wurden nicht beobachtet. Zudem ist bekannt, dass kurze peptidische Linker, die Prolin, Arginin und  $\beta$ -Alanin enthalten, nicht mit den Ergebnissen von biologischem Screening interferieren<sup>5,7,16</sup>.

Des Weiteren ist es für die MALDI-Massenspektroskopie von Vorteil, wenn ein Molekül einen „Ladungsanker“ enthält, der einfach zu protonieren ist und so zu einem einheitlichen Ionisationsverhalten und möglicherweise einer Verbesserung der Signalqualität

aller involvierten Peptide beiträgt. Hier dient das Arginin mit seiner Guanidingruppe als Ladungsanker<sup>32</sup>. Außerdem wird eine einheitliche Abspaltbarkeit aller Peptide durch die Einführung von C-terminalem  $\beta$ -Alanin unter Verwendung einer wässrigen Base erreicht. Dieses Vorgehen erlaubt den Verzicht auf eine Abspaltung eines C-terminalen Methionins mit BrCN<sup>16</sup>. Da wir TentaGel S HMB-Harz einsetzen, ist das Peptid kovalent über eine Esterbindung mit dem Harz verbunden und somit stabiler gegenüber den aggressiven oxidativen Bedingungen der Seitenkettenentschützung mit TFA als das relativ oxidationsempfindliche Methionin. Für die Abspaltung des Peptids vom HMB-Harz wird normalerweise eine einnormale wässrige NaOH-Lösung verwendet. Da allerdings Einzelbeadmessungen vorgenommen wurden, erwies sich der Restgehalt an Alkaliionen als inkompatibel mit den Bedingungen der MALDI-Ionisation. Daher spalteten wir das Peptid durch *in situ*-Erzeugung von Hydroxylionen ab, indem das betreffende Bead mit einer Lösung von 10 %igem wässrigem Triethylamin über Nacht inkubiert wurde. Der Linker selbst ist groß genug, um die Masse sogar des kleinsten gecappten Peptids über 600 D zu erhöhen. Somit konnten von der MALDI-Matrix verursachte Störsignale sogar im femtomolaren Bereich, in dem der Analyt vorlag, umgangen werden.

**MALDI-Sequenzierung ausgewählter Beads zweier Modellbibliotheken.** Die erste Modellbibliothek ist eine Pentapeptidbibliothek mit 144 verschiedenen Spezies, aufgeführt in Tabelle 6.1. Als Linker wurde hier  $\beta$ Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Met verwendet. Der N-Terminus jedes Peptids ist das freie Amin.

Aminosäurepositionen				
1	2	3	4	5
A	F <sup>2</sup>	A	F	I <sup>2</sup>
G	G <sup>2</sup>	G	Q	L <sup>1</sup>
	I <sup>4</sup>	L	T	
		Y		

Tab. 6.1: Pentapeptidbibliothekschema mit 144 Spezies. Der N-Terminus ist das freie Amin,  $\beta$ APPPRM wurde als Linker eingesetzt. Die von Biblio vorhergesagten Cappingpositionen sind durch hochgestellte Indices angegeben. Die Übersetzung in N-terminale Schutzgruppen ist in Tabelle 6.2 aufgeführt.

Vor der Synthese wurde *Biblio* mit den Daten der Bibliothek beschickt: Anzahl der Aminosäurepositionen, gewünschte Aminosäuren pro Position und Angabe eines Massentoleranzintervalls. Das Programm berechnete nur zwei Cappingsschritte (Positionen 2 und 5) bei Wahl eines Massenintervalls von  $\pm 1$  D für jedes MALDI-Signal. Acetyl-,

Benzoyl-, 2-Naphtoyl- und die Propionylgruppe werden als kettenabbrucherzeugende Reagenzien eingesetzt (Tabelle 6.2). Wäre eine starre Cappingstrategie verwendet worden, wären fünf Cappingsschritte notwendig gewesen.

Gruppe	Modifikation	Abkürzung	Masse
1	Acetyl-	Ac-	+ 42.0
2	Benzoyl-	Bz-	+ 104.0
3	2-Naphtoyl-	Naph-	+ 154.2
4	Propionyl-	Prop-	+ 56.0

Tab. 6.2: N-terminale Modifikationen, die für die permanente Blockade der Aminotermini der für das Capping eingesetzten Aminosäuren. Die Masse ist relativ zur ungeschützten Aminosäure angegeben.

Mehrere Beads wurden mit einer Nadel selektiert. Nach der Abspaltung der Peptide wurden diese mittels MALDI-MS analysiert. Ein typisches Spektrum zeigt Abb. 6.2a.

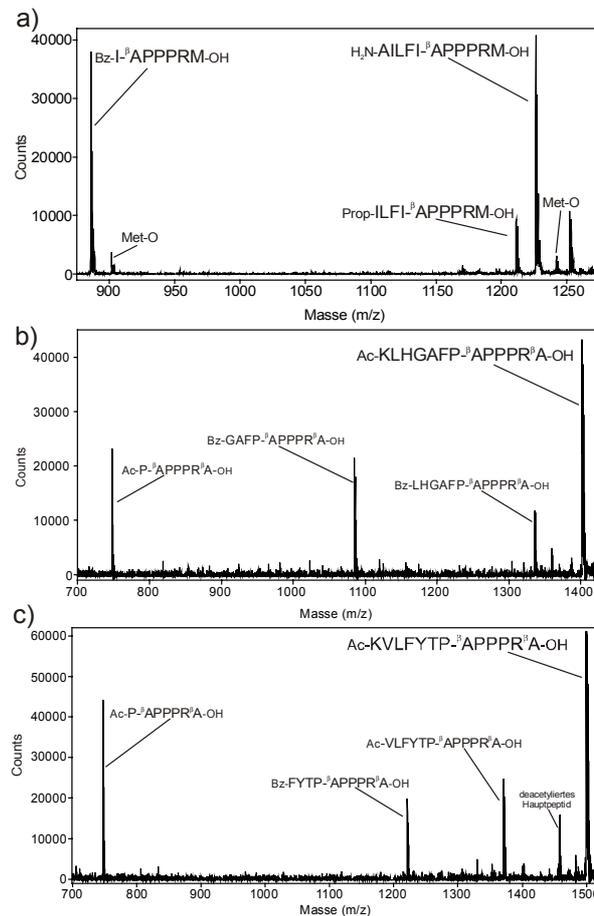


Abb. 6.2: a) MALDI-Massenspektrum des codierten Pentapeptids AILFI und seine beiden zugeordneten codierenden Untersequenzen. Da Methionin für den Linker verwendet wurde, sind zusätzliche Peaks zu beobachten, die auf die Oxidationsprodukte des Methionins zurückzuführen sind. b) MALDI-Massenspektrum des Heptapeptids KLHGAFP und seiner drei codierenden Peptide. Die Zuordnung der Peptide wurde von Biblio berechnet. c) MALDI-Massenspektrum des Heptapeptids KVLFYTP und seiner drei codierenden Peptide. Die Zuordnung der Peptide wurde ebenfalls von Biblio berechnet. Wichtigstes Nebenprodukt ist ein Peak, der einem kleinen Anteil deacetylierten Hauptpeptids entspricht.

Zwei Signale der Cappingpeptide und eines des Hauptpeptids waren zu erwarten und werden tatsächlich mit einem hervorragenden Signal-zu-Rauschen-Verhältnis beobachtet. Aufgrund der Flexibilität der Cappingreagenzien kann die Sequenz des Peptids allerdings nicht direkt aus dem Spektrum abgelesen werden. Die drei beobachteten Massen wurden in Biblio eingegeben; dieses ermittelte die Sequenz AILFI eindeutig als gesuchte Sequenz des Peptids. Die Multiplizität der Peaks aufgrund ihrer Isotopenauflösung wird später diskutiert. Da der Linker Methionin enthält, treten Artefakte der Methioninoxidation im Spektrum auf. In allen Spektren der Pentapeptidbibliothek trat zudem ein weiterer Peak mit einer Massendifferenz von + 26 D in bezug auf das jeweilige Hauptpeptid auf. Unglücklicherweise konnte die Identität dieses Peaks, möglicherweise eine N-terminale Modifikation, nicht aufgeklärt werden; weder zusätzliche MALDI-TOF-PSD-Fragmentation<sup>21</sup> noch Nanospray-ESI-Massenspektren konnten schlüssige Hinweise liefern.

Um die Diversität der Bibliotheken zu erhöhen, wurde eine Heptapeptidbibliothek (Tabelle 6.3) mit 5184 Sequenzen synthetisiert, nachdem das optimale Cappingmuster von *Biblio* berechnet wurde.

Aminosäurepositionen						
1	2	3	4	5	6	7
A	I <sup>1</sup>	A	F <sup>2</sup>	A	F	I <sup>2</sup>
G	L <sup>2</sup>	H	G <sup>2</sup>	G	Q	L <sup>1</sup>
F	P <sup>1</sup>	L	I <sup>4</sup>	L	T	P <sup>1</sup>
K	V <sup>1</sup>			Y		

Tab.6.3: Heptapeptidbibliothekschema mit 5184 Spezies. Der N-Terminus ist acetyliert, <sup>β</sup>APPPR<sup>β</sup>A wurde als Linker eingesetzt. Die von Biblio vorhergesagten Cappingpositionen sind durch hochgestellte Indices angegeben. Die Übersetzung in N-terminale Schutzgruppen ist in Tabelle 6.2 aufgeführt.

Nur drei der sieben Positionen der Bibliothek mussten gecappt werden (Positionen 2, 4 und 7 in Tabelle 6.3); erneut wurde eine Massentoleranz von ± 1 D angesetzt. Der von nun an benutzte Linker ist das beschriebene Hexapeptid <sup>β</sup>Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-<sup>β</sup>Ala, um die Oxidation von Methionin zu umgehen. Acetylierung des N-Terminus des Hauptpeptids verhinderte das Auftreten von Artefaktensignalen, die mit dem Hauptsignal in Verbindung stehen. Typische Spektren sind in Abb. 6.2b und 6.2c gezeigt (siehe Seite 59). Vier Signale werden erwartet, drei Terminationspeptide und ein Hauptpeptid. Die gefundenen Signale, beispielsweise in Abb. 6.2b, sind den zugehörigen Peptidsequenzen, die *Biblio* ermittelt hat, zugeordnet: Das Hauptpeptid tritt bei m/z = 1401.5 (Ac-KLHGAFP-Linker) auf; die

gecappten Peptide bei 1335.4 (Bz-LHGAFP-Linker), 1085.1 D (Bz-FP-Linker) und 747.8 (Ac-P-Linker). Abb. 6.2c zeigt die Decodierung eines weiteren Peptids von einem einzelnen Bead:  $m/z = 1499.2$  für das Hauptpeptid (Ac-KVLFYTP-Linker), 1370.9 (Ac-VLFYTP-Linker), 1220.8 (Bz-FYTP-Linker) und 747.5 (Ac-P-Linker) für die Terminationssequenzen. In beiden Spektren besitzt das Hauptsignal die größte Intensität. Jedoch erlaubt die MALDI-Massenspektroskopie keine quantitativen Aussagen; das molare Verhältnis des Hauptpeptids zu den gecappten Peptiden muss, wie später gezeigt, auf eine andere Weise bestimmt werden.

Alle aufgenommenen Spektren weisen ein hervorragendes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis und eine Isotopenauflösung der Massen auf (siehe Abb. 6.3).

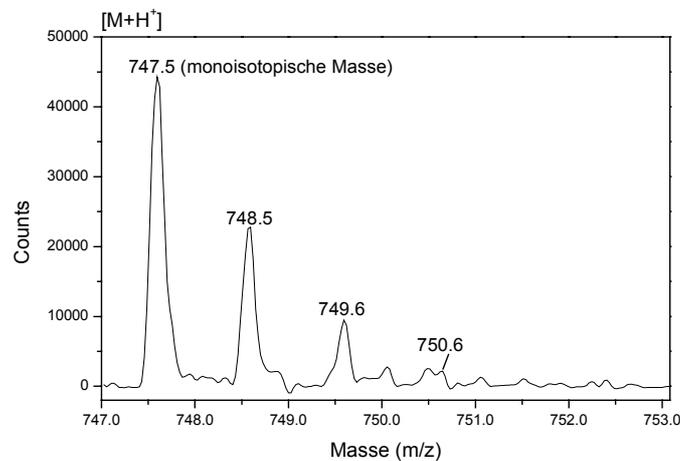


Abb. 6.3: Experimentell ermitteltes Isotopenmuster von Ac-P- $\beta$ APPPR $\beta$ A-OH. Ein einzelnes Bead enthält etwa 90 pMol Substanz, dieses Spektrum wurde mit einem Anteil von etwa 100 fMol aufgenommen.

Unerwünschte Kettenabbruchsequenzen, unvollständige Abspaltung von Seitenkettenschutzgruppen oder Sequenzen mit fehlenden Aminosäuren stellen ein bedeutendes Problem der Peptidsynthese dar. Solche Nebenprodukte könnten den Decodierungsvorgang unterbinden, da diese Signale nur durch ihr molares Verhältnis von den gewünschten gecappten Peptiden unterschieden werden könnten. Allerdings traten nur wenige Nebenprodukte in unseren Bibliotheken auf, die in Tabelle 6.4 umseitig aufgeführt sind. Größere Peaks resultieren als Addukte der Peptide mit Natrium oder Kalium. Diese Signale treten vor allem bei den Hauptpeptiden auf, da diesen in der Regel die größte Intensität aller Signale eines Spektrums zukommt. Des Weiteren wird Deacetylierung des Hauptpeptids als bekannte Nebenreaktion während der Seitenkettenabspaltung beobachtet.

Gelegentlich trat ein Signal auf, das eine um 42 D höhere Masse als die des Hauptpeptids aufwies. Unter den Bedingungen der Acetylierung (10 eq Acetanhydrid, 50 eq

Triethylamin, 2h) wird der Guanidinterminus von Arginin zusätzlich acetyliert<sup>34</sup>, obwohl dieser aufgrund der Anforderungen der Peptidsynthese geschützt ist.

Modifikation	Masse
Na	+ 22.0
K	+ 38.0
Ac	+ 42.0
Deacetylierung	- 42.0
O	+ 16.0

Tab. 6.4: Während der Einzelbeadsequenzierung aufgetretene Nebenprodukte. Oxidation wird nur in Peptiden mit Methioninresten beobachtet.

**Statistische Auswertung von 299 Proben der Heptapeptidbibliothek.** Um die Qualität des von *Biblio* berechneten Codierungsschemas sicherzustellen und die Verlässlichkeit des Einzelbeadkonzepts aufzuzeigen, wurden 300 Beads der Heptapeptidbibliothek zufällig ausgewählt und die Peptide mittels MALDI-Massenspektroskopie analysiert. 299 der 300 Beads konnten erfolgreich sequenziert werden: in jedem Fall wurden die drei plus ein Signale (drei gecappte und ein Hauptpeptid) beobachtet. Alle diese Spektren konnten von *Biblio* eindeutig einer einzelnen Peptidsequenz zugeordnet werden. Dies entspricht einer Zuverlässigkeit von 99.7 %. Ein Bead enthielt nur ein Signal niedrigerer Masse, die keinem Hauptpeptid zugeordnet werden konnte, sondern vermutlich einer Terminationssequenz, Bz-GLFI-Linker. Diese Sequenz codiert 48 verschiedene Peptide voller Länge. Diese Sequenz konnte somit nicht bestimmt werden. Wie in Tabelle 6.5 gezeigt, wurden insgesamt 249 verschiedene Sequenzen identifiziert, von denen 206 nur einmal auftraten. Die Sequenzen, die mehr als zweimal vorkamen, sind einzeln aufgeführt.

Anzahl der Sequenzen	Multiplizität
206	1
37	2
5	3
1	4

Tab. 6.5: Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse von 299 Beads der Heptapeptidbibliothek. Insgesamt wurden 249 verschiedene Heptapeptidsequenzen in 299 Stichproben beobachtet. Die fünf dreifach auftretenden Sequenzen waren: FVHIYQP, GVAIYQP, GVHIYQP, KVHIGFP und KVLIIYQP, eine Sequenz trat vierfach auf: KVHIYQP.

Zur statistischen Analyse der sequenzierten Peptide wurde die Häufigkeit der eingesetzten Aminosäuren pro einzelner Position sowie die Unabhängigkeit der Positionen betrachtet. Das Auftreten der Aminosäuren in jeder Position sollte auf der Anzahl der Fraktionen pro Kupplungsschritt beruhen. Diese Fraktionen waren nahezu identisch mit Ausnahme einer Aminosäure pro synthetischem Schritt, die als so genannte Reserveposition bezeichnet wird. Diese Reserveposition enthielt zwischen 47 und 73 % der gesamten Harzmenge, was durch das Auftreten der entsprechenden Aminosäuren wiedergegeben wird.

Die Unabhängigkeit der Aminosäurepositionen in der Bibliothek wurde auf zwei Arten getestet.  $\chi^2$ -Tests auf Unabhängigkeit wurden für jedes Paar aller Aminosäurepositionen durchgeführt (insgesamt 21 Tests). Zwei dieser Tests waren signifikant auf dem Niveau für  $p = 0.01$ : Positionen 1 und 6 sowie 5 und 6. Die anderen 19 Tests waren nicht signifikant auf den Niveaus 0.01 oder 0.05. Als zweiten Test auf Unabhängigkeit wurde die Anzahl der Sequenzen, die  $k$  mal auftraten (mit  $k = 1, 2, 3 \dots$ ), in der 299 Peptide umfassenden Stichprobe mit 100000 simulierten Gesamtheiten verglichen, die 299 Stichproben unter der Annahme enthält, dass die a priori-Wahrscheinlichkeiten für die Aminosäuren in jeder Position den experimentellen Beobachtungen entsprechen und Unabhängigkeit jeder Position annehmen. Die Anzahl der Sequenzen, die nur einmal auftraten ( $k = 1$ ), war in den Simulationen signifikant höher als in der experimentell bestimmten Stichprobe: in nur 59 von 100000 Permutationen gab es so wenige wie beobachtet wurden. Abb. 6.4 vergleicht die vorhergesagte Multiplizitätsverteilung mit der experimentell bestimmten Verteilung. Die Varianz ist mit Fehlerbalken angegeben. Die experimentelle Verteilung liegt innerhalb  $3 \sigma$  der theoretischen Vorhersage.

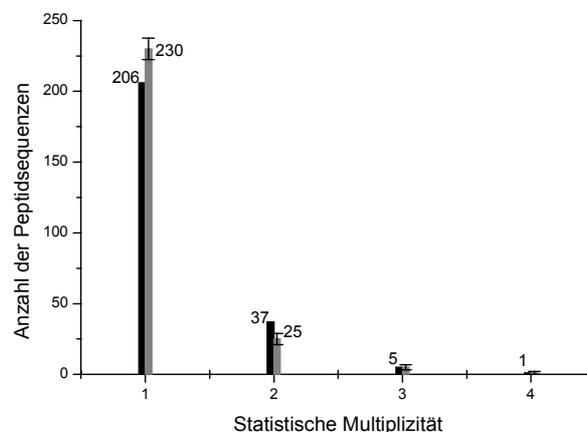


Abb. 6.4: Experimentell bestimmte Verteilung von 299 decodierten Peptidsequenzen einer Heptapeptidbibliothek bezüglich ihrer Multiplizität (schwarz dargestellt) im Vergleich zu der theoretischen Vorhersage (grau dargestellt).

Somit ergibt sich aus bisher ungeklärten Gründen, dass die einzelnen Aminosäuren in den Positionen der Bibliothek nicht unabhängig sind. Obwohl eindeutig nachweisbar, erscheint dieser Effekt, die erwünschte Gleichverteilung der Sequenzen störend, allerdings deutlich weniger bedeutend als die Nichteinheitlichkeit der Aminosäuren der individuellen Positionen. In nachfolgenden Experimenten muss die Reserveposition daher aufgrund des bisher Gesagten minimiert werden. In der Tat ergab eine Synthese einer Peptidbibliothek, die diese Erkenntnisse berücksichtigt, eine homogenere Verteilung der Peptide (unveröffentlicht).

**Abschätzung des Verhältnisses Hauptpeptid/Cappingpeptide mittels HPLC.** Für biologische Tests ist es bedeutsam, die Menge an Hauptpeptid auf einem Bead zu maximieren. Da MALDI-TOF-MS keine quantitative Methode ist, muss die Ausbeute des Hauptpeptids gegenüber den gecappten Peptiden durch andere Methoden bestimmt werden. Daher synthetisierten wir das N-terminal acetylierte Peptid Ac-RIHIGPGRAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A manuell als einzelne Sequenz in größerer Menge für eine effiziente HPLC-Analyse der Peptide. Das Hauptpeptid ist eine Sequenz, die der V3-Region des HIV-1-Subtyps B entnommen ist<sup>23</sup>. Details der zugrunde liegenden Bibliothek sind später im Text beschrieben. Dieses Peptid wurde wie bereits beschrieben synthetisiert und codiert. Fünf Cappingsschritte waren notwendig; jeweils 5 % der Peptidkette wurden gecappt. Somit waren folgende Peptide zu erwarten:

Hauptpeptid	Ac-RIHIGPGRAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A
Cappingpeptide	Naph-IHIGPGRAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A
	Bz-IGPGRAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A
	Bz-GPGRAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A
	Prop-RAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A
	Ac-F- $\beta$ APPPR $\beta$ A.

Da fünf Terminationssequenzen zu je fünf Prozent eingeführt wurden, sollte die relative Ausbeute des Hauptpeptids  $(0.95)^5 \approx 77\%$  betragen. Dieses wird durch HPLC überprüft; diese bietet eine gute Abschätzung von relativen Anteilen<sup>33</sup>. Das Chromatogramm, das die Peptidmischung am besten auflöst, ist in Abb. 6.5 gezeigt. Der HPLC-Peak, der das Hauptpeptid und drei nicht aufgelöste Cappingpeptide enthält, wie MS-Analyse zeigte, überstreicht eine Fläche von 88.3 % der gesamten Fläche, der peptidischen Peaks zugeordnet sind. Die restlichen Terminationssequenzen überstreichen 4.4 % (Bz-IGPGRAF-Linker) und

7.3 % (Naph-IHIGPGRAF-Linker). Die o.g. Integration nimmt gleiche molare Extinktionskoeffizienten aller Peptide an<sup>33</sup>.

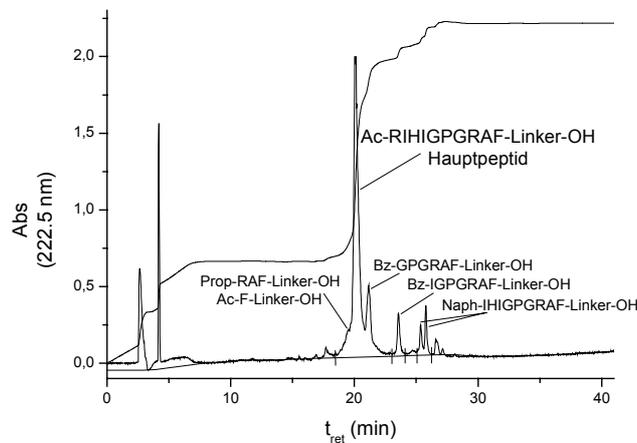


Abb. 6.5: HPLC-Chromatogramm der Peptidmischung eines Decapeptids und seiner zugehörigen codierenden Untersequenzen. Die Säulenbedingungen, die diese Mischung bestmöglich trennten, waren: Ein Gradient (0 – 100 %) wässriges Acetonitril über 50 min, Säule: Eurospher RP 18, 4\*250  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ; Detektion bei 222.5 nm. Die peptidische Region des Chromatogramms umfasst die Retentionszeiten von 18 bis 26 min.

Eine genauere Näherung basiert auf einer Abschätzung der UV-Extinktionskoeffizienten der Peptidbindungen<sup>22</sup> in den Peptiden unterschiedlicher Länge und der Naphtoylgruppe, die in einem gecappten Peptid vorhanden ist. Die Extinktionskoeffizienten ergeben sich additiv aus den Einzelbeiträgen der genannten chemischen Gruppierungen und sind mit den erwarteten Mengenverhältnissen zwischen Haupt- und Terminationspeptiden (77 % bzw. je etwa 5 %) gewichtet. Das Ergebnis der Analyse ändert sich nicht wesentlich: Legt man die letztgenannte Annahme zugrunde, sollte der Hauptpeak (mit insgesamt vier Peptiden) 81.1 % der Gesamtfläche überstreichen. Dem Peak, der das Peptid Bz-IGPGRAF-Linker enthält, kommen 3.3 % der Gesamtfläche, dem Peak, der das Peptid Naph-IHIGPGRAF-Linker enthält, 15.6 % der Gesamtfläche zu. Diese Werte liegen alle innerhalb des erwarteten Toleranzintervalls einer solchen Abschätzung (ca. 10 %)<sup>33</sup>. Neben den genannten sind bei der betrachteten Wellenlänge (222.5 nm) keine weiteren funktionalen Gruppen der Peptide UV-aktiv.

**Anwendung der Methode des adaptiven Capping auf eine biologisch relevante Bibliothek.** Nach erfolgreicher Etablierung obiger Methode wurde dieses Konzept nun auf eine biologisch relevante Decapeptidbibliothek mit 432000 Peptiden angewandt. Sie ist der V3-Schleife des viralen HIV-1-Hüllproteins gp120 entnommen<sup>23</sup>. Die V3-Schleife ist einer der immunodominanten Regionen von HIV-1<sup>24-27</sup>. Die Decapeptidbibliothek ist in Tab. 6.6 wiedergegeben.

Aminosäurepositionen									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G	I <sup>3</sup>	H	I <sup>2</sup>	A <sup>1</sup>	F	G	G <sup>1</sup>	A	F <sup>1</sup>
R	L <sup>1</sup>	N	L <sup>1</sup>	G <sup>2</sup>	L		K <sup>1</sup>	R	I <sup>1</sup>
S	V <sup>2</sup>	P	M <sup>1</sup>		P		Q <sup>2</sup>	S	L <sup>2</sup>
		Q	V <sup>1</sup>		Q		R <sup>4</sup>	T	V <sup>1</sup>
		R			W		S <sup>2</sup>	V	W <sup>1</sup>
		S							Y <sup>1</sup>
		T							
		Y							

Tab. 6.6: Decapeptidbibliothekschema mit 432000 Spezies, der V3-Schleife des HIV-1-Subtyps B entnommen. Der N-Terminus ist acetyliert,  $\beta$ APPPR $\beta$ A wurde als Linker eingesetzt. Die von Biblio vorhergesagten Cappingpositionen sind als hochgestellte Indices angegeben. Die Übersetzung in N-terminale Schutzgruppen ist in Tabelle 6.2 aufgeführt.

Sie deckt die genetische Vielfalt des HIV-1-Subtyps B ab, der der am höchsten divergente aller HIV-1-Subtypen ist. Da speziell die Spitze der V3-Schleife gegen lineare Peptide antigen wirkt,<sup>22-29</sup> wurden diese Sequenzen in der Bibliothek variiert. Wie oben beschrieben, wurde das sequenzcodierende Muster durch *Biblio* berechnet. Fünf Terminationsschritte waren notwendig. Zwei Beads wurden willkürlich ausgewählt. Wie in den Abb. 6.6a und 6.6b gezeigt, werden alle sechs erwarteten Peptide, fünf Terminationssequenzen und eine Hauptsequenz, beobachtet. *Biblio* ermittelte schließlich die in den Abbildungen dargestellten Decapeptidsequenzen.

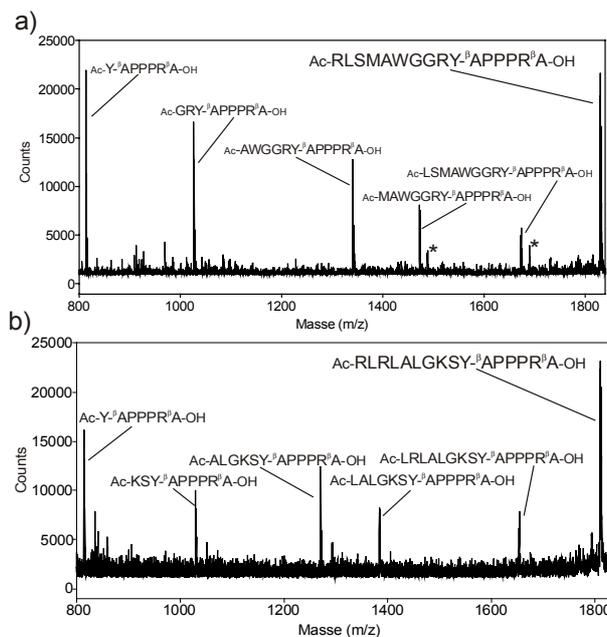


Abb. 6.6: MALDI-Massenspektren der Decapeptidsequenzen a) Ac-RLSMAWGGRY und b) Ac-RLRLALGKSY und deren zugehörige Terminationssequenzen. Die mit einem Stern markierten Peaks sind Nebenprodukte der Methioninoxidation.

## Schlussfolgerungen

Die hier beschriebene Methode adaptiven Cappings ist eine Weiterentwicklung des ursprünglich von Youngquist und Keough eingeführten Konzepts<sup>16</sup>. Es erlaubt eine schnelle, unkomplizierte und eindeutige Identifikation individueller Sequenzen einer Peptidbibliothek mittels MALDI-Massenspektroskopie ohne Bedarf aufwändiger Instrumentation. Wir konnten an Hand einer Penta-, Hepta- und Decapeptidbibliothek zeigen, dass sich die massenspektrometrische Decodierung als zuverlässig erwiesen hat. 99.7 % aller Beads einer Heptapeptidbibliothek wurden erfolgreich sequenziert. Das Programm *Biblio* berechnet ein Cappingmuster mit minimalem Einsatz an Cappingreagenzien und einer minimierten Anzahl an Cappingsschritten in Abhängigkeit der erwarteten Massenauflösung der Massenspektroskopie. Der Einsatz von Mischungen aus Fmoc- und permanent geschützten Aminosäuren anstelle von Acylierungsreagenzien erlaubte die zuverlässige niedrigprozentuale Einführung von Terminationssequenzen und reduzierte die Anzahl synthetischer Schritte. Der optimierte Anteil dieser Terminationssequenzen und deren maximale Ähnlichkeit mit dem Hauptpeptid stellt sicher, dass die Ergebnisse der biologischen Tests nicht verfälscht werden. Die Cappingpeptide sind, wie mittels HPLC nachgewiesen wurde, zu je etwa 5 % auf dem Bead vorhanden. Das Hauptpeptid bildet klar die Hauptfraktion. In unseren Synthesen traten Nebenprodukte nur in geringer Häufigkeit auf und vermochten die Decodierung einer Sequenz nicht zu stören. Die Anwendbarkeit unserer Methode des adaptiven Cappings konnte für Peptidbibliotheken bis 432000 Spezies demonstriert werden. Die Sequenzierung mittels MALDI-MS ist günstiger als der Kettenabbau nach Edman und benötigt keine zusätzlichen codierenden Reportermoleküle auf dem Bead, die etwa für eine GC-MS-Analyse erforderlich sind.

[**Experimentelle Daten.** Diese sind im Anhang der vorliegenden Arbeit aufgeführt.]

Die Literaturverweise des Kapitels 6 sind als Anhang des in Kapitel 7 gegebenen Manuskripts aufgeführt.



**7      Manuskript der Veröffentlichung über die  
         massenspektrometrische Analyse kombinatorischer  
         Peptidbibliotheken**

**Mass spectrometric Sequencing of individual Peptides from Combinatorial  
Libraries via specific Generation of chain-terminated Sequences**

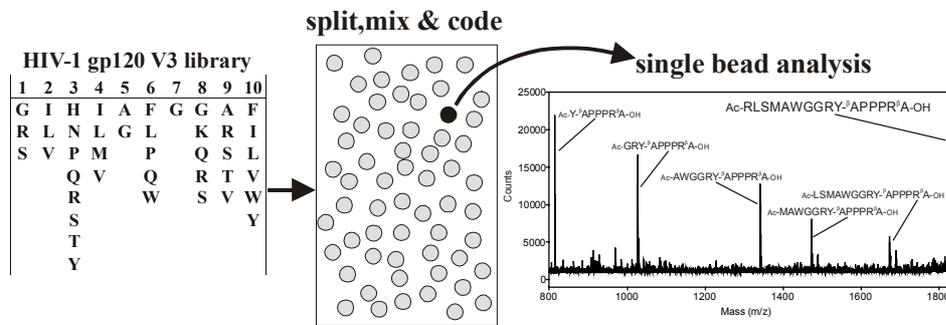
**Christian Hoffmann, Dierk Blechschmidt, Ralf Krüger<sup>‡</sup>, Michael Karas<sup>‡</sup>, and  
Christian Griesinger<sup>\*</sup>**

*Contribution from the Institute of Organic Chemistry, University of Frankfurt, Marie-Curie-  
Strasse 11, D-60439 Frankfurt am Main, Germany, and the Max-Planck-Institute for  
Biophysical Chemistry, Am Fassberg 11, 37077 Göttingen, Germany*

<sup>‡</sup> Division of Instrumental Analytical Chemistry, University of Frankfurt, Marie-Curie-  
Strasse 9, 60439 Frankfurt am Main

\*to whom correspondence should be addressed, e-mail: [cigr@mpibpc.gwdg.de](mailto:cigr@mpibpc.gwdg.de)

Graphical Abstract



**Abstract:** Combinatorial peptide libraries are a versatile tool for drug discovery. On-bead assays identify reactive peptides by enzyme-catalyzed staining and, usually, sequencing by Edman degradation. Unfortunately, the latter method is expensive, time - consuming and requires free N-termini of the peptides.

A method of rapid and unambiguous peptide sequencing by utilizing synthesis-implemented generation of termination sequences with subsequent matrix assisted laser desorption ionization – time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometric analysis, is introduced here.

The required capped sequences are determined and optimized for a specific peptide library by a computer algorithm implemented in the program *Biblio*. 99.7 % of the sequences of a heptapeptide library sample could be decoded utilizing a single bead for each spectrum. In order to synthesize these libraries an optimized capping approach has been introduced.

## Introduction

Solid-phase combinatorial peptide libraries are important since their first applications<sup>1,2</sup> in the early 1990s in lead substance determination and drug discovery.<sup>3</sup> Peptide ligands to a monoclonal antibody against  $\beta$ -Endorphin<sup>1</sup> and to GPIIb/IIIa<sup>2</sup> were the first examples using screening techniques in combination with peptide libraries. The broad versatility of the application of resin-bound peptide libraries has been put into evidence by the determination of substrate specificity for peptide deformylase<sup>4</sup>, or the confirmation of cross-reactivity between Lyme antibody H9724 and human heat shock protein 60 by epitope mapping<sup>5,6</sup>. Some essential strategies for a successful setup of combinatorial peptide libraries have been discussed by Chu et al.<sup>7</sup>, such as finding the minimal number of amino acids necessary for antibody recognition or optimizing the linker construct between bead matrix and functional peptide

In addition, the concept of solid-phase based biological screening has been extended to other solid-phase library types, such as benzodiazepine<sup>8</sup>, glycopeptide<sup>9</sup>, peptide mimetics, peptide nucleic acids (PNA) or oligocarbamate libraries.<sup>3</sup>

For all peptide libraries synthesized on solid phase, the sequence of a peptide on a specific bead needs to be derived after selection for a specific binding affinity or biological response. One way is Edman degradation, which can be done on commercially available instrumentation. However, free N-termini of the peptides are required, the technique is rather expensive and time-consuming. Therefore, methods for coding of the libraries have been developed, resulting in quick and unambiguous identification of an individual sequence.

One can distinguish three major coding strategies, positional, chemical and, more sophisticated, electronic encoding.<sup>10</sup> Positional encoding was one of the first applications of this approach, realized by pin synthesis<sup>11</sup> of peptide libraries; today's most frequent application is the "DNA chip technology". Chemical encoding is usually carried out by tagging the individual members of the library, either with nucleic acids<sup>12</sup> or, more robust, small organic molecules.<sup>13</sup> Finally, electronic encoding is accomplished by utilisation of a radiofrequency memory tag.<sup>14</sup> A reaction platform containing a rf chip therefore is tagged in a machine-readable fashion.<sup>10</sup>

Chemical encoding with small molecular tags is most frequently used for the construction and synthesis of combinatorial libraries. However, the chemical synthesis of a library can be complicated due to the necessity to perform the synthesis of the coding tags.<sup>15</sup>

While libraries with millions of members have been reported in the literature<sup>13</sup>, most libraries using chemical tagging did not exceed several thousands of members<sup>12,15</sup>. Lastly, the chemical coding provides only indirect information about the coded compound of the library, its identity and purity need to be determined by different means.

The method we describe here advances a concept originally proposed by Youngquist and Keough.<sup>16</sup> It enables the determination of a peptide sequence, which was identified as biologically active, simply by cleaving the peptide off the bead and recording a mass spectrum.

This approach comprises the following steps: A combinatorial peptide library usually is synthesized by the “split, mix and combine” method by Furka<sup>17</sup>, and Lam.<sup>1</sup> The resin quantity is split up into  $m$  portions, where  $m$  is the number of amino acids at the mentioned library position. The amino acids are coupled to the resin; then the whole quantity is pooled and thoroughly mixed. After removal of the N-terminal protecting group, the reaction cycle is reiterated, and finally one distinct peptide per single bead is provided. In order to distinguish between the various peptides in the library, barring isobaric amino acids and multiple sequence similarities, sequences that are capped at specific positions are introduced during the synthesis of the library. In addition to the desired peptide sequence each bead then contains also a set of capped sequences. Synthesis is performed by using mixtures of the desired Fmoc-protected amino acid and its permanently N-terminally blocked derivative, for instance with an acetyl or benzoyl group.

The amount of the capping reagents is five percent with respect to the whole resin occupancy. This is achieved due to the equal coupling kinetics of the Fmoc protected amino acid as the capped amino acid in the coupling reaction (data not shown). As shown later, 5% of each capped sequence is sufficient for mass spectrometric analysis and renders the desired peptide to be the main component on the bead, due to this optimized capping scheme. Furthermore, our approach utilizing amino acid derivative mixtures makes capping applicable and manageable for large combinatorial peptide libraries up to several thousand members.

In contrast to the original approach<sup>16</sup> with fixed capping steps and capping reagents, we use an adaptive capping strategy, that allows to minimize the necessary number of capping positions and quantity of capped sequences. Moreover, the limited diversity of a library synthesized with a “fixed capping” strategy is overcome by the adapted capping that we propose. As the capped peptides are as close in structure to the main peptide as possible it is unlikely that the capped peptides exhibit biological activity that is different from the main peptide.

Our approach, implemented in the program *Biblio*, optimizes the capping pattern for a given library with respect to the number of capping steps, e.g. even in large libraries, not every amino acid position has to be capped. Nevertheless, for every position of any peptide of the library any amino acid can be chosen and later be decoded.

Thus, our approach solves the problem of isobaric amino acids and sequence similarities occurring in large libraries. Previous approaches to solve the problem of isobaric masses included the use of halogenation<sup>18</sup> or incorporation of isotopes.<sup>19</sup> In the chemical encoding approach, isobaric masses are no problem. In our approach, the diversity of peptide libraries to be synthesized is not restricted. As shown below by means of a model peptide sequence, the quantity of the main sequence is maximized.

## Results and Discussion

### The algorithm of *Biblio*.

*Biblio* fulfills two tasks. In a first step, it suggests for a given peptide library the optimal capping pattern for mass spectrometric analysis and in a second step translates a set of mass peaks into the most probable peptide sequence from the given library. For the first step, the algorithm used relies on the fact that every peptide in a specific library is described by its unique set of masses brought about by the capping procedure. One mass in the set is given by the mass of the full-length peptide. The other masses depend on the peptide sequence and the capping pattern of the library. The determination of that pattern with a minimal number of capping steps, namely the coding of the library, is suggested by *Biblio* and is illustrated with the library given in Figure 1. First the possible masses of the mono-peptides, i.e. for the C-terminal amino acids are calculated and compared. In case of isobaric amino acids, capping would be necessary already in the first step. If not, as it is the case here, the second amino acid position is added to the calculation. The masses of the possible di-peptides (AH, AL, SG, SH, ...) are calculated and compared. These steps are repeated until similar or identical masses are found. Two masses are similar or identical if they deviate by less than  $\pm 1$  Da. After the 3rd amino acid positions there are similar masses in the library (Figure 1, top). E.g. the tri-peptides with the sequences GXS and SXG have identical masses (X is any amino acid at position 2). Therefore capping is necessary. The correct pattern of capping reagents at the given amino acid position, is determined by permutation of the given set of capping reagents summarized in Table 3. A correct capping pattern will render the masses of all members of

the library different up to step 3. Since all amino acids at position 3 in the library of Figure 1 are capped, the library is determined unambiguously to that point. Thus this part of the library can be excluded from further considerations when continuing the synthesis. Starting with the 4th position, masses of the mono-peptides (I, K, R) are calculated and compared. No similarities are found. Subsequently the 5th position is added. The masses of the possible di-peptides (II, IL, IG, IP, KI, KL, ...) are calculated and compared. Peptides with identical masses are found since L and I have the same masses. After determining the capping pattern, the library is unambiguously determined up to 5th amino acid position. In that sample library the 6th position contains a single G, only, so the calculation is finished (Figure 1, bottom) and the hexapeptide library requires only two capping steps for unambiguous analysis, i.e. complete coding and decoding. Every full-length (and every non-full length) peptide sequence is described by its unique set of masses. This algorithm keeps some redundancies and does not always lead to the theoretical minimum number of capping steps, since all amino acids at a specific position are always capped. E.g., in the sample library, capping of G and P at the 5th position is not necessary for coding the library unambiguously. However, incomplete capping of amino acid positions would prevent from breaking the whole library in subgroups, which would in turn require more computational time to analyse larger libraries. Thus the proposed adaptive coding scheme is slightly redundant. This ensures that the method tolerates errors of masses in the mass spectroscopic analysis and even sometimes missing peaks.

Decoding of the library is also done with the help of the program *Biblio* by comparing a given set of masses (from the mass spectrometric analysis) with all the masses the coded library can produce. For every mass the probability of a specific sequence is generated by comparing the observed masses with the theoretically predicted mass pattern. The matching of the masses is measured by a quality factor Q that is defined in the following way. Q equals 1, 0.8, and 0.3 if an experimentally determined mass matches a calculated mass within  $\pm 1$ ,  $\pm 2$  and  $\pm 3$  Da, respectively. If the mass deviation is bigger than  $\pm 3$  Da, the quality factor is 0. The sequence rendering the highest sum of quality factors is assumed to be the correct result. Sequence determination using this parametrical approach was found to be robust against artifacts; even if there are more mass peaks present in the spectrum (e.g. those arising from artifacts), the correct mass is determined. The lower quality factors 0.8 and 0.3 are introduced to take smaller random measurement errors into account.

Construction of encoded solid phase combinatorial libraries. The combinatorial peptide libraries have been synthesized on TentaGel S HMB-resin by the “Split, Mix and Combine”

method<sup>17</sup> using standard Fmoc chemistry.<sup>20</sup> Capped amino acids in the library are introduced by application of mixtures of Fmoc-protected amino acid and their permanently blocked (“capped”) derivative to an amount of five percent. Capping is only performed at positions suggested by *Biblio*. A peptide linker,  $\beta$ Ala-Pro-Pro-Pro-Arg- $\beta$ Ala, between the HMB resin and the functional amino acid sequence was introduced for the following reasons: First, a spacer enlarges the distance between HMB resin and peptide sequence, increases its mobility, enhances the peptide yield and availability for the biological target. We proved our spacer as being biologically inert by on-bead screening with a HIV-positive serum and visualizing the results with BCIP/NBT staining<sup>16</sup>. No differences to negative control experiments have been observed. It is known, that short peptidic linkers containing proline, arginine and  $\beta$ alanine do not interfere with biological screening results<sup>5,7,16</sup>. Second, for matrix assisted laser desorption / ionization mass spectrometric (MALDI-MS) measurements, a “charged anchor” that can easily be protonated is beneficial for a uniform ionization behaviour of all involved peptides and, eventually, enhanced spectrum quality. Therefore, we use arginine with its guanidine group as “charged anchor”.<sup>32</sup> Third, a uniform cleavage off the bead is achieved by inserting  $\beta$ alanine at the C-terminus and using weak aqueous base. This allows us to abandon the BrCN cleavage of C-terminal methionine used earlier.<sup>16</sup> As we use TentaGel S (hydroxymethylbenzoic acid) HMB-resin, the peptide is covalently attached to the bead via an ester bond, providing a greater oxidation resistance with respect to the aggressive side chain deprotection conditions than the relatively labile methionine residue. Standard cleavage conditions from the TentaGel resin would be incubation with 1 N aqueous NaOH. However, as single-bead measurements are to be performed, the residual alkali ion content is incompatible with MALDI ionization. For this reason, we cleaved the peptides off via in-situ generation of hydroxyl ions by incubating a bead with a solution of 10 % aqueous triethylamine overnight. The linker is big enough to increase the mass of even the smallest capped peptide above 600 Da. Therefore, disturbances from the matrix signals in the MALDI mass spectrum even at femtomolar ( $10^{-15}$  molar) abundance of the desired peptide are prevented.

**MALDI sequencing of selective beads of two model libraries.** The first model library is a pentapeptide library with 144 different species, as denoted in Table 1. The linker used here is  $\beta$ Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Met. The N-terminus of every full-length peptide of this library is a free amine. Before synthesis, *Biblio* was fed with the library data: number of amino acid positions, desired amino acids in each position and selection of a mass variance interval. The

program then suggested only two capping steps (at positions 2 and 5) requiring a mass measurement accuracy of  $\pm 1$  Da for each MALDI signal. It uses acetyl, benzoyl, 2-naphtoyl and propionyl as capping agents (Table 2). If a fixed capping strategy had been used, five capping steps would have been necessary.

Several beads have been picked with a needle. After cleaving the peptide off the bead, the peptides of individual beads were analyzed by MALDI mass spectrometry. A typical spectrum is shown in Figure 2a.

Two signals of the capping peptides and one of the main peptide had to be expected and are indeed observed with an excellent signal-to-noise ratio. Due to the variable capping reagents the sequence cannot directly be read out from the spectrum. The three observed masses were fed to *Biblio*, which unambiguously determined Ala-Ile-Leu-Phe-Ile as the sequence of the peptide. The peak multiplicity arising from isotopic resolution in the peptide signals is discussed later. Due to the use of methionine in the linker, artifacts of methionine oxidation byproducts are observed. Another artifact is emerging in all pentapeptide library mass spectra. A peak with a mass difference of + 26 Da with respect to the main peptide of the spectrum occurs with significant signal intensity. Unfortunately, the origin of this peak, probably an N-terminal modification of the main peptide, remains unresolved; neither MALDI time-of-flight post source decay (PSD) fragmentation analysis<sup>21</sup> nor Nano-Electrospray Ionization (ESI) mass spectrometry spectra recorded in addition provided conclusive data.

In order to expand the diversity of the library, a heptapeptide library (Table 3) consisting of 5184 sequences was synthesized after calculating the optimal capping pattern with *Biblio*. Only three positions of this library instead of seven had to be capped (positions 2, 4, and 7 in Table 2), requiring again a mass measurement accuracy of  $\pm 1$  Da. The linker used from now on is  $^{\beta}$ Ala-Pro-Pro-Pro-Arg- $^{\beta}$ Ala, avoiding the difficulties of methionine oxidation. Acetylation of the N-terminus of the main peptide prevented the occurrence of artifact peaks related to the major signal. Typical spectra are shown in Figure 2b and Figure 2c. Four signals are expected, three coding peptides and the main sequence. The detected signals in Figure 2b, for instance, are assigned with the corresponding peptide sequence revealed by *Biblio*: the peaks corresponding to the protonated main peptide show up at  $m/z = 1401.5$  (Ac-KLHGAFP-Linker), the capped peptides at 1335.4 (Bz-LHGAFP-Linker), 1085.1 (Bz-FP-Linker) and 747.8 (Ac-P-Linker). Figure 2c shows decoding of another peptide from a single bead:  $m/z = 1499.2$  for the main peptide Ac-KVLFYTP-Linker, and 1370.9 (Ac-VLFYTP-Linker), 1220.8 (Bz-FYTP-Linker), and 747.5 (Ac-P-Linker) for the capped peptides,

respectively. In both spectra, the main peptide is found to be the most intense signal. Nevertheless, MALDI mass spectrometry does not allow a quantitative analysis of peak intensities; therefore, the molar ratio of main to capped peptides has to be evaluated separately as shown later.

All recorded spectra display an excellent signal-to-noise ratio and resolution to the monoisotopic masses (Figure 3).

Undesired chain-terminated sequences, incomplete cleavage of side-chain protection groups or sequences with missing amino acids are an important problem in peptide synthesis. These byproducts could prevent the decoding process since the signal of such peptides could only be distinguished from the desired capped peptides based on their molar ratio. Only few byproducts appeared in our libraries and are summarized in Table 4. Major peaks arise from adducts of the peptide with sodium or potassium. These signals mainly appeared together with the full-length peptide due to the fact, that it has the highest abundance. Furthermore, desacetylation of the main peptide is observed as a well-known side reaction during side-chain deprotection.

Incidentally, a signal 42 Da heavier than the unmodified peptide occurs due to a second acetylation site in the peptide (not shown here). Under the acetylation conditions used (10 eq acetic anhydride, 50 eq triethylamine, 2 h) the guanidine terminus of arginine is additionally acetylated<sup>34</sup>, even though it is protected because of the requirements of peptide synthesis.

**Statistical evaluation of 299 heptapeptide library probes.** To assure the quality of the coding scheme computed by *Biblio*, and to show the reliability of the single-bead decoding and sequencing concept, 300 beads of the heptapeptide library have been picked and the peptides have been analyzed by MALDI mass spectrometry. 299 of the 300 beads could be sequenced successfully: in any case, the desired three plus one signals (three capped peptides plus one main peptide) was observed. Moreover, all spectra could be assigned to a single peptide sequence, unambiguously resolved by *Biblio*. This is a hit rate of about 99.7 percent. One bead revealed only one signal of low mass, which could not be related to any full-length peptide, but rather to a termination sequence, Bz-GLFI-Linker. This sequence is coding for 48 various full-length peptide sequences of the library. Thus, the true sequence of this full-length peptide could not be determined. As shown in Table 5, 249 individual sequences have been identified, overall. Thereof 206 appeared only once. The sequences occurring more than twice are denoted individually.

For statistical analysis of the sequenced peptides we looked for the occurrence of the amino acids used in each position and for the independence of occurrence of these amino acids in these positions. The occurrence of the amino acids in each position should depend on the fractions taken for each coupling step. These fractions were rather equal except for one amino acid in each synthetic step which was applied to the so called reserve batch. The reserve batch contained between 47 and 73 % of the whole resin as was observed from the occurrence of the respective amino acid.

Whether the occurrence of specific amino acids is correlated in different positions was tested as well. Chi squared tests of independence were performed for each pair of amino acid positions (21 tests in all). Two of these pairs showed significant dependence at the level of  $p = 0.01$ : positions 1 and 6, and positions 5 and 6. The other 19 tests did not reveal significant dependence neither at the 0.01 nor the 0.05 level.

As a second test of independence of the amino acid occurrence in the different peptide positions, the number of sequences found to be present  $k$  times ( $k = 1,2,3\dots$ ) in the experimental sample of 299 beads was compared with that of a computer experiment in which the computer drew 100000 times the 299 samples from the library of beads assuming the experimental a priori probabilities for the amino acids in each position and independence of each position. The number of sequences present only once ( $k = 1$ ) was strikingly higher in the *in silico* drawings than in the actual sample: in only 59 of 100 000 permutations there were as few of these as actually observed. Figure 4 compares the predicted multiplicity distribution by this means with the experimentally determined distribution indicating the variance. The experimental probe result lies within  $3\sigma$  of the *in silico* probe.

It thus appears that, for reasons as yet unknown, the amino acids in the positions are not independent. Though clearly detectable, this effect appears much less important in disturbing the desired equal distribution of sequences than the nonuniformity of amino acids in the individual positions. For further experiments, the fraction of the reserve position has to be minimized and in experiments yet to be published we obtained a more homogenous distribution of peptide sequences.

**Estimation of main peptide / capping peptides ratio by HPLC.** For testing in biological systems, it is desirable to keep the amount of main peptide on a bead maximal. Since MALDI-TOF MS is not a quantitative method, the yield of main peptide versus capped sequences had to be established by another method. Therefore, we synthesized the N-terminally acetylated peptide Ac-RIHIGPGRAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A and its capping peptides

manually on a larger amount of resin (50 mg) in order to quantify the peptide sequences by HPLC. The main peptide is a sequence found in the V3-region of the HIV-1 clade B gp120 envelope protein.<sup>23</sup> Details and use of the library are described later in the text. This peptide and five capped truncated versions were synthesized, as described above, using 5 % of capping reagent. Thus, the following peptides were present:

main peptide	Ac-RIHIGPGRAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A
capping peptides	Naph-IHIGPGRAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A Bz-IGPGRAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A Bz-GPGRAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A Prop-RAF- $\beta$ APPPR $\beta$ A Ac-F- $\beta$ APPPR $\beta$ A.

As five termination sequences are divergently synthesized to an individual amount of five percent, the relative yield of the main peptide should be  $(0.95)^5 \approx 77\%$  as opposed to 5 % of each capped peptide. This is checked by HPLC that provides a good estimation of peptide amounts.<sup>33</sup>

The chromatogram resolving the peptide mixture best is shown in Figure 5. The peak containing the main peptide and unresolved three capping peptides, as revealed by MS, has an integral of 88.3 %, the residual capping peptides have an integral of 4.4 % (Bz-IGPGRAF-Linker) and 7.3 % (Naph-IHIGPGRAF-Linker), respectively. The integration assumes equal molar UV extinction of all peptides.<sup>33</sup> A more sophisticated analysis based on estimation of the UV extinctions of each peptide bond<sup>22</sup> and of the Naphtoyl group present in one capped peptide does not change this result appreciably: Based on this latter estimation, the expected area of the main peak (main peptide plus three termination sequences) is 81.1 % of the total peak area. Additionally, the HPLC peak containing Bz-IGPGRAF-Linker is calculated to cover 3.3 % of the total area of peptidic HPLC peaks; finally, the peak containing Naph-IHIGPGRAF-Linker is estimated to cover 15.6 % of the total area of the peptidic HPLC peaks. These values all are within the expected tolerance interval of such an peak area estimation (about 10 %).<sup>33</sup> No other functional groups in the peptides show up as UV active at the considered wavelength (222.5 nm).

**Application of the “adapted capping” method to a biologically relevant decapeptide library.** After establishing the method introduced above, the concept is applied to a biologically relevant decapeptide library with 432 000 peptides derived from the V3-loop that is part of the viral envelope protein gp120 of HIV-1 and is one of its immunodominant regions<sup>24-27</sup>. The decapeptide library is summarized in Table 6. It is derived from HIV-1 gp120 sequence data.<sup>23</sup> This library covers the variety of HIV-1 clade B, which is the most divergent of all known HIV clades. As especially the tip of the V3-loop is known to be antigenic to linear peptides<sup>24-29</sup>, these sequence positions have been varied in the library. The sequence-coding pattern has been computed using *Biblio* as described above, suggesting five capping positions. Two beads have been picked. As demonstrated in Figure 6a and Figure 6b, all six anticipated peptides, the main peptide plus five capping peptides, have been observed for the two beads successfully decoded with mass spectrometry. *Biblio* unambiguously determined the decapeptide sequences as denoted in the Figures. We have in the meantime applied the approach to another decapeptide library with 80640 members and have found 37 biologically active peptides of which we could sequence 36.

### Conclusions

The modified capping method we describe here is a development of the concept originally presented by Youngquist and Keough.<sup>16</sup> It allows a quick, straightforward, and unambiguous identification of individual sequences of a peptide library by well-established MALDI mass spectroscopy without need for special instrumentation. We showed on a penta-, hepta- and decapeptide library that the decoding by mass spectroscopy was reliable. 99.7 % of the beads in a heptapeptide library sample were successfully analyzed. The program *Biblio*, which is accessible, suggests a capping pattern with minimal use of capping reagents and a minimized number of capping steps depending on the number of used capping reagents and the expected resolution of the mass spectrometry. Using mixtures of Fmoc and acetylated amino acids instead of using acylation agents allowed reliable percentages of capped sequences and reduced the number of synthetic steps. The optimized ratio of the capping sequences as compared to and their maximal identity with the main peptide makes sure, that the results of biological tests are not flawed by introduction of the capped peptides. As revealed by HPLC, the capping peptides have an abundance of approx. 5 % and the desired peptide makes up for the remainder. In our syntheses, byproducts occurred only with low yield and never disturbed the decoding. The applicability of our adapted capping method has been demonstrated for peptide libraries up to 432 000 members. The MALDI MS sequencing

is cheaper than the Edman degradation and does not have to resort to additional molecules on the bead for encoding as used for GC-MS.

### Experimental Section

**Peptide Synthesis.** Materials and Methods. Peptide and peptide libraries have been synthesized manually by standard Fmoc chemistry<sup>20</sup> using *N*-hydroxybenzotriazole and *N,N'*-diisopropylcarbodiimide as activation agents. The optimum coupling time was found to be four hours. TentaGel S HMB (hydroxymethylbenzoic acid) resin, bead diameter 90  $\mu\text{m}$ , was provided by Rapp Polymere GmbH, Tübingen. N-Terminal acetylation was performed by using 10 eq acetic anhydride and 50 eq triethylamine (1 mL per 100 mg peptidyl resin) for two hours.<sup>34</sup> Where special amino acid derivatives were needed, they have been prepared according to literature protocols<sup>30</sup> or by simply modifying them attached to the solid phase; 2-Chlorotriethylchloride resin (Calbiochem Novabiochem, Läuelfingen, Switzerland) was used. HPLC<sup>33</sup> was performed on a Merck-Hitachi L-6200 system with a L-3000 diode array detector and a Eurospher RP 18, 4 $\times$ 250 mm, 5 $\mu\text{m}$ , 100 $\text{\AA}$  C18 column. Solvent A was 0.1 % TFA in water, solvent B was 0.1 % TFA in acetonitrile. The gradient was 0 – 100 % B over 50 min. TFA was purchased from Acros Organics (Geel, Belgium), Solvents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and were used without further purification. Fmoc amino acid derivatives were purchased from Calbiochem Novabiochem (Läuelfingen, Switzerland). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI).

**Synthesis of peptide libraries.** TentaGel S HMB (hydroxymethylbenzoic acid) resin, bead diameter 90  $\mu\text{m}$ , capacity 0.26 mmol/g) was used as solid phase. The pentamer and the heptamer libraries were calculated for the use of 400 mg resin, the decapeptide library was calculated for the use of 650 mg resin. In all libraries, an excess of about one third of the calculated resin mass was additionally used due to an expected loss of resin during the various splitting and mixing steps. First, a hexapeptide linker was attached to the resin: the resin was occupied with  $\beta$ alanine as described.<sup>31</sup> Then the remaining five amino acids have been attached, resulting in  $\beta\text{Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-}\beta\text{Ala}$  as linker construct. Library diversity was introduced by Furka's and Lam's "one bead one peptide" approach.<sup>1,17</sup> The bead quantity was divided in *m* portions, whereas *m* is the number of desired amino acids per library position. In order to introduce capped amino acids during library synthesis, a mixture of Fmoc protected amino acid and individually capped amino acid derivative, as predicted by *Biblio*, was used. The amount of capped amino acid was five percent with regard to the corresponding resin loading. To assure manageable quantities of both capped and Fmoc protected derivative, a

12-fold excess of amino acid was used (with 13.2 eq *N,N'*-diisopropylcarbodiimide and 18 eq *N*-hydroxybenzotriazole). The N-terminal protecting group (Fmoc) was removed with 40 % Piperidine in DMF for 20 minutes, repeated three times, thoroughly washing and subsequently performance of the next cycle. This process was repeated until the peptide sequence was finished. After intense resin washing, the library was acetylated as described above. Then the side chain protection groups were cleaved in 4 hours by using 1 mL of the following mixture per 100 mg resin: 10 mL TFA, 750 mg phenol, 500  $\mu$ L of mercaptoacetic acid, 500  $\mu$ L of thioanisole, and 500  $\mu$ L of water. Thereafter the resin was washed with 90 % aqueous TFA, 10 % triethylamine in DMF, several times with DMF, and finally twice with diethyl ether. The resin is stored at 4 °C.

**MALDI sample preparation.** Individual beads were picked randomly with a thin steel needle, and placed into an Eppendorf cap containing a solution of 10 % (v/v) of triethylamine in water. The cleaving reaction was run at room temperature overnight. A 1  $\mu$ L aliquot of the reaction mixture was pipetted onto the sample plate and dried in a cold airflow. Then 1  $\mu$ L of a solution of 0.1 mol/L dihydroxy benzoic acid (DHB) in 30 % aqueous acetonitrile containing 0.1% TFA was dropped onto this sample and dried in a cold airflow. In all cases, spicular crystals have been obtained.

**Mass spectrometry.** The MALDI mass spectra<sup>29</sup> were recorded on a PE Biosystems (Foster City, CA) Voyager DE Pro time-of-flight mass spectrometer. All data were acquired in the positive ion reflector mode with delayed extraction at a delay time of 70 ns. For each spectrum, 128 laser pulses have been accumulated. A mixture of Angiotensin I and III ( $10^{-5}$  molar each) has been used for external calibration. Since the identification of peptide sequence is based on specific capping resulting in large mass differences one-time external calibration (for a whole series of experiments) was sufficient resulting in a mass accuracy of  $\pm 1$  Da. Spectra were typically recorded at a mass resolution of about 2500 (FWHM), again tuning of the instrument to better resolution values was not necessary.

**Acknowledgment.** This work was supported by the Fonds der Chemischen Industrie, the DFG and the MPG. We thank U. Dietrich for collaborating on the HIV library and J.B. Ferebee for help with the statistical analysis of the heptapeptide library.

**Fig. 1.** Different steps of coding a sample peptide library using the algorithm in *Biblio*. The peptide is synthesized on a linker bound to a resin. The first capping position is amino acid 4 since identical masses occur, e.g. for the sequences SGG and GGS. Capping with different capping reagents denoted by A and B resolves this ambiguity. The next capping is done at position 2 since the dipeptides IL and II are isobaric. For this library two capping steps are sufficient.

**Fig. 2.** a) MALDI mass spectrum of the coded pentapeptide AILFI and its associated two coding subsequences. Since methionine is used for the linker, additional peaks resulting from methionine oxidation are observed. b) MALDI mass spectrum of the heptapeptide KLHGAFP and its three coding peptides. The assignment of the peaks was calculated using *Biblio*. c) MALDI mass spectrum of the peptide KVLFYTP and its three coding peptides. The assignment of the peaks was also calculated using *Biblio*. Major byproduct is a peak resulting of a deacetylation of the main peptide.

**Fig. 3.** Experimentally found isotopic pattern of Ac-P- $\beta$ APPPR $\beta$ A-OH. Based on the assumption of 90 picomoles per single bead, this spectrum was recorded with an amount of 100 femtomoles (1 femtomole =  $10^{-15}$  moles).

**Fig. 4.** Experimentally determined distribution of 299 decoded peptides from the heptapeptide library with respect to their occurrence multiplicity (denoted in black) in comparison with the theoretically predicted data (denoted in gray). The theoretical data are derived from an in silico experiment where the a priori probabilities of each amino acid in each positions have been taken into account and a statistical independence of the amino acid positions is assumed. The error bar corresponds to the standard deviation. The result from our drawing lies within  $3\sigma$ .

**Fig. 5.** HPLC chromatogram of the peptide mixture of a decapeptide and its corresponding coding subsequences. The column conditions resolving the mixture best were: Gradient 0 – 100 % aqueous acetonitrile over 50 min (40 minutes shown), using a Eurospher RP 18, 4x250 mm, 5 $\mu$ m, 100Å C18 column; detection was performed at 222.5 nm. The peptide region of the chromatogram spans a region of  $t_r = 18 - 26$  min. The integral within this regions containing the main peptide and three capping peptide contains 88.3 % of the whole peptide region. The remaining two capping peptides make up for 4.4 % and 7.3 %, respectively.

**Fig. 6.** MALDI mass spectrum of the decapeptide sequences a) Ac-RLSMAWGGRY and b) Ac-RLRLALGKSY with their corresponding five coding sequences. The two peaks marked with an asterisk are methionine oxidation byproducts.

## References

- [1] Lam, K.S.; Salmon, S.E.; Hersh, E.M.; Hruby, V.J.; Kazmierski, W.M.; Knapp, R.J. *Nature* **1991**, *354*, 82 – 84
- [2] Houghten, R.A.; Pinilla, C.; Blondelle, S.E.; Appel, J.R.; Dooley, C.T.; Cuervo, J.H. *Nature* **1991**, *354*, 84 – 86
- [3] Jung, G. (Ed.) *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*; VCH Weinheim, New York, 1996
- [4] Hu, Y.J.; Wei, Y.; Zhou, Y.; Rajagopalan, P.T.R.; Pei, D. *Biochemistry* **1999**, *38*, 643 – 650
- [5] Yu, Z.; Chu, Y.-H. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4515 – 4518
- [6] Tu, J.T.; Yu, Z.; Chu, Y.-H. *Clin.Chem.* **1998**, *44* (2), 232 – 238
- [7] Y.-H. Chu; Yu, Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7* (1), 95 – 98
- [8] Bunin, B.A.; Plunkett, M.J.; Ellman, J.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 4708 – 4712
- [9] Hilaire, P.M.St.; Lowary, T.L.; Meldal, M.; Bock, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13312 – 13320
- [10] Czarnik, A.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 12738 – 12739
- [11] Geysen, M.H.; Meloen, R.N.; Barleling, S.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 3998 – 4002
- [12] Brenner, S.; Lerner, R.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 5381 – 5383

[13] Ohlmeyer, M.H.J.; Swanson, R.N.; Dillard, L.W.; Reader, J.C.; Asouline, G.; Kobayashi, R.; Wigler, M.; Still, W.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 10922 – 10926

[14] Czarnik, A.W.; Nova, M.P. *Chem. Brit.* **1997**, *33*, 39

[15] Still, W.C. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 155 – 163

[16] Youngquist, R.S.; Fuentes, G.R.; Lacey, M.P.; Keough, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3900 – 3906

[17] Furka, A.; Sebestyen, F.; Asgedom, M.; Dibo, G. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 487 – 493

[18] Luo, Z.; Zhang, Q.; Oderaotoshi, Y.; Curran, D.P. *Science* **2001**, *291*, 1766 – 1769

[19] Geysen, H.M.; Wagner, C.D.; Bodnar, W.M.; Markworth, C.J. et al. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 679 – 688

[20] Fields, G.B.; Noble, R.L. *Int. J. Peptide Protein Res.* **199**, *35*, 161 – 214

[21] Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 105 – 108; Spengler, B. *J. Mass spectrom.* **1997**, *32*, 1019 – 1036

[22] Saidel, L.J.; Lieberman, H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *76*, 401 – 409

[23] Korber, B.; Kuiken, C.; Foley, B.; Hahn, B.; McCutchan, F.C.; Mellors, J.; Sodorski, J. *Human Retroviruses and AIDS*; Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 1998

[24] Goudsmit, J.; Debouck, C.; Meloen, R.H.; Smit, L.; Bakker, M.; Asher, D.M.; Wolff, A.V.; Gibbs, C.J.; Gajdusek, D.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 4478 – 4482

[25] Javaherian, K.; Langlois, A.J.; McDanal, C.; Ross, K.L.; Eckler, L.I.; Jellis, C.L.; Profy, A.T.; Rusche, J.R.; Bolognesi, D.P.; Putney, S.D.; Matthews, T.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 6768 – 6772

[26] Scott, C.F.; Silver, S.; Profy, A.T.; Putney, S.D.; Langlois, A.; Weinhold, K.; Robinson, J.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 8597

[27] Moore, J.P.; Nara, P.L. *AIDS* **1991**, *5*, 21

[28] Zolla-Pazner, S.; Gorny, M.W.; Nyambi, P.N.; VanCott, T.C.; Nádas, A. *J. Virol.* **1999**, *73*, 4042 – 4051

[29] Schreiber, M.; Wachsmuth, C.; Muller, H.; Odemuyiwa, S.; Schmitz, H. *J. Virol.* **1997**, *71*, 9198 – 9205

[30] Otani, T.T.; Briley, M.R. *J. Pharm. Sci.* **1978**, *67*, 520 – 526

[31] Blankemeyer-Menge, B.; Nimitz, M.; Frank, R. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1701 – 1704

[32] Karas, M.; Glückmann, M.; Schäfer, J. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1 – 12

[33] K.K. Unger, E. Weber (Eds.) *Handbuch der HPLC*; GIT Verlag, Darmstadt, 1995

[34] Hsieh, K.-H.; Demane, M.M.; Gurusidaiah, S. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, *48*, 292 – 298

**Table 1.**

amino acid positions				
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>A</b>	<b>F<sup>2</sup></b>	<b>A</b>	<b>F</b>	<b>I<sup>2</sup></b>
<b>G</b>	<b>G<sup>2</sup></b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>L<sup>1</sup></b>
	<b>I<sup>4</sup></b>	<b>L</b>	<b>T</b>	
		<b>Y</b>		

Pentapeptide library scheme with 144 species. The N-terminus is the free amine,  $\beta$ APPPRM was used as linker. The capping positions predicted by *Biblio* are denoted by superscripts. The translation of the superscripts into the N-terminal protecting group is listed in table 2.

**Table 2.**

group	modification	abbreviation	mass
1	Acetyl-	Ac-	+ 42.0
2	Benzoyl-	Bz-	+ 104.0
3	2-Naphtoyl-	Naph-	+ 154.2
4	Propionyl-	Prop-	+ 56.0

N-terminal modifications used for blocking the amino termini of the capping amino acids. The mass is denoted relative to the unprotected amino acid residue.

Table 3.

amino acid positions						
1	2	3	4	5	6	7
A	I <sup>1</sup>	A	F <sup>2</sup>	A	F	I <sup>2</sup>
G	L <sup>2</sup>	H	G <sup>2</sup>	G	Q	L <sup>1</sup>
F	P <sup>1</sup>	L	I <sup>4</sup>	L	T	P <sup>1</sup>
K	V <sup>1</sup>			Y		

Heptapeptide library scheme with 5184 species. The N-terminus is acetylated,  $\beta$ APPPR $\beta$ A was used as linker. The capping positions predicted by *Biblio* are denoted by superscripts. The translation of the superscripts into the N-terminal protecting group is listed in table 2.

**Table 4.**

modification	mass
Na	+ 22.0
K	+ 38.0
Ac	+ 42.0
deacetylation	- 42.0
O	+ 16.0

Byproducts observed in single bead sequencing. Oxidation is only detected in peptides with methionine residues.

**Table 5.**

number of sequences	multiplicity
206	1
37	2
5	3
1	4

Result of the mass spectrometric analysis of 299 beads from the heptapeptide library. Overall, 249 different heptapeptide sequences have been observed in 299 probes. The five sequences appearing three times are: FVHIYFP, GVAIYQP, GVHIYQP, KHVIGFP, KVLIIYQP; the sequence appearing four times is: KVHIYQP.

**Table 6.**

amino acid positions									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G	I <sup>3</sup>	H	I <sup>2</sup>	A <sup>1</sup>	F	G	G <sup>1</sup>	A	F <sup>1</sup>
R	L <sup>1</sup>	N	L <sup>1</sup>	G <sup>2</sup>	L		K <sup>1</sup>	R	I <sup>1</sup>
S	V <sup>2</sup>	P	M <sup>1</sup>		P		Q <sup>2</sup>	S	L <sup>2</sup>
		Q	V <sup>1</sup>		Q		R <sup>4</sup>	T	V <sup>1</sup>
		R			W		S <sup>2</sup>	V	W <sup>1</sup>
		S							Y <sup>1</sup>
		T							
		Y							

Decapeptide library scheme with 432.000 species, derived from the V3 loop of HIV-1 clade B (for details see text). The N-terminus is acetylated,  $^{\beta}$ APPPR $^{\beta}$ A was used as linker. The capping positions predicted by *Biblio* are denoted by superscripts. The translation of the superscripts into the N-terminal protecting group is listed in table 2.

Fig. 1.

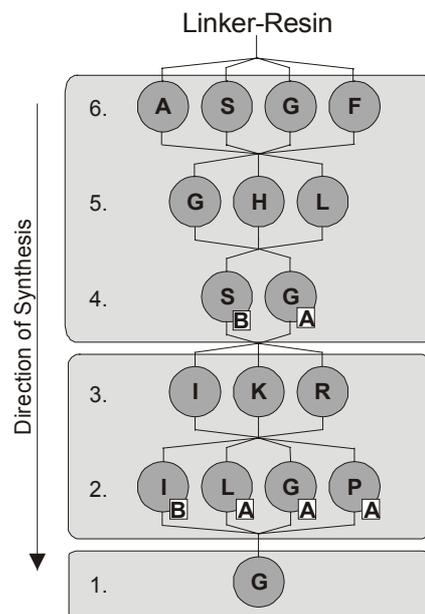


Fig. 2.

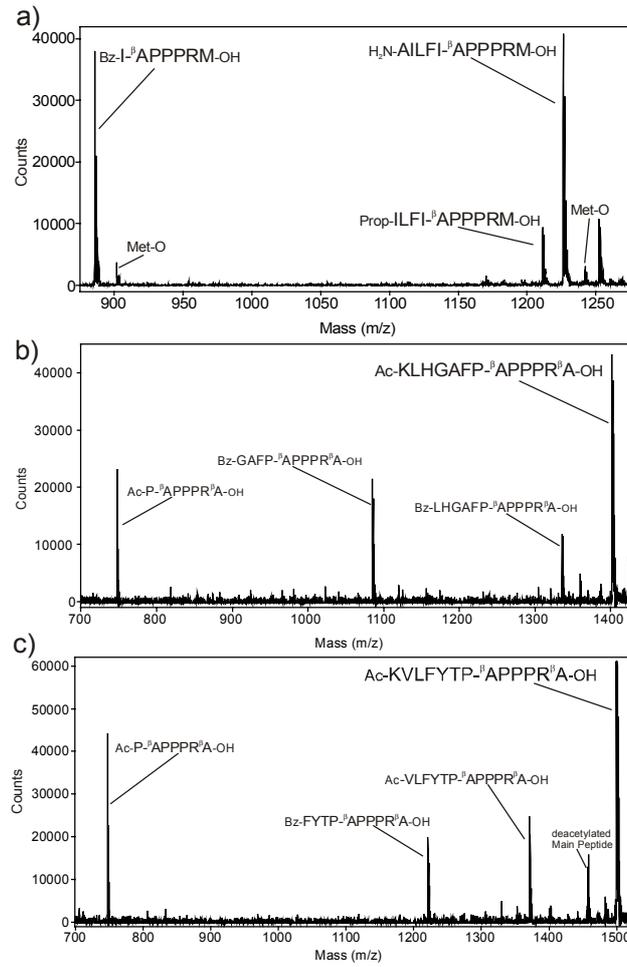
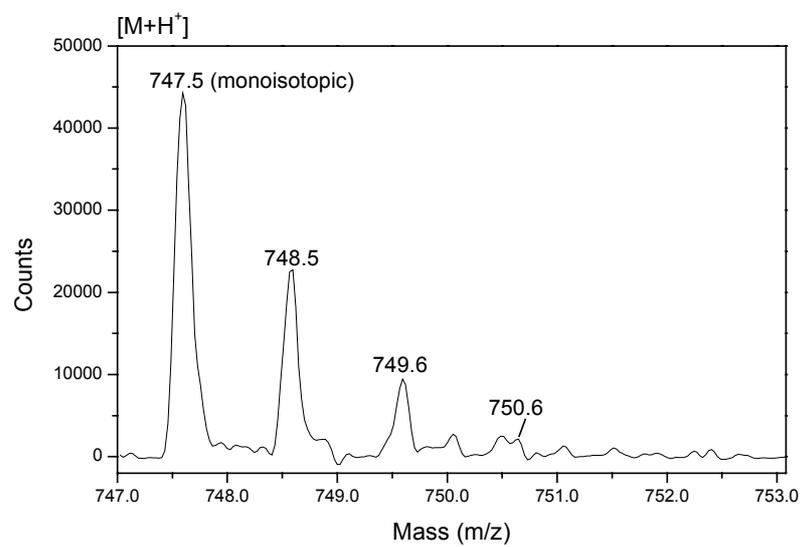


Fig. 3.



**Fig. 4.**

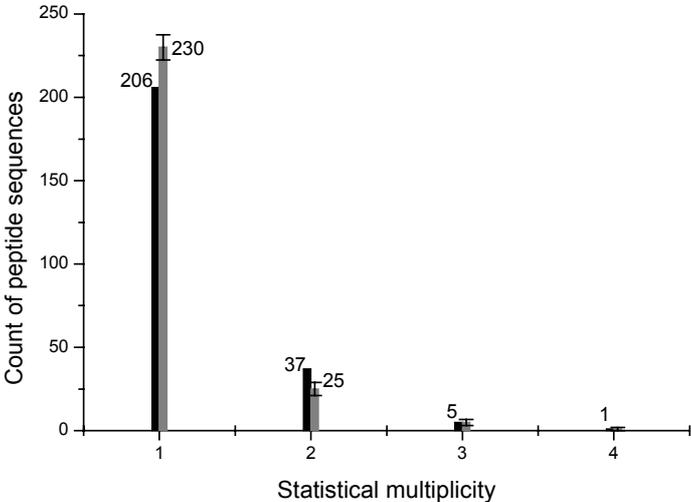


Fig. 5.

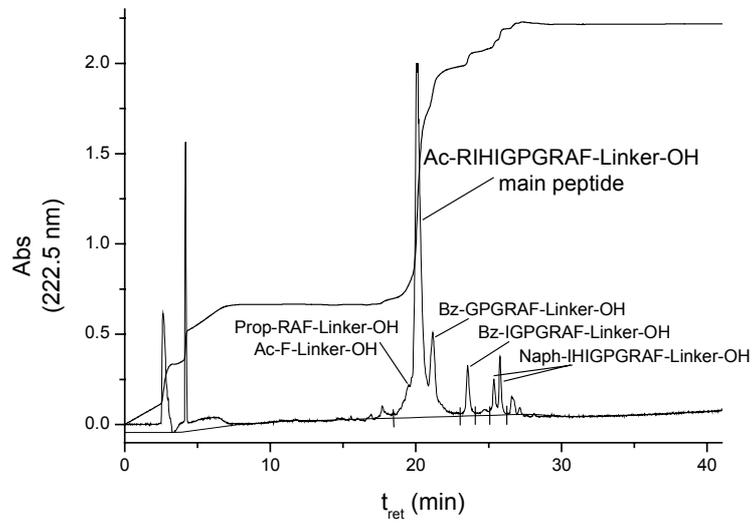
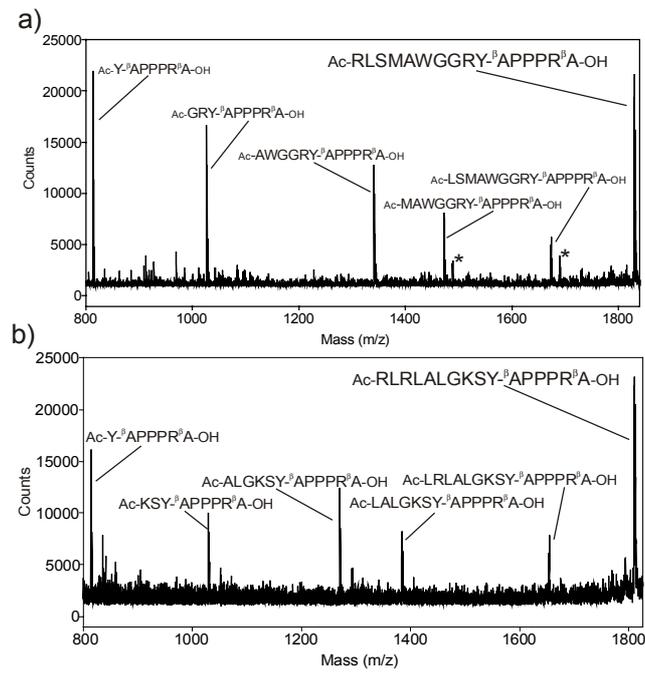


Fig. 6.



## 8 Entwicklung eines festphasengebundenen Immunfluoreszenzassays

### 8.1 Evaluation der Beadmatrix

Der ELISA<sup>[130]</sup> ist eine probate Methode, um die Bindung eines Antikörpers an ein gegebenes Zielmolekül zu detektieren. Er ist ein indirektes Verfahren, bei dem ein sekundärer Antikörper, der an den F<sub>c</sub>-Teil des primären Antikörpers bindet, ein Reporterenzym trägt, welches eine sichtbare Farbreaktion eines nachfolgend zugegebenen Substrats hervorruft und die Bindung des Primärantikörpers somit visualisiert. Die Verwendung von gegen die V3-Region von gp120 gerichteten Antikörpern aus HIV-positiven humanen Seren als Primärantikörper und die Lokalisation genau definierter Peptidsequenzen auf den Beads einer kombinatorischen Bibliothek ebenjener V3-Region als Zielmoleküle legen daher einen solchen Ansatz für ein geeignetes Testsystem nahe. Das allgemeine Schema eines ELISAs mit diesen Vorgaben zeigt Abb. 8.1:

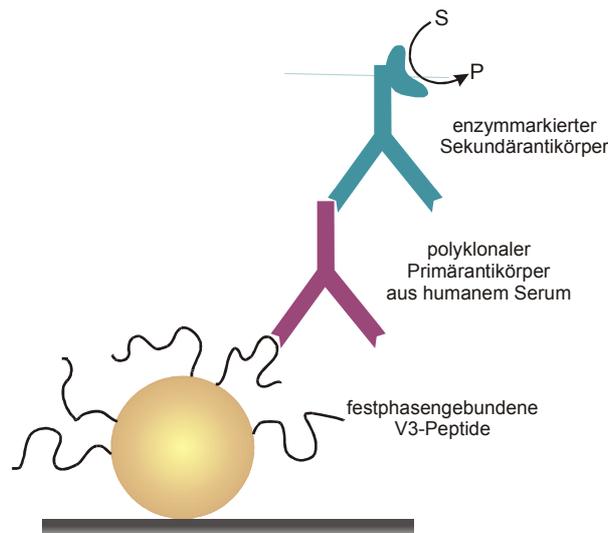


Abb. 8.1: ELISA-Schema für festphasengebundene Peptide. Das klassisch verwendete Enzym ist Meerrettich-Peroxidase mit OPD als Substrat.

Erste, Erfolg versprechende Versuche mit festphasengebundenen V3-Peptiden in Suspension wurden gemäß dem klassischen ELISA-Verfahren mit Meerrettichperoxidase-markiertem Sekundärantikörper und OPD als Substrat durchgeführt<sup>[126]</sup>. Leider konnte dieser Ansatz auch unter Variation verschiedenster Parameter des Tests, etwa der Inkubationsdauer der Antikörper, der Inkubationstemperatur, der Pufferkonzentration bzw. -konsistenz oder der Konzentration der Antikörper nicht reproduziert werden. Als Peptide wurden eine auf

Polystyrolharz mit PAM-Anker synthetisierte uncodierte Peptidbibliothek des HIV-1-Subtyps B, die dem Originalansatz<sup>[126]</sup> entspricht, sowie auf gleichem Harz und Anker synthetisierte V3-Modellpeptide verwendet, die mit passenden Seren des HIV-1-Subtyps B gescreent wurden.

Eine erste Hypothese für dieses Fehlschlagen bezog sich auf das Substrat OPD, das durch die Meerrettichperoxidase zu einem orangefarbenen Präzipitat umgewandelt wird. Dieses könnte sich kaum von den im Durchlicht des Mikroskops intensiv gelb erscheinenden Beads unterscheiden. Darüber hinaus ist das Präzipitat in der wässrigen Reaktionslösung löslich und könnte sich durch Diffusion zügig in der gesamten Lösung verteilen, bevor einzelne Beads als reaktiv identifiziert werden könnten.

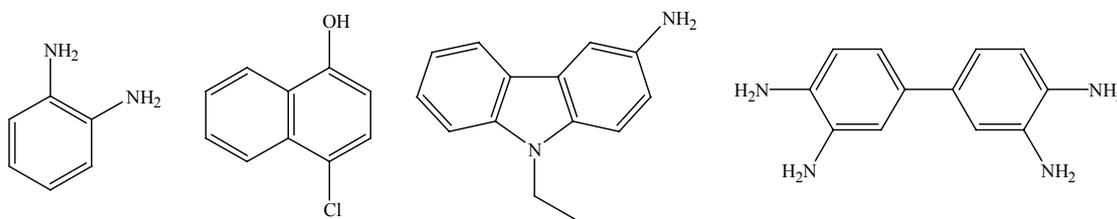


Abb. 8.2: Substrate der Meerrettich-Peroxidase (von links): OPD, 4C1N, AEC, DAB

Daher wurde das klassische Substrat OPD durch folgende Substrate ersetzt, die unlösliche Präzipitate bilden und deren Farbsättigung sich deutlich von gelb unterscheidet; in Klammern gegeben sind die jeweiligen Präzipitatarben: 4C1N (blau), AEC (rot) und DAB (braun). Allerdings führte auch diese Variation der Substrate nicht zu einer Identifikation reaktiver Beads; Niederschläge blieben aus oder die gesamte überstehende Lösung nahm in etwa die Farbe des zu erwartenden Präzipitats an.

Erst der Wechsel der Beadmatrix vom reinen Polystyrolharz zum Polyoxyethylen-Polystyrol-Propfcopolymer TentaGel<sup>[69]</sup> für die festphasengebundenen Peptide führte zur gewünschten Detektierbarkeit immunologischer Reaktivität mittels eines ELISA-Systems, das in Kap. 8.2 näher ausgeführt ist. Wie bereits erwähnt, ist TentaGel durch seine Polyoxyethylenketten auch in wässrigen Lösungen hervorragend quellfähig; zudem ist bekannt, dass die strukturellen Eigenschaften des Harzes im Wesentlichen durch diese bestimmt werden<sup>[132]</sup>. Die Quellfähigkeit des Harzes in organischen und wässrigen Medien, die sterisch entzerrte Matrix und die durch die Polyoxyethylenketten kaum konformationell eingeschränkte Flexibilität der Peptidketten<sup>[69],[140]</sup> auch an inneren Oberflächen machen diese

den biologischen Reaktanden offenbar wesentlich besser zugänglich als eine reine polystyrolbasierte Matrix.

## 8.2 Evaluation des Testsystems

Erfolgreiche Versuche zur Immunpräzipitation farbiger Substrate mit TentaGel-Beads als Trägern reaktiver Peptide wurden mit alkalischer Phosphatase-markierten Sekundäntikörpern durchgeführt<sup>[124]</sup>. Diese dephosphoryliert das Indolylphosphat BCIP, welches oxidativ zu Indigo dimerisiert; die vier Moläquivalente naszierenden Wasserstoffs reduzieren das Tetrazoliumsalz NBT zum purpurfarbenen Formazan:

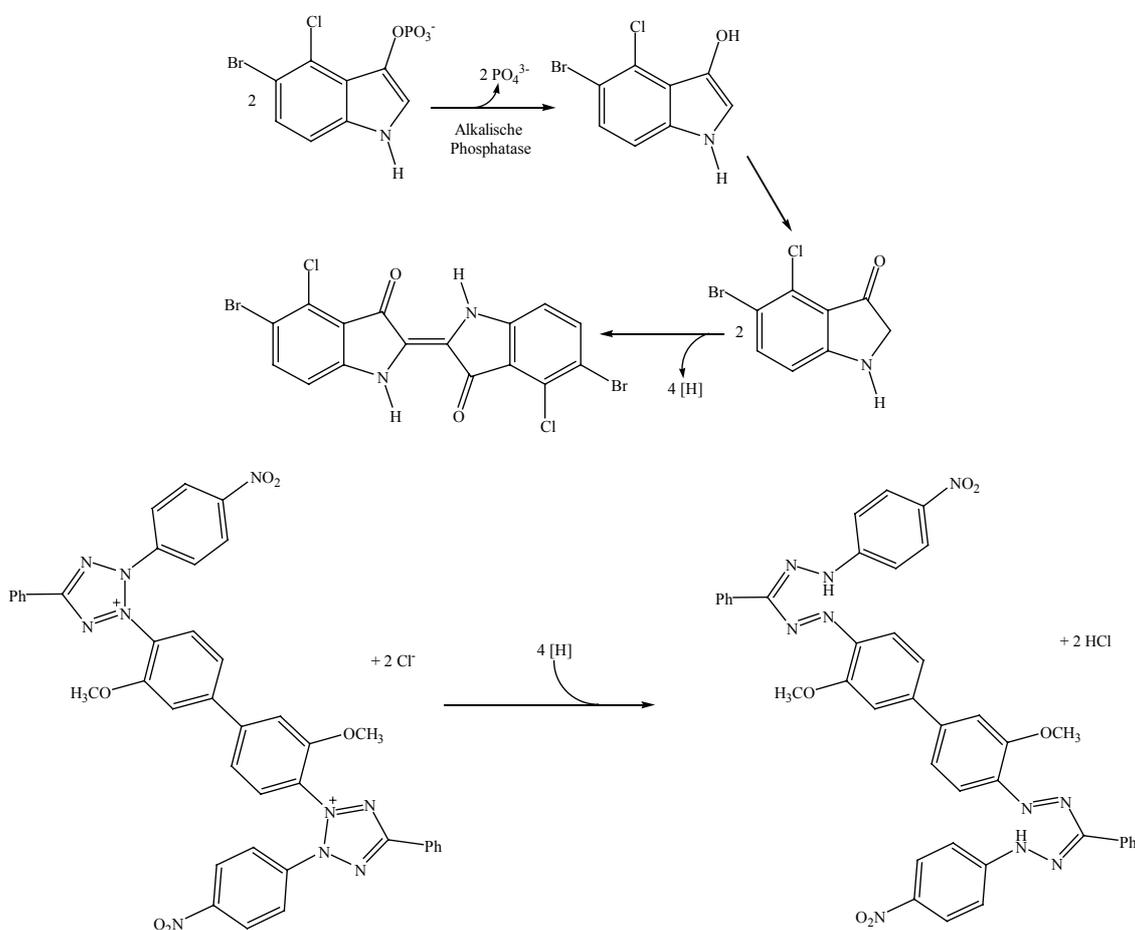
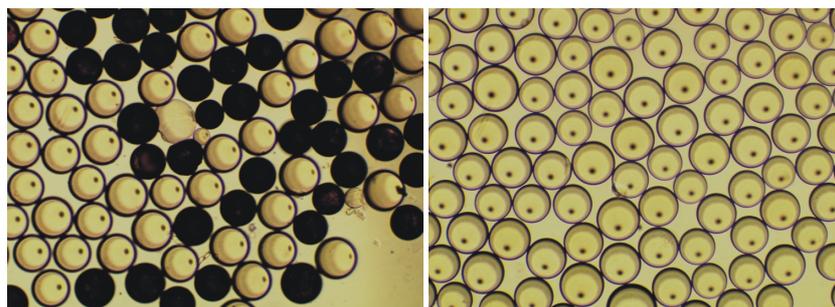


Abb. 8.3: Reaktion der Substrate BCIP/NBT unter Einfluss der Alkalischen Phosphatase

Dieses Testprinzip konnte erfolgreich auf die Reaktion einer V3-Sequenz des HIV-1-Subtyps B (Ac-SIHIGPGRAF) mit einem passenden B-Serum (GE96002) angewendet werden. Hierbei bot sich einheitlich das in Abb. 8.4 dargestellte Bild, unabhängig von der gewählten Ankergruppe der TentaGel-Beads (HMB oder direkte Amidbindung an das

Basisharz ohne Anker). Eine Acetylierung des N-Terminus des Peptids oder das Vorliegen des freien Amins spielten für eine positive Farbreaktion ebenfalls keine Rolle. Als Negativkontrolle wurde ein mit HIV-positiven Seren nicht kreuzreaktives Epitop des humanen Protoonkogens *c-myc*<sup>[141],[142]</sup> analog zum V3-Peptid synthetisiert und getestet; Blindreaktivität, d.h. ein unspezifischer Farbniederschlag, blieb aus, ebenso, wenn nur Leerbeads oder nur mit dem in den Kapiteln 5 bis 7 beschriebenen peptidischen Linker beladene Beads zur Reaktion kamen oder die Tests ohne Serum, d.h. dem Primärantikörper durchgeführt wurden.



*Abb. 8.4: BCIP/NBT-vermittelte Immunpräzipitation: Mischung aus V3-Peptid Ac-SIHIGPGRAF (Peptid „B-consensus“, dem Subtyp HIV-1-B entnommen) und der Negativkontrolle, dem c-myc-Epitop Ac-EQKLISEEDLL (links), nur c-myc-Negativkontrolle (rechts); verwendeter Harztyp: TentaGel; Serumdilution (GE96002) 1:500; Sekundärantikörper: AP-markierter anti-humaner IgG (H+L) ex goat, Dilution 1:5000. Die mit dem V3-Peptid beladenen Beads sind aufgrund der AP-induzierten Farbniederschlagsreaktion dunkel(-violett) gefärbt; der Niederschlag ist auf den Beads lokalisiert. Das c-myc-Epitop weist gegenüber dem Serum keinerlei Reaktivität auf, ein AP-induzierter Niederschlag bleibt aus. Die BCIP/NBT-vermittelte Immunpräzipitation erweist sich somit als geeignete Methode, die Reaktivität von festphasengebundenen Peptiden gegenüber Serumantikörpern mittels eines permanenten Farbniederschlags zu überprüfen.*

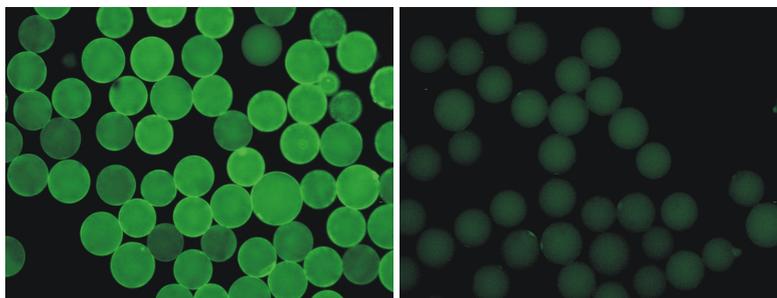
Die Versuchsbedingungen wurden zu Kontrollzwecken auch auf Ansätze mit Polystyrol-PAM-Harz als Träger des V3-Peptids und des *c-myc*-Peptids übertragen. Es wurden keinerlei Farbreaktionen beobachtet, so dass dieser Harztyp endgültig ausschied und die nun folgenden Experimente ausschließlich auf TentaGel als Träger der Peptide beruhten. Alle Peptide sind darüber hinaus mit dem aus Kap. 5 bekannten peptidischen Linker am C-Terminus versehen.

Das *c-myc*-Kernepitop Ac-EQKLISEEDLL sollte sich auch in einem anderen Zusammenhang bewähren. Ein monoklonaler Antikörper gegen dieses Epitop ist kommerziell verfügbar; es ist zu erwarten, dass dieser an das besagte Kernepitop bindet. Die Visualisierung dieser Bindung mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers diene als Modellsystem, um zu überprüfen, ob eine solche Detektionsmethode, die aus der Zytometrie

bekannt ist, auch auf das auf peptidbeladenen TentaGel-Beads basierende Konzept eines festphasengebundenen Immunassays übertragen werden kann.

Die Präzipitate des BCIP/NBT-Systems erwiesen sich nämlich als nahezu unlöslich in wässrigen Lösungen und organischen Solvenzien, auch nicht in DMF<sup>[143],[144]</sup>. Die Entfernbarekeit einer Färbung jedoch ist ebenso wie die Entfernbarekeit der Antikörper eine unmittelbare Voraussetzung für die geplante Wiederholbarkeit der immunologischen Tests mit den gleichen festphasengebundenen Peptiden.

Daher wurden Alternativen zum BCIP/NBT-System gesucht, die eine vollständige Reversibilität des Assays gestatten; nachfolgend sind daher mehrere Testsysteme mit verschiedenen Methoden der Detektion evaluiert worden, die diese Bedingung erfüllen. Zu diesen Systemen gehört auch besagter Immunfluoreszenzassay. Abb. 8.5 zeigt die fluoreszenzdetektierte Bindung monoklonaler Antikörper an das festphasengebundene *c-myc*-Peptid Ac-EQKLISEEDLL (links) und die Negativkontrolle ohne Primärantikörper (rechts). Als Fluoreszenzmarker wird das klassische Label FITC eingesetzt.



*Abb. 8.5: Immunfluoreszenzdetektion der Bindung monoklonaler anti-c-myc-Antikörper (IgG<sub>1</sub> ex mouse, Dilution 1:100) gegen das festphasengebundene c-myc-Kernepitop Ac-EQKLISEEDLL (links); Kontrollexperiment ohne Primärantikörper (rechts). Sekundärantikörper: FITC-markierter anti-Maus IgG (H+L) ex goat, Dilution 1:500. Die Detektion der Bindung zwischen Peptid und Primärantikörper mittels fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper ist somit auch mit festphasengebundenen Peptiden möglich.*

Analoge Versuche mit der aus der BCIP/NBT-Testserie bekannten festphasengebundenen V3-Sequenz des HIV-1-Subtyps B und dem betreffenden B-Serum hingegen lieferten zunächst keine klar reproduzierbaren Aussagen, was vor allem auf eine starke Hintergrundfluoreszenz zurückzuführen ist, die in diesem und dem nächsten Kapitel der vorliegenden Arbeit noch eingehend diskutiert wird.

Folgende sekundärantikörperbasierte Detektionsprinzipien wurden für eine reversible Testführung evaluiert:

- Präzipitatbildung eines sichtbaren Farbstoffs nach Dephosphorylierung durch die alkalische Phosphatase analog zum BCIP/NBT-System; der Farbstoff ist allerdings nach dem Test mit organischen Lösemitteln auswaschbar,
- direkte Markierung der Sekundärantikörper mit einem fluoreszenten Reportermolekül und
- Einsatz biotinylierter Sekundärantikörper; in einem nachfolgenden Schritt wird das System mit Streptavidin umgesetzt, das mit R-Phycoerythrin markiert ist; letzteres dient ebenfalls als fluoreszentes Reportermolekül. Man macht sich hierbei die außergewöhnlich große Stärke der Bindung zwischen Streptavidin und Biotin zu Nutze.

Eine Entfernung des Immunkomplexes bei den beiden letztgenannten Methoden ist problemlos durch Erniedrigung des pH-Werts auf etwa 1 möglich. Das Verfahren der Präzipitatbildung eines sichtbaren, aber löslichen Farbstoffes beruht ebenfalls auf der Dephosphorylierung des Substrats (Naphthol AS) durch die alkalische Phosphatase des Sekundärantikörpers; der entstehende Azofarbstoff ist allerdings in Ethanol löslich<sup>[145]</sup> (siehe Abb. 8.6, umseitig).

Als fluoreszentes Reportermolekül im zweiten genannten Detektionsverfahren diene erneut das klassische Substrat FITC; dieses weist ebenso wie der Marker R-Phycoerythrin des dritten angegebenen Verfahrens ein Emissionsmaximum im grünen Spektralbereich um 520 nm auf.

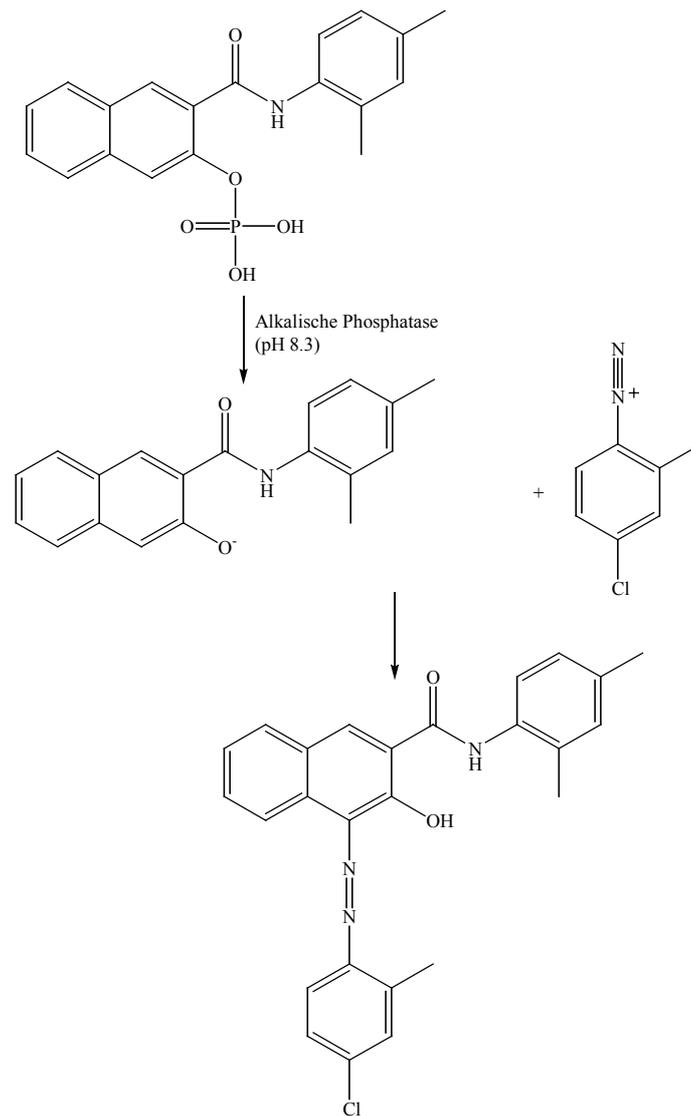


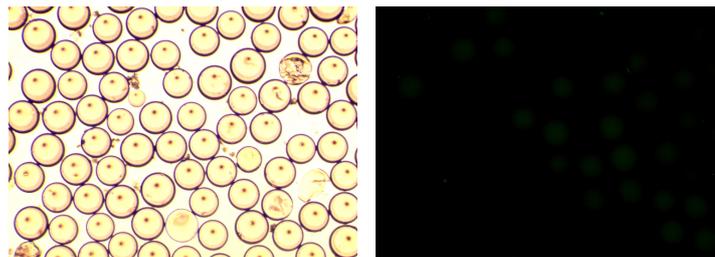
Abb. 8.6: Bildung eines Azofarbstoffes nach Dephosphorylierung des Substrats

Für die systematische Suche nach dem optimalen Detektionsverfahren wurden die drei genannten Systeme im Vergleich zum BCIP/NBT-System getestet. Es wurden vier Peptide (auf TentaGel-Harz und mit Hexpeptidlinker) synthetisiert, die in Suspension gegen je drei verschiedene Seren gescreent und mit jeweils den vier besprochenen Detektionsverfahren (BCIP/NBT, Naphtol AS, FITC und Biotin/Streptavidin/R-Phycoerythrin) visualisiert wurden. Sämtliche verwendeten Sekundärantikörper entstammten derselben tierischen Quelle (Ziege); möglicherweise resultierende Kreuzreaktivitätsdifferenzen dieser Antikörper aufgrund unterschiedlicher Wirtstierklassen<sup>[146]</sup> konnten so ausgeschlossen werden. Eines der vier Peptide, Ac-SIRIGPGQAF, ein Subtyp B-Peptid, erwies sich in Vorversuchen als reaktiv gegenüber zwei der verwendeten Subtyp B-Seren, GE97012 und RU98010. Das zweite Subtyp B-Peptid, Ac-RIHIGPGRAF, wurde primär für die in Kap. 8.3 durchgeführten Tests

mit monoklonalen Antikörpern synthetisiert und ist gegenüber den verwendeten Subtyp B-Seren stärker reaktiv als Ac-SIRIGPGQAF (siehe Kap. 8.6). Diese Peptide dienen daher als Vergleich für die Empfindlichkeit der Detektion der verschiedenen Methoden.

Drittes Serum dieser Testserie war NHS, das so genannte Normal-Humanserum. Dieses enthält alle physiologisch relevanten Bestandteile menschlichen Serums (Albumin etc.) außer anti-HIV-Antikörpern und diente so als Negativreferenz seitens der Seren. Die beiden letzten Peptide, die in den Kap. 8.3 und 8.4 weitere Verwendung finden sollten, wurden ebenfalls als Kontrollen zur Überwachung der Blindreaktivität eingesetzt. Das Peptid Ac-SNNTRTSVIG ist das in Kap. 8.3 besprochene Kernepitop des monoklonalen Antikörpers 1324E und gegenüber HIV-1-E-Seren stark reaktiv<sup>[61]</sup>; gegenüber Seren anderer Subtypen ist es nur schwach kreuzreaktiv. Das Peptid Ac-WAFTANSYHQ schließlich ist ein Decapeptid mit zufällig permutierten Aminosäuren ohne jeden Bezug zur V3-Region von gp120 und dient zum Ausschluss systemischer Blindreaktivität, die z.B. auf dem Vorhandensein an den Beads gebundener Peptide an sich oder der Beadmatrix selbst beruhen könnte.

Sämtliche erwarteten Negativkontrollen erwiesen sich auch als nicht reaktiv, wie die folgenden typischen Aufnahmen, hier des Peptids Ac-SNNTRTSVIG, gegen NHS gescreent und mit BCIP/NBT (Abb. 8.7, links) bzw. mit FITC-markiertem Sekundärantikörper detektiert (Abb. 8.7, rechts), zeigen.



*Abb. 8.7: Kontrollscreening des festphasengebundenen Peptids Ac-SNNTRTSVIG gegen NHS. Detektion erfolgte mit BCIP/NBT und AP-markiertem Sekundärantikörper, anti-humaner IgG (H+L) ex goat, Dilution 1:5000 (links) bzw. mit FITC-markiertem Sekundärantikörper, anti-humaner IgG (H+L) ex goat, Dilution 1:100 (rechts); wie erwartet, ist keinerlei Farbniederschlagsreaktion (links) bzw. Fluoreszenz (rechts) festzustellen. Systemische, z.B. durch die Beadmatrix selbst bedingte Blindreaktivität kann somit ausgeschlossen werden.*

Während die Detektionsmethode, die auf dem Einsatz eines mit alkalischer Phosphatase markiertem Sekundärantikörpers beruht und eine BCIP/NBT-vermittelte Farbreaktion hervorruft, alle erwarteten Reaktivitäten richtig wiedergab (Abb. 8.8, umseitig, links),

erwiesen sich die Immunpräzipitation mit Naphtol AS und die Biotin-Streptavidin-Methode als untauglich für das festphasenbasierte Immunassay.

Färbungen mit Naphtol AS stimmten nur in einem der Experimente mit der BCIP/NBT-Färbung überein, nämlich in der am stärksten positiv erwarteten Reaktion zwischen der Sequenz Ac-RIHIGPGRAF und dem Serum RU98010. In den anderen Fällen konnte kaum zwischen dem Orange des Farbstoffs und dem intensiven Gelb der Beads im Durchlichtmikroskop unterschieden werden; zudem ließ sich der Azofarbstoff bereits in wässriger Lösung leicht auswaschen. Beim auf Biotin und Streptavidin basierenden System schließlich konnten Hintergrund, Positiv- und Negativkontrollen überhaupt nicht unterschieden werden: alle Fluoreszenzaufnahmen zeigen einheitlich schwach leuchtende Beads.

Somit verblieb einzig der Ansatz, der auf der Verwendung eines mit einem fluoreszenten Molekül markierten Antikörpers beruhte. BCIP/NBT-Färbung und Fluoreszenzaufnahmen stimmten überein, jedoch trat beim hier verwendeten FITC als Marker eine starke Hintergrundfluoreszenz störend auf (Abb. 8.8, rechts, linke Bildhälfte).

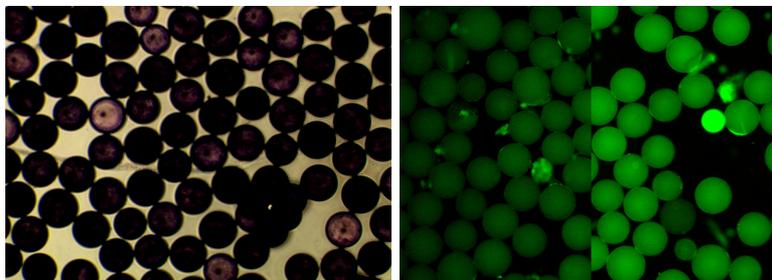


Abb. 8.8: Reaktivität von Ac-RIHIGPGRAF (Peptid B-R01, aus HIV-1 B) gegenüber Serum RU98010, Dilution 1:100, detektiert mit BCIP/NBT und AP-markiertem Sekundäntikörper, anti-humaner IgG (H+L) ex goat, Dilution 1:5000; das dunkelviolette Farbpräzipitat ist deutlich auf den Beads lokalisiert (links). Die entsprechende Negativkontrolle liefert keinerlei Farbniederschlag (nicht gezeigt). Screening desselben Peptids mit NHS (rechts, linke Bildhälfte) und RU98010 (rechts, rechte Bildhälfte), Dilution je 1:500. Detektion erfolgte in beiden Fällen mit FITC-markiertem Sekundäntikörper (anti-humaner IgG (H+L) ex goat, Dilution 1:100). Die Reaktivität der Beads gegen das HIV-positive Serum hebt sich gegenüber der Negativkontrolle (NHS) trotz eines starken fluoreszenten Hintergrunds ab. Das hell leuchtende kleine Bead (rechts, rechte Bildhälfte) ist falsch positiv, da sich zeigte, dass Beads, deren Durchmesser kleiner als der der anderen Beads ist, nicht gequollen sind und daher aufgrund ihrer höheren Materiedichte vielfach eine starke Blindfluoreszenz aufweisen. Beide Systeme eignen sich somit gleichermaßen zur Detektion der Bindung zwischen festphasengebundenem Peptid und Serumantikörper; entscheidender Vorteil der Fluoreszenzmarkierung jedoch ist die Entfernbarekeit der Färbung der Beads, die schlicht durch die Abwaschung des Immunkomplexes erfolgt (siehe Abb. 8.16).

Daher wurde in einem weiteren Schritt nach Möglichkeiten gesucht, die sekundäntikörpervermittelte direkte Fluoreszenzdetektion zu verbessern, um positive

Reaktivität im Sinne hoher Fluoreszenzintensität besser von Hintergrundfluoreszenz unterscheiden zu können. Es wurden neben FITC zwei weitere fluoreszente Marker gewählt, die in unterschiedlichen Bereichen des sichtbaren elektromagnetischen Spektrums absorbieren und emittieren, das Coumarinderivat AMCA und das Sulforhodaminderivat TexasRed:

Substrat	Anregung (nm)	Emission (nm)
AMCA	350	450
FITC	495	520
TexasRed	580	620

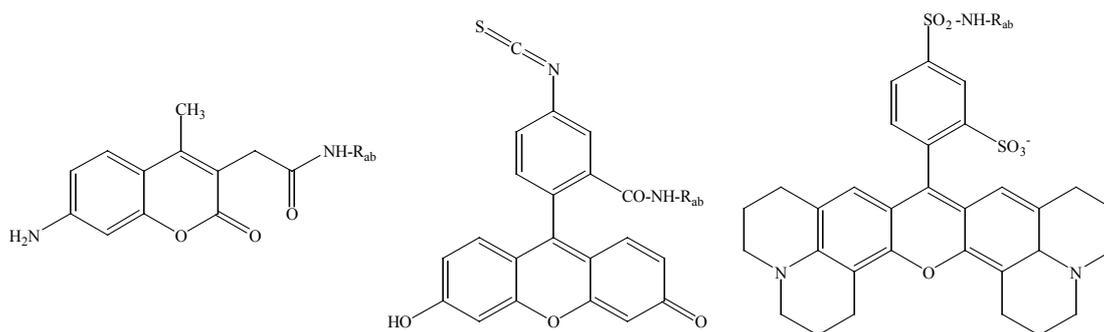


Abb. 8.9: AMCA (links); FITC (Mitte); TexasRed (rechts)

Ziel dieser Testreihe war somit die Ermittlung des optimalen Wellenlängenbereichs für eine auf TentaGel-Beads lokalisierte Immunfluoreszenz. Erneut wurden die aus den ersten Versuchen zur BCIP/NBT-Färbung verwendeten Peptide Ac-SIHIGPGRAF („B-consensus“) und Ac-EQKLISEEDLL, von denen das letztere einen etwas niedrigeren inhärenten fluoreszenten Hintergrund besitzt als das erstgenannte Peptid, wie Vergleichsaufnahmen bei identischen Belichtungszeiten zeigten. Das HIV-1-B-Serum GE96002 diente auch hier als Primärantikörperquelle.

Leider konnte eine Variation des Wellenlängenbereichs keine Verbesserung des Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses der festphasengebundenen Immunfluoreszenz hervorrufen. Der ursprünglich gewählte FITC-Bereich (Emission grüner Fluoreszenz) erwies sich vielmehr als der einzig mögliche, da sowohl der Bereich roter (TexasRed) als auch blauer (AMCA) Fluoreszenzemission keinen genügenden Kontrast im Vergleich zum Hintergrund lieferten. Ein typisches Bild zeigt Abb. 8.10 (umseitig). Eingesetzt wurde eine 1:1-Mischung aus Beads beider Peptide. Das linke Bild zeigt eine mikroskopische Aufnahme der Beads, die mit dem Serum und nachfolgend mit dem TexasRed-Antikörper behandelt wurden. Für die rechte Aufnahme wurde auf vorherige Behandlung mit Serumantikörpern verzichtet. Beide

Aufnahmen sind nicht unterscheidbar. Der gewählte Wellenlängenbereich ist somit für eine Fluoreszenzdetektion nicht geeignet.

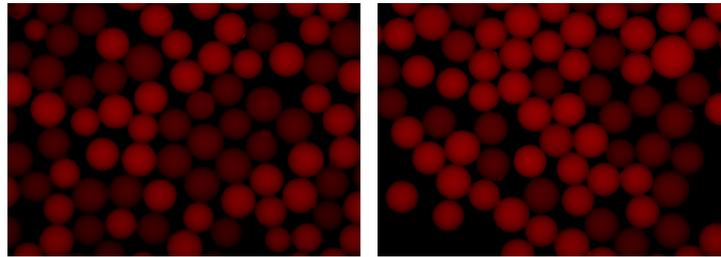


Abb. 8.10: Einsatz von Beadmischungen V3-Peptid (Ac-SIHIGPGRAF, aus HIV-1 B)/c-myc-Peptid (Ac-EQKLISEEDLL) und Detektion mittels TexasRed-markiertem Sekundärantikörper (anti-humaner IgG (H+L) ex goat, Dilution 1:100): mit (links) und ohne (rechts) Primärantikörper. Verwendet wurde das Serum GE96002, Dilution 1:500. Beide Aufnahmen zeigen nur fluoreszenten Hintergrund (Detektionswellenlänge: 620 nm). Eine TexasRed-vermittelte Detektion scheidet somit für die festphasengebundene Immunfluoreszenz aus.

### 8.3 Screening monoklonaler Antikörper

Das c-myc-Modellsystem (Abb. 8.5), bei dem ein monoklonaler Antikörper gegen sein festphasengebundenes Kernepitop zur Reaktion gebracht und diese Bindung mittels FITC-markiertem Sekundärantikörper klar visualisiert wurde, diente als Nachweis für die Übertragbarkeit dieses Testkonzepts auf TentaGel-gebundene Peptide, das ursprünglich zur Fluoreszenzmarkierung von Zellen entwickelt worden war. Der monoklonale anti-c-myc-Antikörper wurde in Mäusen erzeugt; alle bisherigen Versuche mit Peptiden der V3-Schleife basierten hingegen auf polyklonalen menschlichen Seren, deren Spezifität bekanntlich weniger stringent als diejenige von monoklonalen Antikörpern ist, was deren gegenüber monoklonalen Antikörpern verminderte Fluoreszenzintensität erklärt.

Versuche zur Reaktivität humaner monoklonaler Antikörper gegen ihre jeweiligen Epitope („passende Peptidsequenzen“) müssten demzufolge eine ebenso deutliche Immunfluoreszenz hervorrufen. In Zusammenarbeit mit Prof. S. Zolla-Pazner, Veterans Affairs Medical Center, New York, die uns vier dieser monoklonalen Antikörper zur Verfügung stellte, wurde daher eine entsprechende Testreihe konzipiert. Tabelle 8.1 zeigt die Bezeichnung dieser Antikörper und deren Kernepitope, diese Sequenzen wurden als N-terminal acetylierte Peptide nachsynthetisiert. Die monoklonalen Antikörper 447 und 1108 besitzen dasselbe Epitop, eine Sequenz des HIV-1-Subtyps B. Der Antikörper 1324E ist vor allem gegenüber HIV-1-E-Sequenzen reaktiv<sup>[61]</sup>; das Epitop von 91-5/p24 schließlich ist nicht gp120 entnommen, sondern dem Nucleocapsidprotein p24.

mAb	Epitop	Ursprung
447	RIHIGPGRAF	HIV-1-Subtyp B, V3-Schleife
1108	RIHIGPGRAF	HIV-1-Subtyp B, V3-Schleife
1324E	SNNTRTSVIG	HIV-1-Subtyp E, V3-Schleife
91-5/p24	AAMQMLKETINE	HIV-1, p24

Tab. 8.1: Verwendete monoklonale Antikörper und ihre Epitope

Die Reaktion von Antikörper 1108 mit seinem zugehörigen Epitop ist in Abb. 8.11 im Vergleich zu einem Kontrollexperiment mit NHS (Abb. 8.11, links) aufgezeigt. Die auftretende Fluoreszenz ist deutlich:

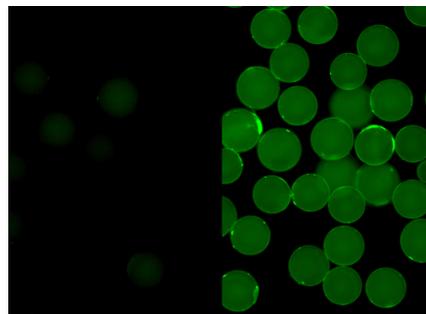


Abb. 8.11: Reaktion des mAbs 1108 (Dilution 1:500) gegen sein festphasengebundenes Epitop (Ac-RIHIGPGRAF, Ursprung: V3-Schleife von HIV-1 B) und Detektion mit FITC-markiertem Sekundärantikörper (anti-humaner IgG (H+L) ex goat, Dilution 1:100, rechts); Negativkontrolle mit NHS, Dilution 1:500 (links). Die Beads fluoreszieren wie erwartet deutlich.

Alle anderen Antikörper jedoch wiesen keinerlei Reaktivität mit dem entsprechenden Peptid auf und ließen sich von den zugehörigen Negativkontrollen nicht unterscheiden. Dies könnte die Folge einer zu geringen Konzentration der drei anderen Antikörper in der zur Verfügung gestellten Stammlösung sein; deren geringe Menge gestattete leider keine weiter gehenden Untersuchungen. Die Antikörper wurden – wie die HIV-Seren bisher auch – in der üblichen Verdünnung 1:500 eingesetzt. Für eine weitere Optimierung der festphasengebundenen Immunfluoreszenz boten sich daher zwei Ansatzpunkte:

- Erhöhung der Fluoreszenzausbeute der sekundärantikörpergekoppelten Reporter-moleküle und
- Findung einer geeigneten Arbeitskonzentration für Primär- und Sekundärantikörper, ohne den inhärenten Fluoreszenzhintergrund zu erhöhen.

## 8.4 Optimierung der sekundärantikörpervermittelten Detektion

Auf der Suche nach fluoreszenten Markern für die Histologie und die Zytometrie, die eine verbesserte Quantenausbeute und eine höhere Photostabilität gegenüber FITC aufweisen, konnten in den letzten Jahren Fortschritte erzielt und die Substrate durch Konjugation an anti-humane Antikörper den hier durchzuführenden immunologischen Tests verfügbar gemacht werden. Zwei in ihrer Fluoreszenzausbeute optimierte Substrate, das Carbocyanin Cy2<sup>[147]</sup> und das Fluorescinderivat Alexa488<sup>[148],[149]</sup>, wurden daher im Vergleich zu FITC auf ihre Eignung als Reportermoleküle für die festphasengebundene Immunfluoreszenz getestet.

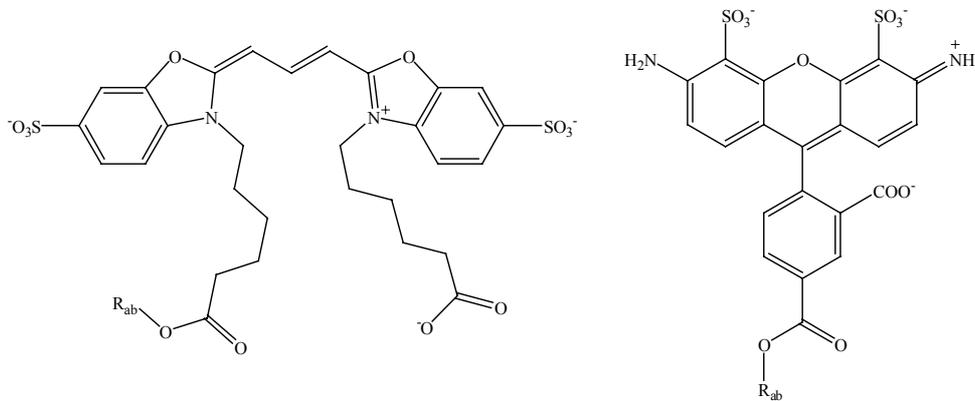


Abb. 8.12: fluoreszente Reportermoleküle: Cy2 (links); Alexa488 (rechts)

Als Primärantikörperquelle diente erneut das HIV-1-B-Serum RU98010; das mit dem V3-Peptid Ac-RIHIGPGRAF zur Reaktion kam. Als Negativkontrollen dienten die Peptide Ac-SNNTRTSVIG und Ac-WAFTANSYHQ sowie NHS als Blindreferenz seitens der primären Antikörper. Sämtliche Tests wurden jeweils mit FITC, Cy2 und Alexa488 als Sekundärantikörpermarker durchgeführt.

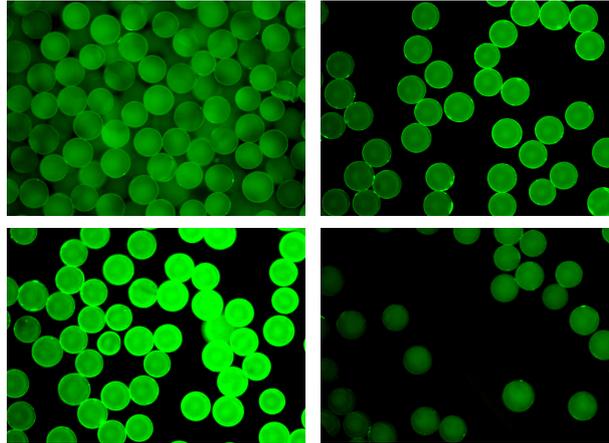


Abb. 8.13: Reaktion des Peptids Ac-RIHIGPGRAF (B-R01, aus HIV-1 B) mit dem Serum RU98010, bei der eine deutlich positive Reaktion erwartet wird, und Detektion mit FITC (links oben), Cy2 (rechts oben), Alexa488 (links unten). Alle Sekundärantikörper sind vom Typ anti-humaner IgG (H+L) ex goat. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität (FITC < Cy2 < Alexa488) ist deutlich zu erkennen. Die Negativkontrolle erfolgt mit NHS, Detektion mit Alexa488 (rechts unten); sie weist einen merklichen fluoreszenten Hintergrund auf, da das NHS, wie alle anderen Seren auch, in einer für die Immunfluoreszenz vergleichsweise hohen Konzentration eingesetzt wurde (Dilution aller Seren: 1:100). Aufgrund leichter Inhomogenität der Einstrahlung des Fluoreszenzlichts erscheint jeweils die linke Bildhälfte etwas dunkler.

Die Serumkonzentration wurde zudem von 1:1000 über 1:500, 1:250 bis 1:100 variiert, um eine optimale Arbeitskonzentration für den Primärantikörper zu bestimmen. Letztgenannte erwies sich als beste der vier Verdünnungen; der Kontrast zur Negativreferenz war am größten. Höhere Konzentrationen als eine Dilution um den Faktor 1:100 wurden allerdings nicht in Betracht gezogen, da die Menge verfügbarer Seren begrenzt ist und patientenindividuelle Proben der Größenordnung 500  $\mu$ L in der Regel nur einmal verfügbar sind.

Abb. 8.13 zeigt, dass das fluorogene Substrat Alexa488 die höchste Farbbrillanz, aber auch -stabilität aller analogen Versuche aufwies. Daher wurden ausschließlich mit diesem Marker konjugierte Sekundärantikörper in den weiteren Versuchen verwendet.

## 8.5 Entwicklung einer Trägermatrix für iteratives Screening

Nach der Etablierung und Optimierung eines immunologischen Testsystems für das Screening von festphasengebundenen Peptiden wurde nun eine Trägermatrix entwickelt, die die Beads räumlich fixiert und sie so wiederholten Detektions- und Waschschritten zugänglich macht. Eine solche Matrix muss vielfältigen Ansprüchen genügen: sie muss mechanisch und chemisch stabil sein gegenüber allen Schritten der iterativen Testführung, insbesondere einer Behandlung mit pH 1. Diese ist für die Entfernung des Immunkomplexes vom Bead notwendig. Die Matrix darf nicht vollkommen starr sein, sondern muss eine

gewisse Restflexibilität aufweisen, damit die TentaGel-Beads, die in verschiedenen Lösemittelumgebungen unterschiedlich stark quellen, sich nicht beim An- oder Abschwollen von der Matrix lösen. Sie darf des weiteren nicht zum fluoreszenten Hintergrund beitragen und muss ebenso gegenüber allen Prozessen der immunologischen Tests inert sein. Natürlich muss sie transparent und für Fluoreszenzlicht permeabel sein; die Schichtdicke der Matrix muss so gewählt werden, dass einerseits eine hinreichende mechanische Stabilität über mehrere Testcyclen gewährleistet ist und andererseits die Fluoreszenz der Beads, die einen Durchmesser von lediglich 100  $\mu\text{m}$  haben, nicht wesentlich abgeschwächt oder gestört wird.

Eher technische Anforderungen sind die Verdünnbarkeit mit organischen Lösemitteln, um eine homogene und glatte Klebefläche zu erzeugen und die Eignung für die Klebung von Kunststoff (TentaGel-Beads) und Glas (Petrischale) als Untergrund. Schließlich jedoch muss es das Trocknungs- und Aushärtungsverhalten der Matrix ermöglichen, dass die Beads weder zu tief in sie eindringen noch zu flach aufsitzen. Im ersten Fall wäre ein großer Teil der Oberfläche der Beads für die Antikörper nicht zugänglich; im zweiten Fall wären sie zu leicht ablösbar.

Verschiedene kommerziell verfügbare Klebstoffe unterschiedlicher chemischer Basis wurden hinsichtlich dieser Kriterien mittels Probeklebung getestet. 20 der 21 getesteten handelsüblichen Klebstoffe auf Basis von Polyurethan, Alkoxysilikon, Nitrilkautschuk, Polyvinylacetat, Acrylate wie Methacrylat, Cyanacrylat oder auch Acrylester erwiesen sich speziell in bezug auf die Stabilität bei Feuchtigkeitseinwirkung und niedrigem pH als nicht geeignet. Lediglich ein Zweikomponentenklebstoff auf der Basis von Bisphenol A-Epoxidharz erfüllte alle Anforderungen. Ein Verfahren, das die Fixierung von TentaGel-Beads auf einem Epoxidharzklebefilm ermöglicht, wurde entwickelt und optimiert: Der Klebefilm ist lediglich 150  $\mu\text{m}$  dick, eine Stärke, die mechanisch hinreichend stabil ist, gleichzeitig aber das Fluoreszenzlicht nicht abschwächt. Dieses Verfahren ist in den allgemeinen Arbeitsvorschriften des Anhangs der vorliegenden Arbeit ausgeführt. Die Beads dringen nur knapp 9  $\mu\text{m}$  in den Klebefilm ein; der Oberflächenverlust beschränkt sich auf etwa 16 %, eine ideale Kugelgestalt der Beads vorausgesetzt. Abb. 8.14 (umseitig) zeigt eine Blindfluoreszenzaufnahme von TentaGel-Beads, die gemäß diesem Verfahren fixiert wurden. Aufgrund der Intensität des Fluoreszenzlichts erscheinen die Beads opak; der in die Klebmatrix eindringende Teil der Beads tritt als dunkle, kreisrunde Fläche auf, die nicht fluoresziert.

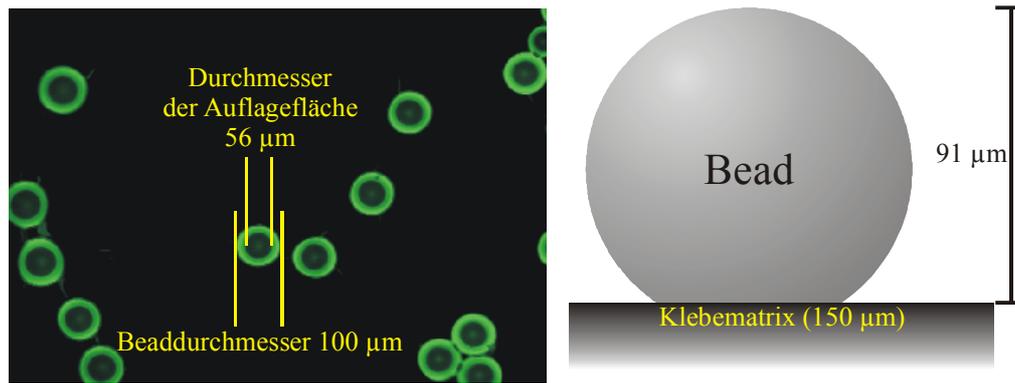


Abb. 8.14: Fluoreszenzaufnahme von klebefixierten Beads (links); höhengetreue Darstellung der Eindringtiefe

Eine solche gesteuerte Fixierung von TentaGel-Beads auf einem 150 μm dünnen Klebefilm auf Glas ist empfindlich von der Umgebungstemperatur abhängig. Durch Reihenversuche und lineare Regression der Daten wurde ein empirischer Zusammenhang der Abhängigkeit der Trocknungsdauer von der Raumtemperatur gefunden:  $t \text{ (min)} = 33.5 - 0.83T \text{ (}^\circ\text{C)}$ ; dieser gibt den Zeitpunkt an, wann die suspendierten Beads nach Beginn der Aushärtung des Klebefilms aufgetragen werden, um, wie in Abb. 8.14 gezeigt, noch in den Klebefilm eindringen zu können. Dieser Zusammenhang ist nur in einem Raumtemperaturintervall zwischen 19 und 26 °C gültig. Nach erfolgter Klebung wurde dann unter dem Mikroskop überprüft, ob die Beads in die Klebematrix eingedrungen sind, bzw. ob sie sich mittels einer Stahlnadelspitze ablösen ließen. Eine Abweichung von lediglich fünf Sekunden gegenüber der durch diese Kennlinie (siehe Anhang) definierten Trocknungsdauer führt bereits zum Misslingen der Klebung; wartet man zu lange, haften die Beads nicht, und sie lassen sich leicht entfernen; wartet man nicht lange genug, versinken die Beads im Klebefilm. In diesem Fall sind sie einer Nadelspitze nicht mehr zugänglich; darüber hinaus zeigen solche Beads kein Blindfluoreszenzmuster bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop wie in Abb. 8.14, sondern erscheinen einheitlich fahl.

Die Wahl einer geeigneten Belegungsdichte der Beads (Anzahl pro Flächeneinheit auf der Petrischale) ist von zwei Parametern abhängig:

- Die Menge verfügbaren Patientenserums ist begrenzt. Die Beads sollten daher in so geringem Abstand voneinander wie möglich auf der Petrischale fixiert werden, um die durch die Inkubationslösungen zu benetzende Fläche und damit das benötigte Reaktionsvolumen zu minimieren.

- Die technische Vorgehensweise der Oberflächenfixierung der Beads bedingt es (siehe Kap. 12), dass diese in einer DCM/Toluol-Mischung vollständig suspendiert und nachfolgend gleichmäßig auf die Klebefläche aufgetragen werden. Trocknen die Beads und liegen sie zu dicht auf einer gegebenen Fläche auf, neigen sie zur Verklumpung. Dieser Effekt muss unterbunden werden, da die Immunfluoreszenz aufgrund des „One Bead One Peptide“-Ansatzes eindeutig lokalisiert bleiben muss. Erwünscht ist vielmehr eine Monolage der Beads, bei der nebeneinander liegende Exemplare klar unterscheidbar sind.

Folgender Ansatz hat sich bei den hier durchgeführten Versuchen bewährt: Jedes Bead hat in gequollenem Zustand einen Durchmesser von ca. 100  $\mu\text{m}$ . Gibt man ihm über diese Ausmaße hinaus etwa je 40  $\mu\text{m}$  weiteren Raum, resultiert ein Flächenbedarf von  $180 \times 180 \mu\text{m} = 0.0324 \mu\text{m}^2$  pro Bead. Dies führt zu einer theoretischen Belegungsdichte von 31 Beads pro  $\text{mm}^2$  oder für eine 70 mm-Petrischale mit einer nutzbaren Probenoberfläche von  $38.4 \text{ cm}^2$  zu einer Belegung mit etwa 120000 Beads.

Die Peptidbibliothek, die für das iterative Screening synthetisiert wurde (siehe Kap. 9 bzw. 10), umfasst 80640 verschiedene Sequenzen. Da eine leichte Redundanz für das vollständige Vorliegen aller Sequenzen der Bibliothek von Vorteil ist, wurde die Belegungsdichte der Beads gemäß diesen Vorgaben gewählt. Zudem konnte das Volumen der Inkubationslösungen bei Verwendung der 70 mm-Petrischalen auf insgesamt 3 mL beschränkt werden.

Abb. 8.15 (umseitig, links) zeigt den so definierten Raumbedarf eines einzelnen Beads. In Abb. 8.15 (umseitig, rechts) verkleinert dargestellt ist das Hintergrundraster, an Hand dessen eine eindeutige räumliche Identifikation der Beads ermöglicht. Die Probenfläche ist in Sektoren (arabische Zahlen; die dick umrandete Fläche entspricht einem  $\text{cm}^2$ ) und Planquadrate (kleine Kästchen, Fläche entspricht einem  $\text{mm}^2$ ) unterteilt. Der in Kap. 9 bzw. 10 gezeigte Ausschnitt der Fluoreszenzaufnahme entspricht etwa der Fläche eines Planquadrats.

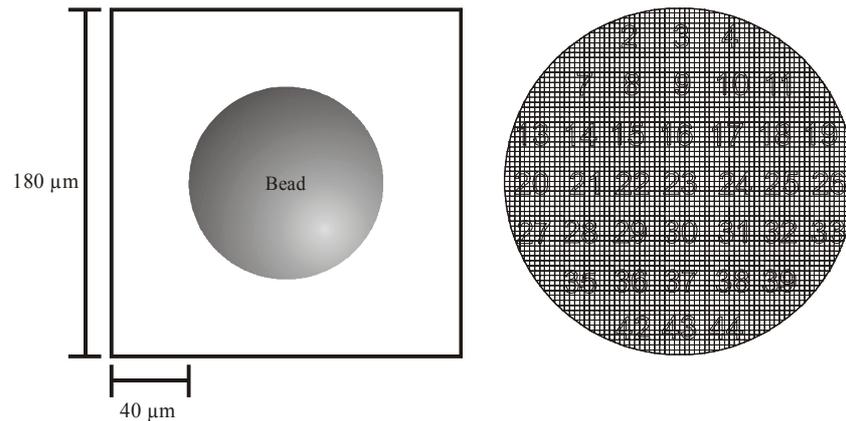


Abb. 8.15: Raumbedarf eines einzelnen Beads (links); Planquadratraster, verkleinert (rechts)

## 8.6 Iteratives Festphasenscreening ausgewählter Modellpeptide

Der letzte Schritt der Entwicklung eines iterativen Immunassays besteht im Nachweis der Reversibilität der Immunreaktion durch Entfernung des Immunkomplexes. Wie bereits geschildert, sollte dies durch Behandlung mit pH 1 gelingen. Zwei harzgebundene Subtyp B-Peptide, Ac-RIHIGPGRAF und Ac-SIRIGPGQAF, wurden daher in getrennten Ansätzen gemäß obigem Verfahren auf einer Petrischale fixiert und wiederholt gescreent.

Zwischen den einzelnen Screeningschritten, nach der entsprechenden Aufnahme fluoreszenzmikroskopischer Fotografien der Planquadrate reaktiver Beads, wurde die Petrischale gründlich mit 6 M Guanidinhydrochlorid-Lösung gewaschen, die mit konz. Salzsäure auf pH 1 eingestellt war. Folgende Screeningschritte wurden durchgeführt:

1. Screening mit NHS, um die Belichtungsbedingungen der Fluoreszenzaufnahmen zu ermitteln, bei denen Hintergrundfluoreszenz gerade nicht mehr sichtbar ist,
2. Screening gegen das HIV-1-Serum RU98010,
3. Screening gegen das HIV-1-Serum GE97012 und
4. erneutes Screening mit NHS, um blindreaktive („falsch positive“) Beads auszuschließen.

Alle Schritte – Fluoreszenzintensität nach Serumeinwirkung und nach Abwaschung – wurden durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen ausgewählter repräsentativer Planquadrate (Fläche jeweils ca. 1 mm<sup>2</sup>) dokumentiert. Ein typisches Muster zeigt Abb. 8.16 (umseitig).

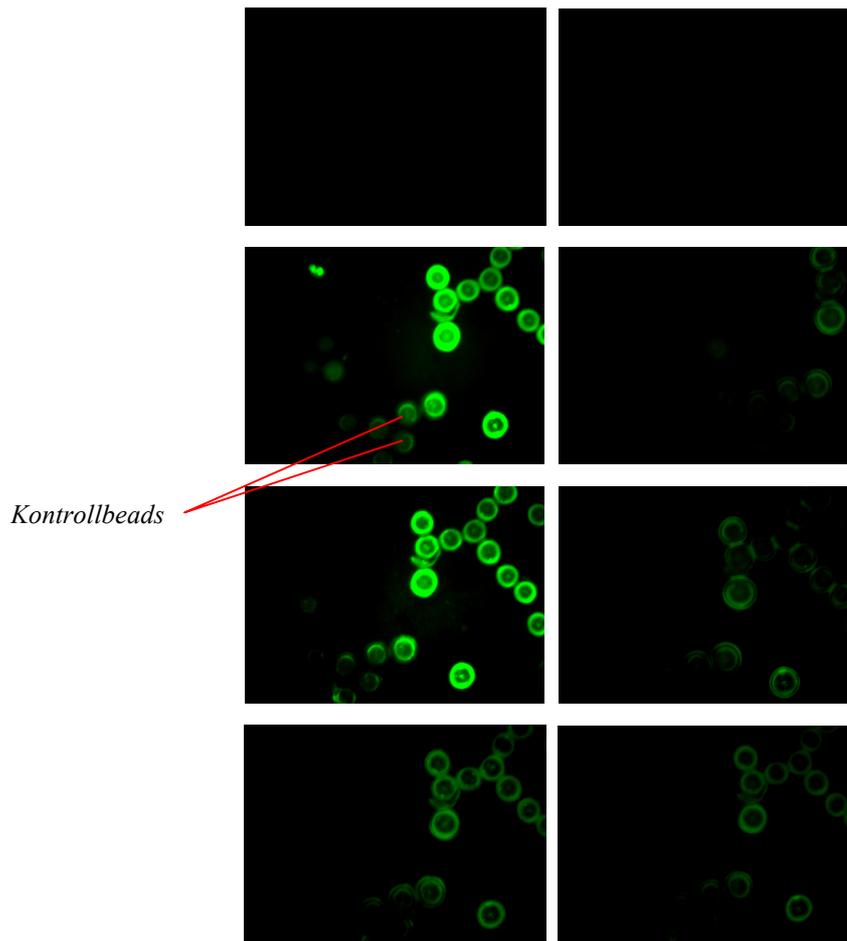


Abb. 8.16: Aufnahmen eines repräsentativen, mit harzgebundenem Ac-SIRIGPGQAF (Peptid B-R03Q08, aus HIV-1 B) belegten Planquadrats. Jeweiliges linkes Bild: Fluoreszenzaufnahmen nach Belegung mit Alexa488-markiertem Sekundärantikörper (anti-humaner IgG (H+L) ex goat); Screening in o.a. Reihenfolge: NHS, RU98010, GE97012; NHS. Das Peptid reagiert deutlich gegen die beiden HIV-positiven Seren. Als interne Negativkontrolle wurden einige mit Ac-WAFTANSYHQ belegte Beads beigemischt. Jeweiliges rechtes Bild: Fluoreszenzaufnahmen nach Behandlung mit pH 1, d.h. Abwaschung des Immunkomplexes. Eine leichte Erhöhung des fluoreszenten Hintergrunds nach dem zweiten NHS-Screening ist feststellbar.

Die Stabilität der Klebmatrix, insbesondere aber die Wiederholbarkeit der immunologischen Tests konnte auf diese Weise nachgewiesen werden. Alle Ergebnisse des Fluoreszenzscreenings von Subtyp-B-Seren mit ausgewählten Modellpeptiden wurden in weiteren Tests auf Basis des bereits bekannten BCIP/NBT-Systems widerspruchsfrei bestätigt. Nimmt man die anderen, nicht durch Immunfluoreszenz getesteten Seren und Peptide dieses Kapitels hinzu, konnten die in Tab. 8.2, umseitig aufgeführten Kreuzreaktivitäten zwischen genetisch bestimmten Epitopen der Seren und den Sequenzen der Peptide semiquantitativ nach Maßgabe der relativen Fluoreszenzintensität bzw. der Intensität des violetten Niederschlags beim BCIP/NBT-System bestimmt und so die Diskrepanz zwischen genetisch bestimmten antigenen Epitopen und den gefundenen Seroreaktivitäten anhand weniger Modellsequenzen verdeutlicht werden.

		HIV <sup>+</sup> Patientenserum (HIV-1-Subtyp B) genetisch bestimmte Epitope der Antikörperbindung			
		<i>GE96002</i> SIHIGPGRAF	<i>GE98002</i> SIHIGPGRAF	<i>GE97012</i> SIHIGPG <u>K</u> AF	<i>RU98010</i> <u>G</u> IHIGPGRAF
Modelldecapeptide (HIV-1-Subtyp B)	<i>B-consensus</i> SIHIGPGRAF	++	-	+	++
	<i>B-R01</i> <u>R</u> IHIGPGRAF	n. best.	+	+	++
	<i>B-R03Q08</i> S <u>I</u> RIGPGQAF	n. best.	○	○	+

Tab. 8.2: serologisch bestimmte Reaktivität ausgewählter Seren und Decapeptide: ++ sehr stark, + stark, ○ mäßig, - nicht reaktiv. Die geringe zur Verfügung stehende Menge von *GE96002* ließ keine weiteren Tests zu. Die Diskrepanz zwischen Geno- und Serotyp tritt besonders bei *GE98002* zu Tage.

Abweichungen von der HIV-1-B-consensus-Sequenz sind unterstrichen. Es fällt auf, dass die HIV-1-B-Seren *GE96002* und *GE98002* gegenüber der Consensus-Sequenz völlig unterschiedlich reagieren, obwohl das V3-Kernepitop beider Seren übereinstimmt. Grund hierfür könnten ein niedriger Titer des Serums sein, zumal dieses Serum die qualitativ schwächste Reaktivität aller vier getesteten Seren aufweist.

Zudem wären ohne das Phänomen „Kreuzreaktivität“ keine weiteren serologischen Reaktionen zu erwarten, da sich Peptide bzw. Seren um mindestens eine Aminosäure im V3-Kernepitop unterscheiden. Eine Abweichung am N-terminalen Ende scheint dabei eine geringere Auswirkung zu haben als eine Änderung um das GPG-Motiv: *GE97012* mit Lysin als der dem GPG-Motiv folgender Aminosäure reagiert schwächer als *RU98010*, die Arginin als reguläre Aminosäure enthält. Ein vergleichbares Bild ergibt sich bei den Peptiden: *B-R03Q08* mit Glutamin an dieser Position reagiert schwächer als *B-R01* mit Arginin als diesem Motiv nachfolgender Aminosäure. Das hier bestimmte Reaktivitätsmuster demonstriert mit Ausnahme des Serums *GE98002* somit erneut die Bedeutung des zentralen hochkonservierten Motivs GPGR von V3. Eine weiter führende serologische Evaluation an Hand einer 80640 Peptide umfassenden Peptidbibliothek gegenüber Serenpools verschiedener HIV-1-Subtypen des hier entwickelten iterativen Verfahrens zur Immunfluoreszenz ist Gegenstand der Kapitel 9 bzw. 10 der vorliegenden Arbeit.

## 8.7 Gesamtüberblick aller durchgeführten Entwicklungs- und Optimierungsschritte des Immunfluoreszenzassays

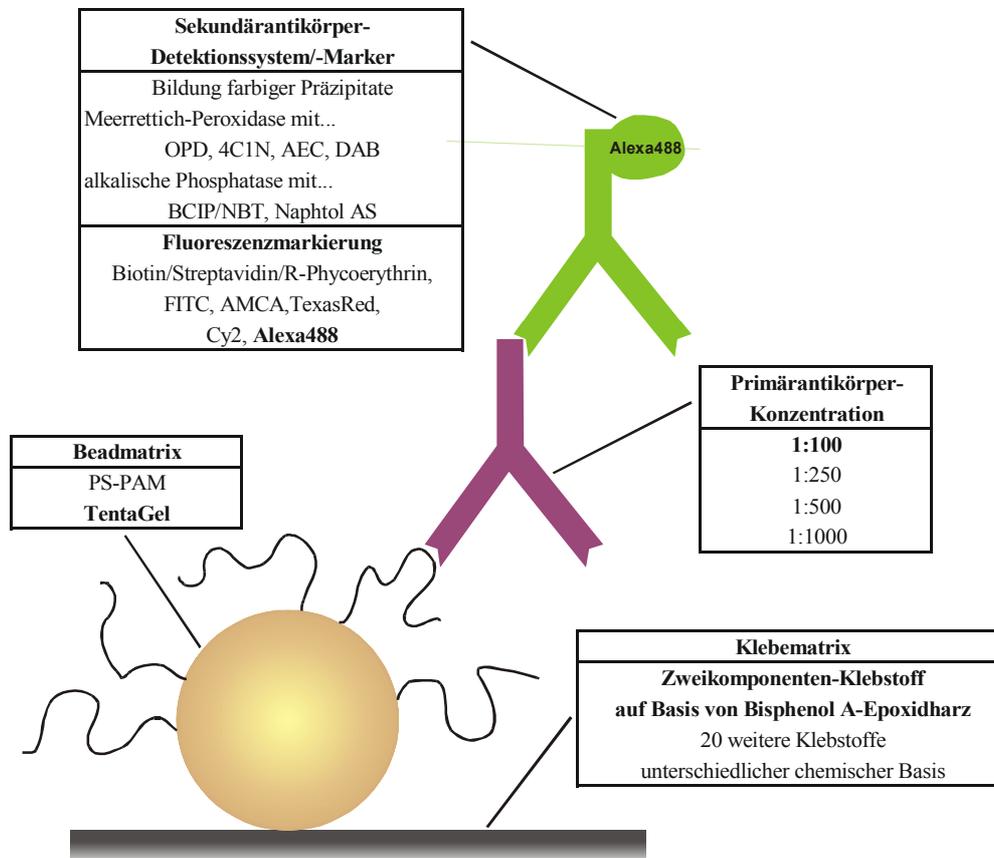


Abb. 8.17: Gesamtdarstellung aller für die Entwicklung des Immunfluoreszenzassays durchgeführten Entwicklungs- und Optimierungsschritte. Die jeweils beste der getesteten Alternativen ist fett hervorgehoben. Weitere Parameter, wie etwa Pufferkonsistenz, -konzentration oder Inkubationsdauer der Antikörper wurden Standardprotokollen<sup>[130]</sup> entlehnt.



# 9      **Deutschsprachige Fassung der Veröffentlichung über den kombinatorischen Immunassay zur Charakterisierung verschiedener HIV-1-Subtypen an Hand ihrer Seroreaktivität**

## **Ein iteratives kombinatorisches Verfahren als Grundlage einer serologischen Klassifikation verschiedener HIV-1-Subtypen**

von **Christian Hoffmann, Christoph Königs, Ursula Dietrich, Michael Karas und  
Christian Griesinger**

**Kurzinhalt:** Die genetisch definierten Subtypen von HIV-1 stimmen im Allgemeinen nicht mit serologisch ermittelten Gesamtheiten überein. Für die Entwicklung eines Impfstoffes jedoch ist die Gruppierung verschiedener Subtypen von HIV hinsichtlich serologischer Beziehungen entscheidend. Wir stellen hiermit eine Methode vor, die die Bestimmung immunologischer Beziehungen zwischen verschiedenen HIV-Subtypen unabhängig von genetischen Subtypen gestattet. Zu diesem Zweck wurde ein Verfahren zum wiederholten Screening einer kombinatorischen Peptidbibliothek mit Serenpools verschiedener HIV-1-Subtypen entwickelt, das eine Reaktivitätsgruppierung der identifizierten Sequenzen ermöglicht.

Wiederholtes Screening der festphasengebundenen kombinatorischen Bibliothek wird durch Klebung der peptidbeladenen Beads als Monolage auf eine Petrischale und Inkubation der Bibliothek mit den Patientenseren ermöglicht. Gebundene Antikörper werden mit einem Sekundäntikörper detektiert, der mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert ist; reaktive Beads werden dann mittels Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert.

Der Immunkomplex wird durch Erniedrigung des pH-Werts auf 1 entfernt, und der nächste Screeningschritt kann durchgeführt werden. Die kombinatorische Bibliothek wird chemisch codiert, um eine schnelle und zuverlässige Sequenzierung durch die MALDI-Massenspektrometrie zu ermöglichen. Über die Methode zur Erzeugung des Codierungsmusters wurde bereits berichtet [C. Hoffmann, D. Blechschmidt, R. Krüger, M. Karas, C. Griesinger, *J. Comb. Chem.*, zur Veröffentlichung akzeptiert; ebenso Kap. 6 und 7 der vorliegenden Arbeit].

**Einführung:** [Grundlagen und Bedeutung eines neuen Ansatzes für die serologische Klassifikation von HIV-1 wurden bereits in den Kapiteln 1, 2 und 4 dargelegt.] Unsere Methode beruht auf einem breiteren Spektrum von Antikörpern und Peptiden als der ursprüngliche Ansatz.<sup>16</sup> Wir verwenden HIV-1-positive Seren verschiedener Subtypen als Antikörperquelle und bedienen uns dabei des HIV-spezifischen Antikörperreservoirs, das durch diese Infektion hervorgerufen wird. Seitens der Peptide setzten wir eine kombinatorische Peptidbibliothek mit 80640 Spezies ein, die die genetische Variabilität der Spitze der V3-Schleife von gp120 aus HIV-1 widerspiegelt<sup>1</sup>. Diese harzgebundene kombinatorische Bibliothek wird mittels des „Split, mix & combine“-Verfahrens von Lam<sup>17</sup> und Furka<sup>18</sup> synthetisiert; sie enthält ein definiertes Peptid pro Bead. Um eine schnelle, zuverlässige und weniger aufwändige Identifikation reaktiver Peptidsequenzen von einem bestimmten ausgewählten Bead im Vergleich zu herkömmlichen Kettenabbaufverfahren nach Edman zu erreichen, wird die Peptidbibliothek chemisch codiert. Dies gelingt mittels adaptiver Einführung Kettenabbruch erzeugender Sequenzen.<sup>19</sup> Jedes einzelne festphasengebundene Peptid wird durch die gezielte Erzeugung von Kettenabbruchsequenzen („Capping“) eindeutig codiert; jeder Cappingschritt nimmt hierbei fünf Prozent der Harzbelegung in Anspruch. Diese Codierung wird synthetisch durch den Einsatz von Mischungen aus der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure und der zugehörigen permanent blockierten Aminosäure im Verlauf der kombinatorischen Synthese bewerkstelligt. Als Cappingreagenzien werden dabei N-terminale Schutzgruppen wie Acetyl- oder Benzoyl- verwendet. Somit enthält ein einzelnes Bead sowohl das Hauptpeptid als auch einen spezifischen Satz an Terminationssequenzen, die massenspektrometrisch leicht nachgewiesen werden können.

Das Computerprogramm *Biblio* erfüllt zwei Aufgabenstellungen: zum einen berechnet es die minimale Anzahl für eine eindeutige massenspektrometrische Sequenzierung notwendiger Cappingsequenzen und Cappingreagenzien; dieser Vorgang wird als Codierung bezeichnet. Zum zweiten decodiert es die in einem Einzelbead-Massenspektrum gegebenen Massen zur gewünschten Sequenz des Hauptpeptids (nachdem einzelne Beads in den biologischen Tests als reaktiv bestimmt wurden). Die Decodierung läuft wie folgt ab: Man ruft das gespeicherte, von *Biblio* codierte Schema der zugrunde liegenden Bibliothek auf und gibt die im MALDI-Massenspektrum gefundenen monoisotopischen Massen im Dialogfeld für die Sequenzermittlung ein. In der vorliegenden Programmversion muss der Massenbeitrag des hexapeptidischen Linkers jedoch vorher manuell subtrahiert werden. Des Weiteren zeigt

sich empirisch, dass das Hauptpeptid in der Regel die größte Signalintensität zukommt; der Beitrag der Acetylierung des mutmaßlichen Hauptpeptids (42 D) muss nämlich ebenfalls manuell subtrahiert werden. Ein Algorithmus, der die Beiträge des Linkers und der Acetylierung des Hauptpeptids berücksichtigen kann, ist in der nächsten Programmversion von *Biblio* implementiert.

Aus den in dieser Weise korrigierten Massen berechnet das Programm 100 Sequenzvorschläge, die mit Qualitätsfaktoren gewichtet sind, die die Übereinstimmung der berechneten Massen der einzelnen Capping- und Hauptpeptide mit den gemessenen Massen wiedergeben. Ein Qualitätsfaktor von 100 % bedeutet eine völlige Übereinstimmung aller gemessenen Massen mit den durch *Biblio* für diese Sequenz berechneten Massen. Die Massenbestimmungsgenauigkeit bei den gemessenen Spektren beträgt  $\pm 1$  D; um zufällige Messungenauigkeiten berücksichtigen zu können, schlägt *Biblio* auch Sequenzen vor, deren Massen stärker als  $\pm 1$  D von der berechneten Masse abweichen. Diesen kommt ein entsprechend niedrigerer Qualitätsfaktor zu. Die Sequenz mit dem höchsten Qualitätsfaktor gibt die richtige Sequenz wieder.

Es zeigte sich ferner, dass *Biblio* für alle erfolgreich decodierten Sequenzen, die in den folgenden Abschnitten beschrieben sind, nur je eine einzige Sequenz mit einem Qualitätsfaktor von 100 % vorschlug; dies galt auch dann, wenn ein Massenspektrum neben den Haupt- und Codierungssequenzen zusätzliche Signale enthielt (siehe Abb. 9.1). Nachdem alle Massen in *Biblio* eingegeben wurden, berechnete das Programm auch mit diesem überbestimmten Satz von Massen nur eine Sequenz, der ein Qualitätsfaktor von 100 % zukam. Daher wurden nur Sequenzen als richtig angesehen, denen *Biblio* einen Qualitätsfaktor von 100 % zuordnete.

Dieser Prozess wurde entwickelt, um einen unnötigen Verlust an Hauptpeptid pro Bead zu unterbinden; ein solcher Verlust könnte die biologischen Tests stören. Darüber hinaus ist unsere Methode zuverlässig, schnell und erfordert im Vergleich zu herkömmlichen Edman-Abbau keine spezielle Instrumentierung.

Zur Identifikation einer limitierten Anzahl an Peptidsequenzen, die für eine effiziente, auf Reaktivität beruhenden Serotypisierung geeignet sein könnten, sind nur hochreaktive Peptidsequenzen von Interesse. Somit war es notwendig, die gegebene Bibliothek wiederholt mit Seren verschiedener genetischer Subtypen zu screenen. Anstelle einzelner Seren verwendeten wir Serenpools, um die mittlere Affinität der individuellen Patientenserum eines bestimmten Subtyps von HIV-1 hinsichtlich der einzelnen festphasengebundenen Peptide zu

bestimmen und qualitativ in Form der Fluoreszenzintensität auszudrücken, die durch einen mit einem fluoreszenten Farbstoff markierten Sekundärantikörper hervorgerufen wird. Dieser bindet am Serumantikörper, der wiederum an einer reaktiven Peptidsequenz bindet.

Die geforderte Wiederholbarkeit der Screeningprozedur erforderte einerseits eine einfache Wiedererkennbarkeit der Beads, die in einem Screeningschritt identifiziert wurden und andererseits eine vollständige und einfache Entfernbarekeit des Immunkomplexes nach dem Screeningschritt. Es war daher notwendig, die Beads permanent an die Oberfläche der Petrischale zu binden. Dies wurde durch Klebefixierung mit einem stabilen und inerten Epoxidklebstoff umgesetzt.

Der von uns entwickelte Klebeprozess minimiert den notwendigen Verlust an Beadoberfläche, der, durch mikroskopische Vermessung bestimmt, bei nur etwa 9 % liegt (nicht gezeigt); nichtsdestotrotz hafteten die Beads fest und wurden nur zur MALDI-massenspektrometrischen Untersuchung abgelöst. Ein Millimeterraster auf dem Boden der Petrischale ermöglichte eine leichte Wiederfindbarkeit reaktiver Beads.

## **Ergebnisse und Diskussion**

**Codierte Synthese der Decapeptidbibliothek.** Die Peptide der Bibliothek umfassen die genetische Variabilität der V3-Schleife des viralen Hüllproteins gp120 der Subtypen A bis F.<sup>1</sup> Jede Aminosäure der Bibliothek wurde unter der Bedingung ausgewählt, dass sie in mindestens einem Subtyp zu mindestens fünf Prozent aller bekannten Sequenzen auftritt. Dieses begrenzt die Größe der Bibliothek auf relevante Aminosäuresequenzen; weitere Gründe sind die begrenzten zur Verfügung stehenden Mengen an Patientenseren und die synthetische Handhabbarkeit der Bibliothek. Der Einsatz einer völlig randomisierten Bibliothek wurde ebenfalls nicht in Betracht gezogen, da sich in Patientenseren auch Antikörper befinden, die nicht spezifisch für eine HIV-Infektion sind. Die Decapeptidbibliothek besteht aus 80640 Spezies und ist in Tabelle 9.1 (umseitig) aufgeführt.

Aminosäurepositionen									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S	I <sup>2</sup>	H	I <sup>2</sup>	G	P	G	R <sup>5</sup>	A	F
R	T <sup>3</sup>	R	L <sup>1</sup>		L		Q <sup>3</sup>	V	L
G	V <sup>3</sup>	T	M <sup>1</sup>		Q		K <sup>2</sup>	T	Y
K	M <sup>1</sup>	P			S		H <sup>4</sup>		W
		S			T				
		N							
		Q							

Tab. 9.1: Schema der Decapeptidbibliothek mit 80640 Mitgliedern. Die codierenden Positionen sind durch hochgestellte Indices angegeben. Die Cappingreagenzien sind in Tabelle 9.2 aufgeführt.

Gruppe	Modifikation	Abkürzung
1	Acetyl-	Ac-
2	Benzoyl-	Bz-
3	Formyl-	For-
4	2-Naphtoyl-	Naph-
5	4-Acetaminobenzoyl-	Aab-

Tab. 9.2: N-terminale Cappinggruppen, die für die Synthese der codierten Bibliothek verwendet wurden. Jede permanent blockierte Aminosäure wird zu fünf Prozent bezüglich der Harzbelegung eingeführt.

Die Bibliothek wird mit *Biblio* codiert. Es werden nur drei Cappingpositionen, die durch hochgestellte Indices markiert sind, benötigt. Die verwendeten Cappingreagenzien sind in Tabelle 2 benannt. Jede permanent geschützte Aminosäure wird mit einem Anteil von fünf Prozent bezüglich der Harzbelegung eingeführt; dieser Anteil erwies sich als hinreichend für eine massenspektrometrische Analyse. Die Bibliothek wurde nach dem Fmoc-Verfahren<sup>20</sup> auf TentaGel-HMB-Harz synthetisiert. An den Stellen, an denen Capping notwendig wurde, wurden Gemische aus der Fmoc-geschützten Aminosäure und der entsprechenden permanent geschützten Aminosäure eingesetzt. Ein hexapeptidischer Linker,  $\beta$ Ala-Pro-Pro-Pro-Arg- $\beta$ Ala, wurde zwischen Harz und C-Terminus des funktionalen Decapeptids aus massenspektrometrischen Gründen eingeführt.

Die Synthese der Bibliothek wurde nach der „One Bead One Peptide“-Methode<sup>17,18</sup> durchgeführt. Vor der Entschützung der Seitenketten der Peptide, wurden die N-Termini der Hauptpeptide acetyliert. Danach wurden die Seitenkettenschutzgruppen entfernt und ein Aliquot des Harzes, das etwa 120000 Beads enthielt, auf eine Glaspetrischale (Durchmesser 70 mm) mit einem Epoxidklebstoff aufgeklebt, wie im experimentellen Anhang ausgeführt.

Jedes Peptid der Bibliothek, die 80640 Peptide enthält, liegt somit statistisch gesehen 1.5fach auf der Petrischale vor. Ein Millimeterraster, auf der Rückseite der Petrischale angebracht, stellte die Wiedererkennbarkeit einzelner Beads sicher.

Die Belegungsdichte der Beads auf der Petrischale wurde als Kompromiss zwischen einer notwendigen Minimierung des Serumverbrauchs einerseits und dem minimalen Flächenbedarf eines eindeutig zu identifizierenden Beads andererseits gewählt. Unglücklicherweise neigten etwa zehn Prozent aller Beads während des Klebevorgangs zum Verklumpen, selbst als niedrigere Belegungsdichten gewählt wurden. Diese Beads waren immunologischen Tests somit nicht zugänglich.

**Screeningstrategie der Decapeptidbibliothek.** Die Decapeptidbibliothek wurde insgesamt sechs Screening- und Waschzyklen unterworfen. Zunächst wurde die Bibliothek mit dem Primärantikörper belegt; die Bindung der Primärantikörper mit einem anti-humanem Sekundärantikörper, der mit dem fluoreszenten Farbstoff Alexa488 markiert ist, wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Reaktive Beads wurden fotografiert und ihre Position an Hand des Hintergrundrasters notiert. Der Immunkomplex wurde dann durch Waschung mit 6 M Guanidinhydrochlorid, das mit Salzsäure auf pH 1 eingestellt war, entfernt. Jedes zuvor erkannte Bead wurde erneut fotografiert, um falsch positive Beads auszuschließen. Nachfolgend konnte der zweite Screeningcyclus durchgeführt werden.

Die Abfolge der Serenpools der vier betrachteten Subtypen von HIV-1 bezieht sich auf die absteigende globale Bedeutung der Subtypen: Subtyp B ist der am häufigsten vorkommenden und besitzt die größte genetische Variabilität, gefolgt von den Subtypen C, E und A. Die sechs Cyclen gestalteten sich somit wie folgt:

- I. Screening mit Normal-Humanserum (NHS), um die optimalen Belichtungsbedingungen für die Immunfluoreszenzmikroskopie zu ermitteln,
- II. Screening eines Pools von sieben HIV-1-B-Seren,
- III. Screening eines Pools von fünf HIV-1-C-Seren,
- IV. Screening eines Pools von fünf HIV-1-E-Seren,
- V. Screening eines Pools von fünf HIV-1-A-Seren, und
- VI. Screening mit NHS, um falsch positive Beads sicher auszuschließen.

Insgesamt konnten 37 Beads mit intensiver Immunfluoreszenz identifiziert werden. Diese Beads wurden nach Anfeuchten der entsprechenden Gitterposition gepickt und mittels MALDI-Massenspektroskopie analysiert. 36 Beads konnten erfolgreich analysiert und deren Sequenzen von *Biblio* decodiert werden. Alle Sequenzen und deren Reaktivitätsmuster mit den verschiedenen Serenpools sind in Tabelle 9.3 (umseitig) wiedergegeben. Eine typische Immunfluoreszenzaufnahme eines reaktiven Beads und seine zugehöriges MALDI-Massenspektrum mit Decodierung durch *Biblio* sind in Abb. 9.1 dargestellt.

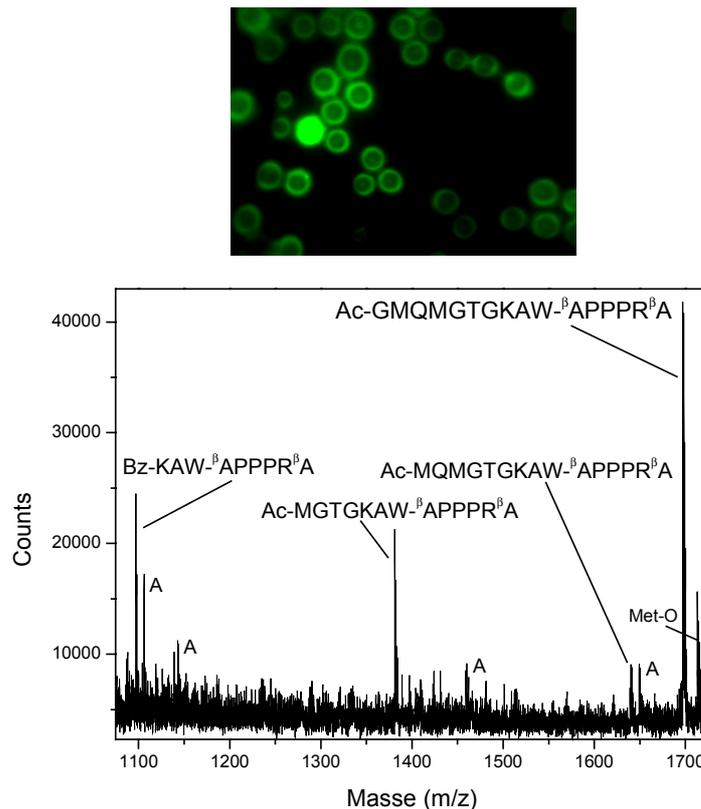


Abb. 9.1: Typische fluoreszenzmikroskopische Fotografie eines reaktiven Beads (oben). Dieses Bead wurde entfernt und einer MALDI-massenspektrometrischen Analyse (unten) unterzogen. Das Hauptpeptid, Ac-GMQMGTGKAW, und seine drei codierenden Peptide wurden nachfolgend durch *Biblio* mit einem Qualitätsfaktor von 100 % eindeutig identifiziert. Die mit „A“ gekennzeichneten Peaks wurden bei der Decodierung ebenfalls berücksichtigt, lieferten aber z.T. wesentlich niedrigere Qualitätsfaktoren. Hauptsächliches Nebenprodukt ist ein Peak, der aus der Oxidation von Methionin im Hauptpeptid resultiert (angezeigt durch „Met-O“).

**Statistische Analyse des Reaktivitätsmusters der gefundenen Peptide mit den verschiedenen Serenpools.** Überraschenderweise traten die klassischen Motive GPGR bzw. GPGQ nur je zwei mal in den 36 Sequenzen auf, die in Tabelle 9.3 (umseitig) gegeben sind. Dies steht im Kontrast zum überwältigenden Anteil dieser Motive in den genetischen Daten aller HIV-1-Subtypen<sup>1</sup>, die V3-Region betreffend. Es ist offensichtlich, dass eine Auswahl

von lediglich vier Peptiden dieser Liste ausreicht, eine Differenzierung der HIV-1-Subtypen vorzunehmen.

Sequenz	Serenpools von HIV-1 Subtyp				Σ
	A	B	C	E	
Ac-KMQMGTGKTF	+		+		2
Ac-SMQMGLGKTW				+	1
Ac-KMQMGPQGW			+		1
Ac-KIPMGTGRAE			+		1
Ac-GMPMGSGQGW	+		+		2
Ac-GIPMGQGHTW	+		+		2
Ac-GMPMGTGHTL			+		1
n. best.		+	+		2
Ac-KIPMGTGHVF				+	1
Ac-SVQMGTGHTW	+		+	+	3
Ac-STRMGTGQAL	+	+	+	+	4
Ac-SMTLGPGRGW	+				1
Ac-GMQMGTGKAW		+	+		2
Ac-GMQMGPGHAF			+	+	2
Ac-SMSLGLGHAW	+				1
Ac-KMTMGQGRAW	+			+	2
Ac-RMRIGTGHTY				+	1
Ac-SIRMGTGRGW	+				1
Ac-KIRIGTGRTL				+	1
Ac-GMRMGQGHVL	+				1
Ac-SVNMGLGRGW	+			+	2
Ac-GMPLGTGKTF	+			+	2
Ac-RTRIGPGRTY	+			+	2
Ac-GIRMGPQAF	+				1
Ac-KIQLGSGHTF	+				1
Ac-KTNMGTGHTL	+		+	+	3
Ac-SIHMGTGQVW				+	1
Ac-SMQLGPGKTF	+		+		2
Ac-GMPMGTGQAW	+				1
Ac-KIQMGTGKAW		+	+	+	3
Ac-KTRMGQGQGW			+		1
Ac-RMTMGQGHVW	+				1
Ac-KMQLGQGQTF	+		+	+	3
Ac-KVQMGPQKTF	+				1
Ac-KMHIGTGQAW	+			+	2
Ac-KMQMGTGKVL				+	1
Ac-RMPMGTGHTY	+		+		2

Tab. 9.3: Kreuzreaktivitätsmuster aller hochreaktiven Peptide, die mittels ihrer Fluoreszenzreaktivität gefunden wurden. Die Sequenz eines Beads konnte nicht ermittelt werden.

Eine statistische Analyse des gefundenen Reaktivitätsmusters wurde auf zwei Arten durchgeführt: zum einen wurde eine Hauptkomponentenanalyse zu dem Zweck vorgenommen, Peptidsequenzen gemäß relevanter Motive zu gruppieren. Darüber hinaus erfolgte eine Analyse mittels neuronaler Netze, um individuelle Aminosäurepositionen zu bestimmen, die sich als entscheidend für die experimentell bestimmten Reaktivitätsmuster mit den Serenpools erweisen.

**Hauptkomponentenanalyse (PCA).** Die Hauptkomponentenanalyse wurde für die Reaktivitäten der Serenpools A, C und E durchgeführt. Das Reaktivitätsmuster von Serenpool B enthielt nur vier reaktive Sequenzen, zuwenig für eine signifikante Analyse. Berücksichtigt man alle Kreuzreaktivitäten der 36 Sequenzen, kommen für eine PCA des Pools A 23 Peptide, für Pool C 16 und für Pool E 17 Sequenzen in Betracht. Die Ergebnisse der PCA sind in Hauptkomponentendiagrammen dargestellt; in allen drei Fällen erwiesen sich nur die Korrelationen zwischen den Hauptkomponenten 1 und 2 bzw. 1 und 3 als signifikant. Somit resultierten zwei PCA-Diagramme pro Serenpool.

**HIV-1-Serenpool A.** Abb. 9.2 (umseitig, oben) zeigt das Korrelationsdiagramm zwischen den Hauptkomponenten 1 und 2. Die Sequenzen konnten in drei Cluster gruppiert werden. Ein Cluster enthält N-terminal nur S und G, gefolgt von einem MXM-Motiv mit X = R, P oder Q. Die folgenden Positionen treten heterogen auf. Der zweite Cluster enthält ausschließlich K als erste Aminosäure, erneut gefolgt von einem MXM-Motiv, aber mit einer höheren Varianz in allen drei Motivpositionen, wie alle Aminosäuren des Clusters. Schließlich konnte ein dritter Cluster identifiziert werden, der ein RMXM-Motiv enthält, hier mit X = P und T. Das Korrelationsdiagramm der Hauptkomponenten 1 und 3 (Abb. 9.2, umseitig, unten) enthält fünf kleiner Cluster. Der erste wird N-terminal von GMXM dominiert, aber mit Ausnahme von Position vier erwiesen sich alle Positionen als stärker divergent. Darüber hinaus konnten kleiner Cluster identifiziert werden, die aus zwei oder drei Sequenzen mit den Motiven MXL, SMXLGPG, KMXM oder RMXM bestehen.

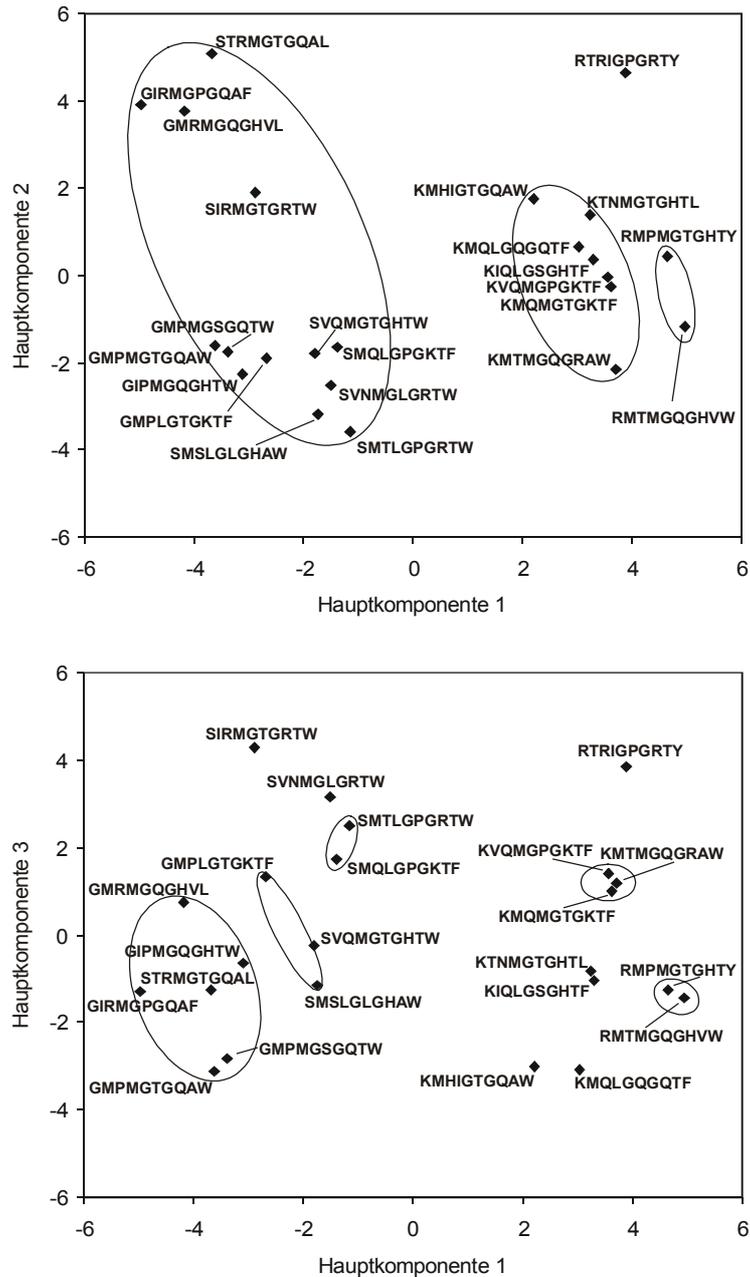


Abb. 9.2: Hauptkomponentenanalyse der Peptide, die sich als reaktiv mit den Serenpools HIV-1-A erwiesen haben. Gegeben sind die Korrelationsdiagramme der Hauptkomponenten 1 und 2 (oben) bzw. 1 und 3 (unten).

**HIV-1-Serenpool C.** Abb. 9.3 (umseitig) zeigt die beiden Korrelationsdiagramme der PCA des Subtyp C-Reaktivitätsmusters. Das Diagramm der Hauptkomponenten 1 und 2 identifiziert klar zwei Cluster, die erneut die N-terminalen Motive GMXM und KMXM enthalten. X ist hier hauptsächlich P und Q. Außenseitersequenzen enthalten das Tripeptidmotiv TRM. Erneut scheint die Bedeutung der C-terminalen Aminosäuren angesichts ihrer großen Variabilität in den Clustern nicht groß zu sein. Dieses Bild setzt sich im Korrelationsdiagramm der Hauptkomponenten 1 und 3 fort. Die zuvor als

Außenseitersequenzen identifizierten, das Motiv TRM enthaltenden Peptide sind in die zwei identifizierten Cluster eingebunden. Deren Hauptmotive können als GMXM / SMXM bzw. KMXM beschrieben werden.

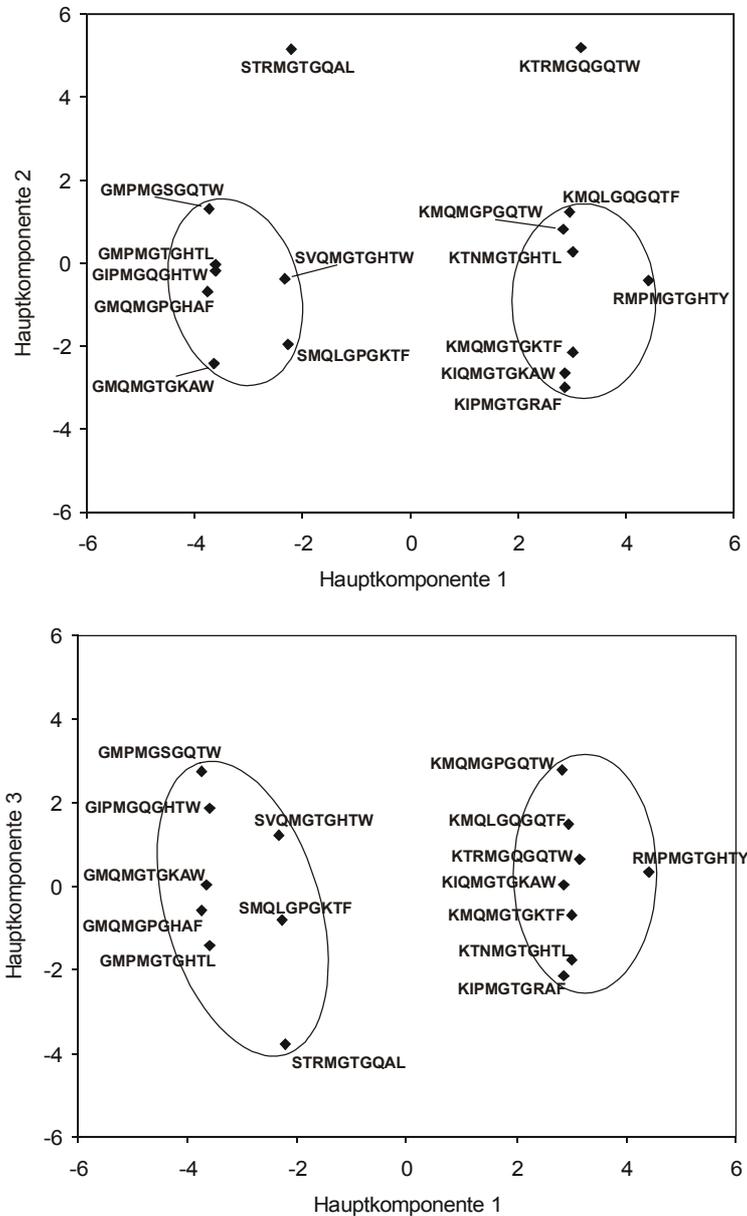


Abb. 9.3: Hauptkomponentenanalyse der Peptide, die sich als reaktiv mit den Serenpools HIV-1-C erwiesen haben. Gegeben sind die Korrelationsdiagramme der Hauptkomponenten 1 und 2 (oben) bzw. 1 und 3 (unten).

**HIV-1-Serenpool E.** Abb. 9.44 schließlich zeigt in beiden Korrelationsdiagrammen drei Cluster. Der erste Cluster enthält ein SXXM / GXXM-Motiv, hauptsächlich mit Q, V oder P als variable Aminosäuren. Der zweite Cluster enthält erneut das KMXM-Motiv, aber mit stärkerer Varianz der Aminosäuren (H, I, L, T, N), auch in der ersten Methionin-Position. Ein

dritter, kleinerer Cluster rundet das Bild mit den Motiven KXRI bzw. RXRI ab. Alle anderen Positionen erwiesen sich ebenfalls als heterogen.

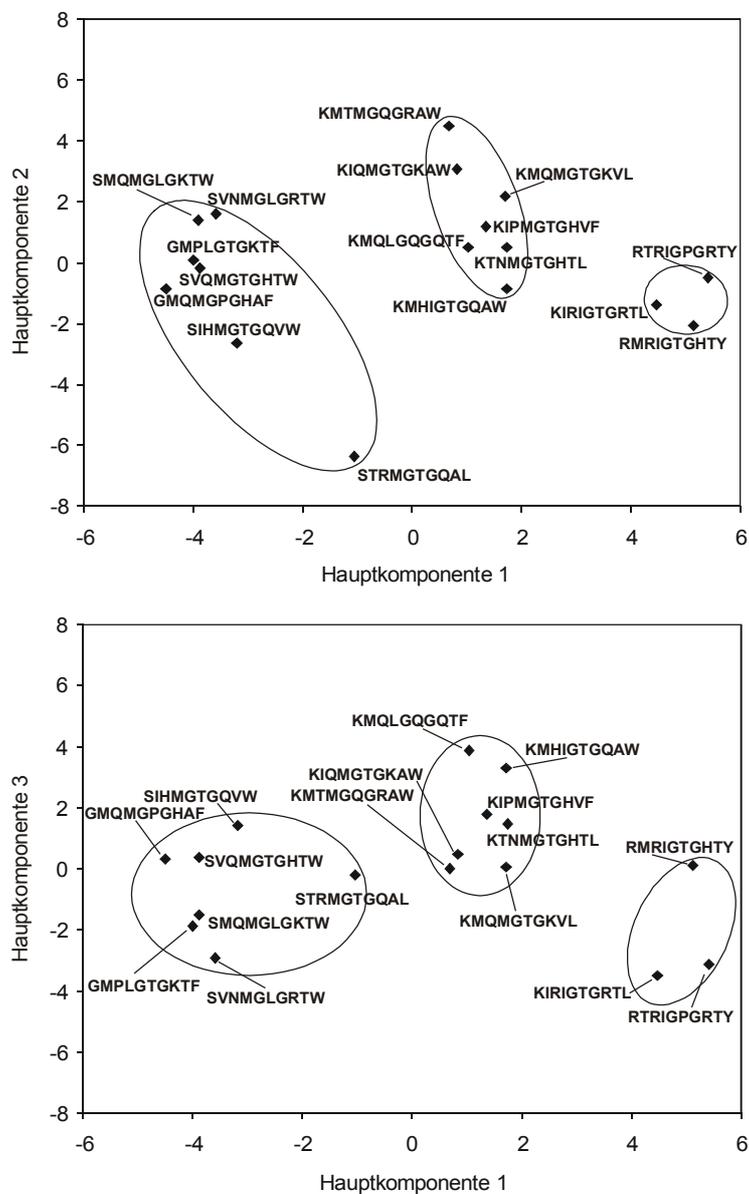


Abb. 9.4: Hauptkomponentenanalyse der Peptide, die sich als reaktiv mit den Serenpools HIV-1-E erwiesen haben. Gegeben sind die Korrelationsdiagramme der Hauptkomponenten 1 und 2 (oben) bzw. 1 und 3 (unten).

Somit scheinen nur die ersten vier Aminosäurepositionen der Decapeptide an der Spitze der V3-Schleife einen signifikanten Einfluss für die Reaktivität der Peptide hinsichtlich der Reaktivität mit den Serenpools verschiedener genetischer Subtypen haben. Mit der Ausnahme eines kleinen Clusters im Subtyp A, spielte das klassische Motiv GPG keine entscheidende Rolle im Gegensatz zu den genetischen Daten.<sup>1</sup> Die serologischen Reaktivitätsdaten indizieren vielmehr eine viel höhere Variabilität der mittleren Position: alle fünf Aminosäuren

unserer Bibliothek treten stark auf; dies ist im Gegensatz zur Dominanz von P in den genetischen Daten.

Interessanterweise sind die klassischen V3-Signalmotive GPGR und GPGQ in den 36 hochreaktiven Sequenzen dramatisch unterrepräsentiert. Dies könnte ein Ergebnis der Identifikation anderer bindenden Epitope der Serenantikörper sein. Daher wurde die Sequenzdatenbank von HIV<sup>23</sup>, die alle bekannten Sequenzen enthält, nach motivanalogen Sequenzähnlichkeiten (Tri- oder Tetrapeptide) abgesucht. Fünf unserer Untersequenzen konnten als Motive in anderen Regionen des Genoms von HIV identifiziert werden, wenn man die Änderung einer Aminosäure erlaubt. Exakte Übereinstimmungen von vier Aminosäuren gleichzeitig trat nur ein mal auf. Keine der Sequenzen entstammt der für das virale Hüllprotein codierenden Region *env*. Zwei Motive, VIPM (pr55, Nr. 168-171) und AMQM (p24, Nr. 65-68) aus *gag* korrelieren mit unseren Motiven GIPM und KIPM bzw. GMQM und KMQM. Die Sequenz RMRI (*vif*, Nr. 15-18), eine Sequenz der *vif*-Region, besitzt ein Analogon mit unseren RMRI- oder auch RTRI-Sequenzen. Das Motiv VQM (p31, Nr. 176-178) von *pol* kann mit unseren Motiven SVQM und KVQM in Verbindung gebracht werden. Schließlich ist das GLG-Motiv von *vpr* (*vpr* Nr. 41-43) Teil der wenigen GLG enthaltenden Decapeptidsequenzen. Alle Sequenzmotive in der Datenbank weisen keine Präferenz für einen bestimmten genetischen Subtyp von HIV-1 auf; jedes Motiv kommt in allen bedeutenden Subtypen von HIV-1, den Subtypen A bis G, vor.

**Analyse mittels Neuronaler Netze.** Eine Analyse mittels neuronaler Netze wurde mit dem Programm *Smart*<sup>21</sup> durchgeführt. Es wurde ein dreischichtiges neuronales Netz mit einer verborgenen Schicht und einer sigmoiden Transferfunktion eingesetzt. Die Eingabeschicht enthielt 40 Neuronen, die den acht variierten Aminosäuren entsprechen, die durch je fünf Aminosäureparameter beschrieben sind (sterischer Einfluss, Polarisierbarkeit, van der Waals-Volumen, Hydrophobizität und isoelektrischer Punkt<sup>22</sup> (siehe Tab. 9.4, umseitig).

Die verborgene Schicht enthielt acht, die Ausgabeschicht vier Neuronen, die den vier Serenpools entspricht. Das Netz wurde mit 5 der 36 experimentell bestimmten Sequenzen und 10 der 100 Zufallssequenzen, die als Negativreferenz dienten, trainiert. Die Lernrate wurde zu  $\eta = 0.001$  festgesetzt. Die Ergebnisse der Analyse mittels neuronaler Netze sind in den Abb. 9.5 bis 9.7 dargestellt.

AS	$\Xi^{[a]}$	$\alpha^{[b]}$	$v_v^{[c]}$	$\pi^{[d]}$	$I^{[e]}$
ALA	1,28	0,05	1,00	0,31	6,11
GLY	0,00	0,00	0,00	0,00	6,07
VAL	3,67	0,14	3,00	1,22	6,02
LEU	2,59	0,19	4,00	1,70	6,04
ILE	4,19	0,19	4,00	1,80	6,04
PHE	2,94	0,29	5,89	1,79	5,67
TYR	2,94	0,30	6,47	0,96	5,66
TRP	3,21	0,41	8,08	2,25	5,94
THR	3,03	0,11	2,60	0,26	5,60
SER	1,31	0,06	1,60	-0,04	5,70
ARG	2,34	0,29	6,13	-1,01	10,74
LYS	1,89	0,22	4,77	-0,99	9,99
HIS	2,99	0,23	4,66	0,13	7,69
ASP	1,60	0,11	2,78	-0,77	2,95
GLU	1,56	0,15	3,78	-0,64	3,09
ASN	1,60	0,13	2,95	-0,60	6,52
GLN	1,56	0,18	3,95	-0,22	5,65
MET	2,35	0,22	4,43	1,23	5,71
PRO	2,67	0,00	2,72	0,72	6,80
CYS	1,77	0,13	2,43	1,54	6,35

Tab. 9.4: Aminosäureparameter, die als Eingabeparameter für die Analyse mittels neuronaler Netze verwendet wurden: a) sterischer Anspruch, b) Polarisierbarkeit, c) van der Waals-Volumen, d) Hydrophobizität, e) isoelektrischer Punkt.

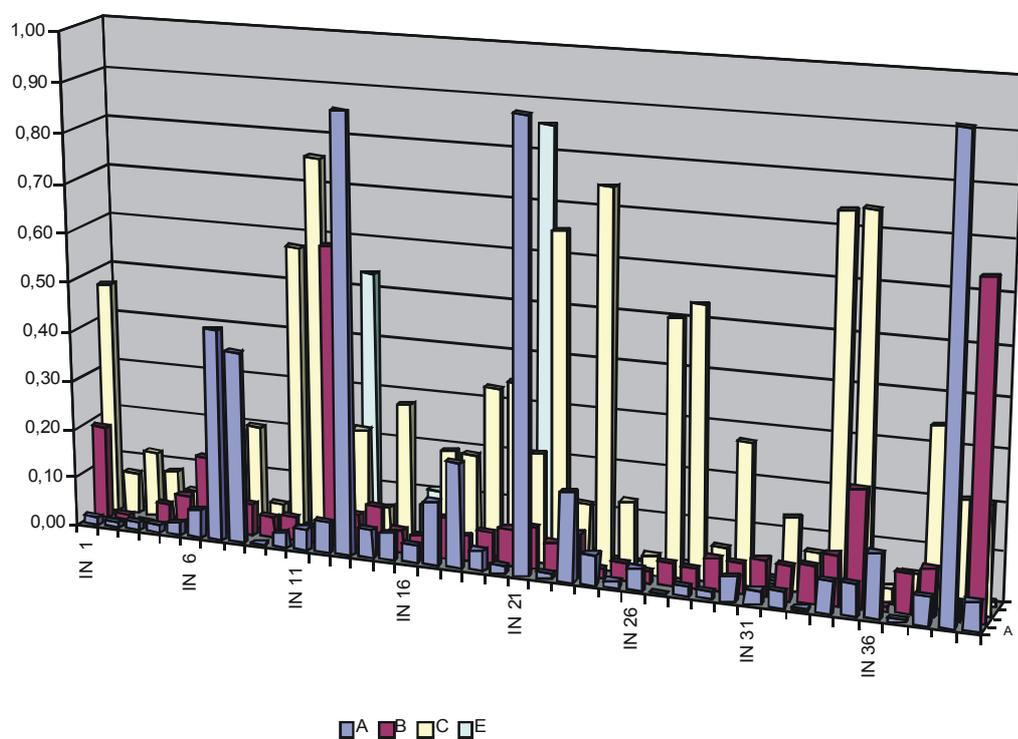


Abb. 9.5: Sensitivitätsdiagramm der 40 Eingabeparameter in Bezug auf die vier Serenpools als Ausgabeparameter. Je fünf Eingabeparameter bestimmen eine Aminosäureposition.

Abb. 9.5 (vorige Seite) gibt einen Gesamtüberblick über die Sensitivität jedes einzelnen Eingabeparameters bezüglich der vier Serenpools. Je fünf Eingabeparameter definieren eine der acht variierten Aminosäuren der Bibliothek. Mehrere Eingabeparameter weisen eine signifikant hohe Sensitivität über 0.70 auf. Die Aminosäureposition 3 (Eingabeparameter 11 bis 15) scheint für alle Serenpools von kritischer Bedeutung zu sein; diese Aussage korreliert mit der hohen Variabilität dieser Position im MXM-Motiv der PCA. Des weiteren wurden hohe Sensitivitäten für Position 6 (Eingabeparameter 21 bis 25) bezüglich dreier Serenpools gefunden. Diese Position enthält die Aminosäuren P, aber auch L, Q, S und T innerhalb des klassischen GPG-Motivs, das in genetischen Daten dominant auftritt. Des weiteren scheinen die Positionen 8 und 9 (Eingabeparameter 26 bis 35) eine kritische, allerdings etwas niedriger signifikante Bedeutung für Serenpool C zu haben. Schließlich tritt die Aminosäureposition 10 (Eingabeparameter 36 bis 40) bezüglich ihrer Bedeutung vor allem für Serenpool A, aber auch E hervor. Die Ergebnisse wurden wie folgt weiter aufgelöst: Abb. 9.6 zeigt die Abhängigkeit der Sensitivitäten der Serenpools A bis E von den individuellen Aminosäurepositionen. Abb. 9.7 schließlich korreliert die Abhängigkeit der Serenpoolreaktivitäten von den fünf einzelnen Aminosäureparametern.

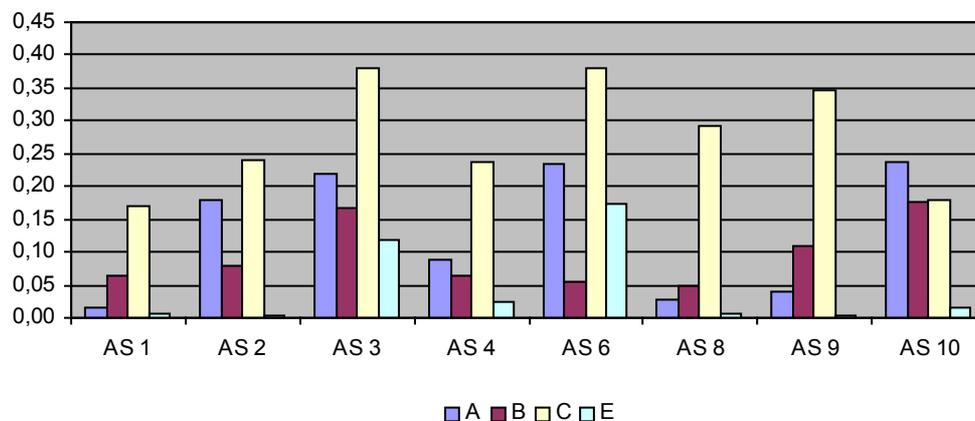


Abb. 9.6: Abhängigkeit der Sensitivität der acht variierten Aminosäurepositionen von den Serenpools

Abb. 9.6 indiziert klar eine starke Wechselbeziehung zwischen allen Aminosäurepositionen der Bibliothek und den Serenpools A und C; deren Sensitivitäten sind in weitaus höherem Maße von den Aminosäuren abhängig als die Sensitivitäten der Serenpools B und E. Es gibt keine eindeutig dominante Aminosäureposition für alle Serenpools, aber die Positionen 3, 6 und 10 haben im Allgemeinen einen relativ starken Einfluss auf die Sensitivitäten, wie auch in Abb. 9.5 gezeigt.

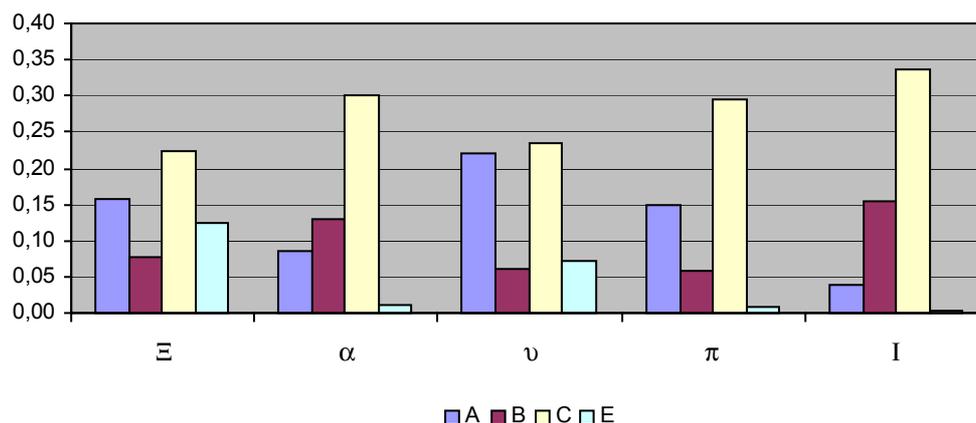


Abb. 9.7: Abhängigkeit der Sensitivität der fünf individuellen Aminosäureparameter von den Serenpools (von links): sterischer Anspruch, Polarisierbarkeit, van der Waals-Volumen, Hydrophobizität, isoelektrischer Punkt

Abb. 9.7 korreliert die Serenpools mit den fünf zur Beschreibung der einzelnen Aminosäuren verwendeten Parametern; erneut erweist sich Serenpool C als in stärkstem Maße von allen Parametern unter den Serenpools abhängig, gefolgt von Serenpool A auf einem niedrigeren Niveau der Signifikanz. Die Seroreaktivität des Serenpools E hingegen wird nur minimal von allen Aminosäureparametern beeinflusst.

All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der HIV-1-Subtyp C, gefolgt von Subtyp A, das größte Differenzierungspotential besitzt, wenn die Aminosäuresequenz der Epitope im Vergleich zu der Consensus-Sequenz variiert wird. Deren Sensitivität nämlich, wie bei der Analyse mittels neuronalem Netz ermittelt, ist in hohem Maße abhängig sowohl von den Parametern, die die Aminosäuren mathematisch beschreiben<sup>22</sup>, als auch der relativen Position jeder einzelnen Aminosäure im Epitop. Zusätzlich zu den Ergebnissen der PCA wurde nicht nur die Position 3 der Decapeptidregion als entscheidend identifiziert, sondern auch die Positionen 6 (X im GXG-Kernmotiv von V3) und die Positionen 8 bis 10, allerdings weniger signifikant.

Die Bedeutung der HIV-1-Subtypen C bzw. A in bezug auf ihr Differenzierungspotential korreliert möglicherweise mit der genetischen Variabilität der verschiedenen Subtypen: Subtyp B ist der bei weitem am stärksten divergente aller bekannten Subtypen<sup>1</sup>; die Variabilität der Subtypen C und A sind viel stärker eingeschränkt. Des Weiteren ist der HIV-1-Subtyp E bekannt als „rekombinanter“ Subtyp, als Kombination von Sequenzen verschiedener Subtypen, die in einen neuen Subtyp gruppiert wurden, der eben als HIV-1-E bezeichnet wurde<sup>1</sup>.

## Schlussfolgerungen

Die hier eingeführte Methode ermöglicht das iterative Screening einer synthetischen kombinatorischen Peptidbibliothek mit polyklonalen Seren, um reaktive und kreuzreaktive Sequenzen schnell und zuverlässig zu identifizieren. Die eingesetzte festphasengebundene Bibliothek erweitert das klassische „One Bead One Peptide“-Schema von Lam<sup>17</sup> und Furka<sup>18</sup> durch eine chemische Codierung, um eine Sequenzierung der Peptide mittels massenspektrometrischer Analyse schneller und einfacher als herkömmlicher Edman-Abbau zu bewerkstelligen. Die Codierung basiert auf der adaptiven Einführung Kettenabbruch erzeugender Sequenzen während der Synthese der Bibliothek. Dieses wird durch die Verwendung von Gemischen der Fmoc-geschützten Aminosäure und seines N-terminal permanent geschützten Derivats erreicht, das mit einem Anteil von fünf Prozent bezüglich der Harzbelegung eingebracht wird. Ein optimales Cappingmuster wird von dem Algorithmus *Biblio* berechnet; die Anzahl notwendiger Cappingschritte und Cappingpositionen wird minimiert, um den Anteil des Hauptpeptids nicht unnötig zu reduzieren. Nach der Identifikation reaktiver Beads werden diese einer MALDI-massenspektrometrischen Analyse unterworfen und das resultierende Signalmuster von *Biblio* zu einer eindeutigen Peptidsequenz decodiert.

Um die Bibliothek wiederholt zu screenen, werden die Beads mit einem Epoxidharzklebstoff auf der Petrischale fixiert. Die Bibliothek wird wiederholt mit human HIV-1-positiven polyklonalen Serenpools gescreent, die von verschiedenen Subtypen entnommen sind, um Seroreaktivitätsmuster zwischen ihnen zu ermitteln; ausschließlich hochreaktive Sequenzen eines minimalen Satzes innerhalb der Bibliothek sind dabei von Interesse. Die Bibliothek selbst ist den genetischen Breite der V3-Schleife des viralen Hüllprotein gp120 von HIV-1 entnommen, die als eine der immunologischen Hauptdeterminanten bekannt ist<sup>4-10</sup>. Die Bindung der Serenantikörper wird durch einen Sekundärantikörper detektiert, der mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert ist. Entfernung des Antikörperkomplexes wird durch Erniedrigung des pH-Werts auf 1 erreicht. 37 hochreaktive Sequenzen konnten ermittelt werden, von denen 36 erfolgreich sequenziert werden konnten. Diese Sequenzen wurden mittels Hauptkomponentenanalyse und neuronalen Netzen analysiert. Mehrere nichtklassische Bindungsmotive konnten so identifiziert werden. Diese Motive finden sich in anderen Regionen von HIV-1, etwa *vpr* oder *vif*, wieder.

Des weiteren reicht eine Auswahl von lediglich vier der 36 gefundenen Sequenzen aus, um eine Differenzierung der HIV-1-Subtypen vorzunehmen.

Die Ergebnisse der Analyse mittels neuronaler Netze deuten außerdem darauf hin, dass es einige kritische Aminosäurepositionen gibt, die einen starken Einfluss auf die Zugehörigkeit zu einem Serotyp besitzen; dies gilt zumindest für die genetisch enger begrenzten Subtypen C und A.

**Experimentelle Daten.** [Die experimentellen Daten sind im Anhang der vorliegenden Arbeit aufgeführt.]

Die Literaturverweise des Kapitels 9 sind als Anhang des in Kapitel 10 gegebenen Manuskripts aufgeführt.

**10 Manuskript der Veröffentlichung über den kombinatorischen Immunassay zur Charakterisierung verschiedener HIV-1-Subtypen an Hand ihrer Seroreaktivität**

**An iterative combinatorial approach as basis for a serological classification of diverse HIV-1 subtypes**

**Christian Hoffmann, Christoph Königs<sup>§</sup>, Ursula Dietrich<sup>§</sup>, Michael Karas<sup>‡</sup>, and Christian Griesinger<sup>\*</sup>**

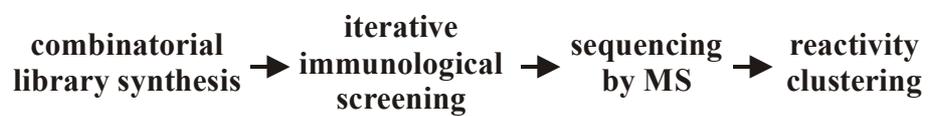
Contribution from the Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, Am Fassberg 11, 37077 Göttingen, Germany

<sup>§</sup> Georg-Speyer-Haus, Paul-Ehrlich-Strasse 42-44, 60590 Frankfurt am Main

<sup>‡</sup> Division of Instrumental Analytical Chemistry, University of Frankfurt, Marie-Curie-Strasse 9, 60439 Frankfurt am Main

<sup>\*</sup>to whom correspondence should be addressed, e-mail: [cigr@mpibpc.mpg.de](mailto:cigr@mpibpc.mpg.de)

**Table of contents graphic**



**Abstract:** Genetically defined subtypes of Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) generally do not correspond to immunological unities or serotypes. For vaccine development, the grouping of divergent HIVs according to serological relationships is fundamental. Here we present a method for the determination of immunological relationships between HIV variants independently of genetic subtypes. A process of iterative screening of a combinatorial peptide library with sera pools of various HIV-1 clades is introduced here, which allows reactivity clustering of the identified sequences.

Iterative Screening of the combinatorial resin-bound library is achieved by glueing the peptide beads of the library as a monolayer on a plate and incubating the plate with patients' sera. Bound antibodies are detected by a secondary antibody labelled with a fluorescent dye, which allows the localization of reactive beads by fluorescence microscopy.

For iterative screening, the immune complexes are removed by lowering the pH, and another screening procedure can be carried out. The combinatorial peptide library is encoded by chemical means for rapid and unambiguous sequencing by MALDI mass spectrometry; the coding pattern is computer-optimized as described earlier [C. Hoffmann, D. Blechschmidt, R. Krüger, M. Karas, and C. Griesinger, *J. Comb. Chem.*, accepted for publication].

**Introduction:** The genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV) is a major obstacle in the development of an effective vaccine against AIDS. Based on the genetic relatedness, several subtypes or clades have been introduced.<sup>1</sup> Nevertheless, analysis of the genetic diversity of HIV-1 is becoming more difficult due to the occurrence of multiple coinfections and intersubtype recombinants.<sup>1-3</sup> Moreover, the relationship between viral genotypes and antigenic variation is not clear. Genetically defined viral clades based on sequence clustering<sup>1</sup> do generally not correspond to immunological unities or serotypes. Peptide immunoassays are commonly based on consensus sequences of a major immunogenic determinant, the V3 loop of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1; unfortunately, they reveal high cross-reactivities between these sequences derived from different clades and the corresponding HIV-1 positive patients' sera.<sup>4-10</sup> Similarly, serological groupings according to the neutralization behaviour of primary isolates of different subtypes of HIV-1 by the patients' sera did not correspond to genetically defined clades.<sup>11-14</sup> Therefore, efforts have been undertaken to identify immunological relationships between HIV variants independently of genetic subtypes. Certain residues in the above mentioned V3 loop responsible for major antigenic differences could be identified by correlating antibody recognition patterns to the amino acid sequences of the target peptides.<sup>7,15</sup> A study based on the reactivity of 21 anti-V3 monoclonal antibodies (mAbs) with 50 V3 peptides derived from HIV-1 subtypes A to H, followed by cluster analyses of the immunological data identified five clusters within the antibodies and seven within the V3-peptides independently of genetic clades.<sup>16</sup> Monoclonal antibody clusters were in accordance with the epitopes the antibodies recognize and peptides within a cluster also revealed unique sequence patterns. Thus, a limited number of immunotypes may exist within the V3 region. However, 20 of the 21 mAbs used were derived from HIV-1 clade B and the availability of mAbs from other subtypes or the use of sera may result in the identification of additional immunotypes.

Our approach therefore is based on a broader spectrum of antibodies and peptides. We used HIV-1 positive sera of different subtypes as antibody source, taking advantage of the HIV-specific antibody repertoire induced by natural infection. On part of the peptides, we utilize a combinatorial peptide library with 80.640 spezies spanning the genetic variability of the decapeptide region at the apex of the V3 loop of gp120 of several genetic clades<sup>1</sup> of HIV-1. This resin-bound combinatorial library ist synthesized by the "split, mix & combine" approach of Lam<sup>17</sup> and Furka<sup>18</sup>, and contains one defined peptide per single bead. For a quick, reliable and less expensive identification of reactive peptide sequences from a distinct selected bead in comparison to conventional Edman degradation, the peptide library is

chemically encoded by adaptive introduction of chain-terminating sequences with subsequent MALDI mass spectrometric analysis.<sup>19</sup> In brief, for every single resin-bound peptide, a unique coding pattern is introduced by introduction of few chain-terminating sequences (“capping”) to an individual amount of five percent per capping step. This is performed by utilization of mixtures of the individual FMOC-protected amino acid and the corresponding permanently blocked amino acid derivative during the course of combinatorial synthesis. As capping reagents, protection groups like acetyl or benzoyl are used. Thus, a single bead contains both the main peptide and a unique set of capping peptides easily being detected by mass spectrometry. The computer algorithm *Biblio* has been introduced to fulfill two tasks: first, it minimizes the number of termination sequences and termination reagents necessary for an unambiguous sequencing by mass spectrometry, which is referred to as the coding process. Second, it decodes a peak pattern of a given single-bead mass spectrum resulting in the desired sequence of the main peptide after selection of reactive beads.

The decoding is processed as follows: the library scheme file is loaded by *Biblio* and the monoisotopic masses from the single bead MALDI mass spectrum are put in the corresponding fields for the sequence determination. The available program version of *Biblio* requires the input of the peptide masses without the mass of the hexapeptidic linker. Furthermore, as a rule, the main peptide shows up with the most intense signal in the MALDI mass spectrum; the contribution of the acetylation of the most probable main peptide (42 Da) has to be subtracted, too. An algorithm, which takes the contributions of the linker and the acetylation into account, will be implemented in the next program version of *Biblio*.

After the input of the observed masses, the program suggests 100 sequences, which are ranked with different quality factors. These quality factors are the higher the better they are in accordance with the masses calculated by *Biblio*. Therefore, a quality factor of 100 % means an entire correspondence between calculated and experimentally determined masses. The mass determination accuracy of the MALDI spectra was  $\pm 1$  Da; in order to take smaller random measurement errors into account, *Biblio* also suggests sequences, which masses deviate more than  $\pm 1$  Da from the calculated mass, resulting in lower quality factors. The sequence rendering the highest quality factors is assumed to be the correct result.

For all successfully decoded peptides described in the following sections, the program calculated only one sequence with a quality factor of 100 %. This also was true, if a mass spectrum contained additional peaks aside the desired peaks corresponding to the main peptide and the capped peptides (see Fig. 1). After input of all masses, *Biblio* also suggested only one sequence with a quality factor of 100 %, even with this overdetermined set of

masses. Therefore, only sequences with a quality factor of 100 % had been considered as the correct sequences.

This process has been developed to avoid unnecessary loss of main peptide on every bead, which may counteract biological testing results. Furthermore, this method is reliable, quick and does not require special instrumentation compared to conventional Edman sequencing.

For the identification of a limited number of peptide sequences, which are suitable for efficient reactivity-based serotyping, only highly reactive peptide sequences are of particular interest. Therefore, it is necessary to screen the given library iteratively with sera of various genetic HIV-1 clades. Instead of single sera, we used sera pools to determine the average affinity of the individual patients' sera of a distinct HIV-1 subtype towards the single resin-bound peptides in terms of fluorescence intensity, as antibody binding is detected by a secondary antibody labelled with a fluorescent dye.

The claimed iteration of the screening procedure requires a simple recognition of reactive beads being identified in one screening step on the one hand and a complete and easy removal of the immune complex after this screening step on the other hand. Therefore, it is necessary to adhere the beads permanently to the petri dish surface. This was achieved by gluing the beads onto the plate with a stable and inert epoxy adhesive. The gluing process we developed reduced the amount of bead surface accessible to the sera only to a minimal extent, 9 %, as determined by microscopic measurements; nevertheless, the beads adhered stably during the course of several screens and have only been picked when being sequenced by MALDI mass spectrometry. A background grid pattern on the bottom of the petri dish allowed an easy spatial identification of reactive beads in successive fluorescence assays.

## **Results and Discussion**

**Coded synthesis of a decapeptide combinatorial library.** The peptides of the library are encompassing the tip of the V3 loop of HIV-1s' viral envelope glycoprotein gp120, spanning the viral clades A to F.<sup>1</sup> Any position of the library has been selected under the condition, that an individual amino acid is at least present to a minimum amount of five percent in at least one viral subtype. This helps to restrict the library size to relevant amino

acid sequences; another point of concern is the limited quantity of patients' sera and the synthetic manageability of the library. Furthermore, due to the occurrence of multiple antibodies not being elicited by infection with HIV in human sera, fully randomized libraries have not been taken into account. The decapeptide library consists of 80.640 species and is denoted in Table 1.

The library is coded by *Biblio*. Only three capping positions, indicated by superscripts, are needed. The capping reagents suggested by *Biblio* are given in Table 2. Any permanently blocked amino acid is introduced to an amount of five percent with respect to the resin occupancy, which has been found to be sufficient for mass spectrometric analysis. The library was synthesized by standard Fmoc chemistry<sup>20</sup> on TentaGel HMB (hydroxymethylbenzoic acid) resin. Where capping has been necessary, mixtures of the Fmoc-protected amino acid and the corresponding permanently blocked amino acid have been used for synthesis. A hexapeptide linker, <sup>β</sup>Ala-Pro-Pro-Arg-<sup>β</sup>Ala, has been introduced at the C-terminus of the functional decapeptide for mass spectrometric reasons. Synthesis of the library was performed by the "one bead one peptide" approach.<sup>17,18</sup> Before deprotection of the side chains of the amino acids, the Fmoc-deprotected N-termini of the main peptides have been acetylated. Then the side chains have been deprotected and an aliquot of resin containing 120.000 beads has been glued to a glass petri dish with 70 mm in diameter by using an epoxy adhesive as described in the experimental section. Therefore, statistically every bead of the library was present 1.5 times on the plate.

A background millimeter-spaced grid pattern on the petri dish assured the identifiability of individual beads. The cover density on the plate (30 beads per mm<sup>2</sup>) has been calculated as a compromise between minimizing the anticipated serum amount on the one hand and the minimum required space for an individual bead to be identified unambiguously on the plate on the other hand. Unfortunately, about ten percent of the beads clustered on the plate as an unavoidable artifact of the glueing process, even when lower bead densities were tested. These beads therefore were not accessible for immunological evaluation.

**Screening strategy of the decapeptide library.** The decapeptide library has been subjected to six screening and washing cycles as described below. First the library has been incubated with serum solution; then antibody binding has been detected with an anti-human secondary antibody labelled with the fluorescent dye Alexa488 and visualized by illumination with fluorescent light. Highly reactive beads have been identified by their intense

immunofluorescence under the microscope, photographed, and positionally recognized by the background grid pattern. The immune complex then has been stripped off by incubation of the plate with 6 M guanidine hydrochloride solution, which had been adjusted to pH 1 with hydrochloric acid. Every selected bead then has been photographed a second time to exclude false positive beads as a last step of the first cycle. Now the following screening step could be performed.

The order of the sera pools of the four mentioned subtypes of HIV-1 refers to the declining global relevance of the clades: clade B is the most common in most countries and has the broadest genetic variability, followed by clade C, E and A, respectively. Therefore, the six cycles were:

- i. Screening with normal human serum (NHS) for evaluation of the optimal exposure conditions for immunofluorescence microscopy,
- ii. Screening of a pool of seven HIV-1 clade B sera,
- iii. Screening of a pool of five HIV-1 clade C sera,
- iv. Screening of a pool of five HIV-1 clade E sera,
- v. Screening of a pool of five HIV-1 clade A sera and finally
- vi. Screening with normal human serum for final exclusion of false positive beads.

Overall, 37 beads with intense fluorescence could be identified on the plate. These beads then were picked with a needle after slight moistening of their grid position with water and subjected to MALDI mass spectrometry. Thereof 36 beads could successfully be analyzed and their peptide sequences could be decoded by *Biblio*. All sequences and their reactivity patterns with the different sera pools are denoted in Table 3. A typical immunofluorescence photograph of a reactive bead, its corresponding MALDI mass spectrum and the peptide sequence decoded by *Biblio* is given in Figure 1.

**Statistical analysis of the reactivity pattern of the found peptides with the different sera pools.** Surprisingly, the classical submotifs GPGR or GPGQ, respectively, only appeared twice each in the set of 36 successfully sequenced peptides denoted in Table 3; this is in contrast to the overwhelming occurrence of these submotifs in genetic data over all HIV-1-subtypes.<sup>1</sup> It is obvious from Table 1, that with a set of only four peptides the subtypes could be differentiated. Statistical analysis of the reactivity pattern was performed in two ways: A

principal component analysis was carried out in order to group amino acid sequences in order to find out relevant reactive submotifs. Moreover, a neural network analysis was done in addition to determine individual amino acid positions for being crucial causing the experimentally determined reactivity pattern with the individual sera pools.

**Principal Component Analysis (PCA).** A principal component analysis (PCA) was done for the sera pool reactivities of the A, C and E pool; the sera pool B pattern contained only four reactive sequences, which is insufficient for a significant analysis. Therefore, taking the multiple sera pool crossreactivities of the 36 sequences into account, the PCA of sera pool HIV-1 A contained 23 sequences, the PCA of pool HIV-1 C contained 16 sequences, and pool HIV-1 E 17 sequences, respectively. The PCA results of the sera pools' reactivities are visualized in principle component diagrams; in all three cases, only correlation of the principle components 1 to 2 and 1 to 3 led to significant clustering, resulting in two PCA diagrams per sera pool.

**HIV-1 sera pool A.** Figure 2 (top) shows the correlation diagram between the principle components 1 and 2. The sequences could be grouped into three clusters. One cluster comprises only S and G at the N-terminal amino acid position, followed by an MXM motif, where X is R, P or Q. The following positions are found to be heterogeneous. The second cluster exclusively contains K as first amino acid, again followed by an MXM, motif, but with a higher variance in all three motif positions, like all other amino acids in the cluster. Finally, a cluster only made up of two sequences displays the RMXM motif with X = P, T. In the correlation diagram of the principal components 1 and 3 (Figure 2, bottom) five smaller clusters could be identified. The first group is N-terminally dominated by GMXM, but except position four, all amino acid positions show up more divergent. Then, smaller clusters can be identified consisting of two or three sequences with a MXL, SMXLGPG, KMXM or RMXM motif.

**HIV-1 sera pool C.** Figure 3 displays the two correlation diagrams of the PCA of the subtype C reactivity pattern. The correlation diagram between the principle components 1 and two clearly identifies two clusters, containing again N-terminal motifs GMXM and KMXM, respectively, with X = (mainly) P and Q to a significant extent. Outlier sequences contain a tripeptide TRM submotif. Again, the C-terminal amino acids do not seem to have a significant influence due to their variability in the clusters. This picture is continued in the correlation

diagram of the principal components 1 and 3. The before mentioned outlier sequences are incorporated into the two occurring clusters, their main motifs can be interpreted as GMXM / SMXM or KMXM, respectively.

**HIV-1 sera pool E.** Figure 4 finally presents three clusters in both correlation diagrams. The first cluster contains a SXXM / GXXM motif, mainly with Q, V and P as variable amino acids. The second cluster then is made up mainly of a KMXM sequence, but with a higher variance of amino acids (H, I, L, T, N) also in the first methionin position. A third, smaller cluster concludes the picture displaying KXRI and RXRI, respectively. Again all other positions were found to be heterogeneous.

Therefore it appears, that only the first four positions of the V3 tip decapeptide do have a significant influence for the peptides' reactivity towards sera pools of different genetic subtypes. Moreover, with the exception of one small cluster of subtype A, the classical GPG motif of the V3 tip does not play a crucial role it has when regarding classical genetic data.<sup>1</sup> The serological reactivity data indicate a much higher variability of the middle position: all five amino acids of our library are present, in contrast to the dominance of P in the genetic data.

Interestingly, the classical V3 signal motifs GPGR, and GPGQ, respectively, are harshly underrepresented in the 36 highly reactive sequences. This might be a result of the identification of other binding epitopes of the sera antibodies. Therefore, the HIV sequence database<sup>23</sup> containing all known HIV sequences has been screened for motif-analogue sequence similarities (tri- or tetrapeptides) to our oligopeptides. Five of our subsequences found also are present in different regions of the HIV genome map, when alteration of one amino acid is allowed. Exact four amino acid matches have been identified only once. None of them is a sequence of the envelope protein coding region *env*. Two motifs, VIPM (pr55, #168-171) and AMQM (p24, #65-68) from *gag* correlate with our submotifs GIPM and KIPM or GMQM and KMQM; respectively. The sequence RMRI (*vif* #15-18), a *vif* sequence, is found to have an analogue sequence taking our found sequences RMRI or even RTRI into account. The motif VQM (p31, #176-178) of *pol* can be correlated with our sequence motifs SVQM and KVQM. Finally, the GLG motif of *vpr* (*vpr* #41-43) is part of the few GLG containing decapeptide sequences of the V3 tip. All sequence motifs in the database do not

display a preference for a distinct HIV-1 subtype; any motif occurred in all major clades A to G.

**Neural Network Analysis.** Neural network analysis has been performed with the program *Smart*.<sup>21</sup> A three layer neuronal network with a sigmoid transfer function was used. The input layer contained 40 neurons corresponding to the eight variable amino acid positions of the library (see Table 1), permuted with five amino acid parameters (sterical influence, polarizability, van der Waals volume, hydrophobicity, and isoelectric point<sup>22</sup>, given in Table 4). The hidden layer contained eight, the output layer four neurons, corresponding to the four sera pools. The network has been trained with 5 of the 36 experimentally determined sequences and with 10 of the 100 random sequences used for negative controls. The learning rate was set to  $\eta = 0.001$ . The results of the neural network analysis are displayed in Figures 5 to 7. Figure 5 presents the dependence of every single input parameter used from the four sera pools. Five input parameters define one amino acids of the eight altered in the library. Several input parameters are found to be significant beyond a sensitivity of 0.70. The amino acid position 3 (input parameters 11 to 15) appears to be a crucial position for all sera pools, which corresponds with the high variability of this position in the MXM motif of the PCA. Also for positions 6 of the library (input parameters 21 to 25) high sensitivities for three of the sera pools has been suggested. This position contains the amino acid  $X = P,L,S,Q,T$  within the classical GPG motif dominant in genetic data clusters. Furthermore, to a lower level of significance, the amino acid positions 8 and 9 (input parameters 26 to 35) seems to be crucial especially for sera pool C; finally, the amino acid position 10 (input parameters 36 to 40) appears to be important for the HIV-1 clade A pool, but also for sera pool E. These results now have been drawn into two correlation diagrams. Figure 6 shows the dependency of the sensitivity of the sera pools A to E from the individual amino acid positions. Figure 7 finally correlates the reactivity dependency of the sera pools from the five individual amino acid parameters.

Figure 6 clearly indicates, that there is a strong correlation between all amino acid positions of the library and the sera pools A and C; their sensitivity is far more dependent from the amino acids than the sensitivities of the sera pools B and E. There is no clear dominant amino acid position for all sera pools, but the amino acid positions 3, 6 and 10 seem in general have to have a relatively strong influence on the sensitivities, as indicated in Figure 5. Figure 7 correlates the sera pools with the five descriptive amino acid parameters; again,

sera pool C is an outlier group, being influenced by all parameters taken into account. This is also found for sera pool A to a lower significance. Again, the reactivity of sera pool E is only minimally influenced by any amino acid parameter.

Therefore, the HIV-1 subtype C, followed by clade A, seems to have the greatest differentiation potential, when the amino acid sequence of antibody binding epitopes are altered compared to the consensus sequence: their sensitivity revealed by neural network analysis is strongly dependent of descriptive amino acid parameters as well as the relative position of any amino acid on the epitope. In addition to the PCA, not only position 3 of the decapeptide sequence region appears to be crucial, but to a lower extent also positions 6 (X within the GXG core motif of the V3-tip) and the C-terminal positions 8, 9, and 10.

The importance of HIV-1 clades C and, eventually A, regarding the differentiation potential of sera antibodies might correlate with the genetic variability of the HIV-1 clades A to E: Clade B is the far most divergent of all known HIV-1 clades<sup>1</sup>; the genetic variability of subtypes C and A are more restricted. Finally, clade E is known to be a so called “recombinant” clade, a combination of sequences of different clades grouped to a new clade, namely HIV-1 E.<sup>1</sup>

### **Conclusions**

The method we introduce here facilitates iterative screening of a synthetic combinatorial peptide library with polyclonal sera for a quick and reliable identification of reactive and crossreactive peptides of this library, respectively. The used resin-bound peptide library modifies the classical “One bead one peptide” approach by Lam<sup>17</sup> and Furka<sup>18</sup> by chemical encoding for a rapid single-bead mass spectrometric analysis faster than conventional Edman sequencing. The coding is based on the adaptive introduction of chain-termination sequences during the synthesis of the peptide library. This is achieved by using mixtures of the Fmoc-protected amino acid and its N-terminally blocked derivative at the particular position to an amount of five percent. An optimal capping pattern is calculated by the algorithm *Biblio*, which minimizes the number of necessary capping steps and capping positions in order not to reduce the amount of the main peptide more than necessary. After the identification of reactive beads, these are subjected to MALDI mass spectrometry and the resulting peak pattern is decoded by *Biblio* resulting in an unambiguous determined peptide sequence.

For an iterative screening of the library, the beads are fixed to the petri dish surface with an epoxy adhesive. The library is screened iteratively with human HIV-1 positive polyclonal sera pools derived from diverse subtypes to correlate seroreactivity patterns and the identification of serological relationships; therefore, only highly reactive sequences within a minimal set were of particular interest. The library used is derived from the genetic dataset of the V3 loop of the viral envelope glycoprotein gp120 of HIV-1, which is known to be one of the major immunogenic determinants of the virus.<sup>4-10</sup> Antibody binding was detected with a secondary anti-human antibody labelled with an fluorescent dye. Stripping of the antibody complex was achieved by lowering the pH to 1. 37 highly reactive sequences could be found, whereof 36 were successfully sequenced. These sequences have been analyzed by means of cluster analysis with PCA (principal component analysis) and neural networks. Several non-classical binding motifs have been identified, belonging to other epitopes of HIV-1 than the expected well-known V3 loop epitope, *vpr* or *vif* motifs, for instance. Furthermore, a selection of only four of the 36 sequences is sufficient for a differentiation of the HIV-1 clades.

The neural network analysis data indicate several crucial amino acid positions of the decapptide sequence, that have a strong influence on the serotype affiliation, at least for the genetically more restricted HIV-1 clades C and A.

## Experimental Section

**Peptide Library Synthesis: Materials and Methods.** The peptide libraries has been synthesized manually by standard Fmoc chemistry<sup>20</sup> using *N*-hydroxybenzotriazole and *N,N'*-diisopropylcarbodiimide as activation agents. The optimum coupling time was found to be four hours. TentaGel S HMB (hydroxymethylbenzoic acid) resin, bead diameter 90 µm, was provided by Rapp Polymere GmbH, Tübingen. N-Terminal acetylation was performed by using 10 eq acetic anhydride and 50 eq triethylamine (1 mL per 100 mg peptidyl resin) for two hours. Where special amino acid derivatives were needed, they have been prepared by simply modifying them attached to the solid phase; 2-Chlorotriylchloride resin (Calbiochem Novabiochem, Läufelfingen, Switzerland) was used. TFA was purchased from Acros Organics (Geel, Belgium), Solvents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and were used without further purification. Fmoc amino acid derivatives were purchased from Calbiochem Novabiochem (Läufelfingen, Switzerland). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI).

The decapeptide library was synthesized on 700 mg resin. An excess of about three percent of the calculated resin mass was additionally used due to an expected loss of resin during the various splitting and mixing steps. First, a hexapeptide linker was attached to the resin: the resin was occupied with  $\beta$ alanine as described.<sup>24</sup> Then the remaining five amino acids have been attached, resulting in  $\beta$ Ala-Pro-Pro-Pro-Arg- $\beta$ Ala as linker construct. Library diversity was introduced by Furka's and Lam's "one bead one peptide" approach.<sup>17,18</sup> The bead quantity was divided in  $m$  portions, whereas  $m$  is the number of desired amino acids per library position. In order to introduce capped amino acids during library synthesis, a mixture of Fmoc protected amino acid and individually capped amino acid derivative, as predicted by *Biblio*, was used. The amount of capped amino acid was five percent with regard to the corresponding resin loading. To assure manageable quantities of both capped and Fmoc protected derivative, a 12-fold excess of amino acid was used (with 13.2 eq  $N,N'$ -diisopropylcarbodiimide and 18 eq  $N$ -hydroxybenzotriazole). The N-terminal protecting group (Fmoc) was removed with 40 % Piperidine in DMF for 20 minutes, repeated three times, thoroughly washing and subsequently performance of the next cycle. This process was repeated until the peptide sequence was finished. After intense resin washing, the library was acetylated as described above. Then the side chain protection groups were cleaved in 4 hours by using 1 mL of the following mixture per 100 mg resin: 10 mL TFA, 750 mg phenol, 500  $\mu$ L of mercaptoacetic acid, 500  $\mu$ L of thioanisole, and 500  $\mu$ L of water. Thereafter the resin was washed with 90 % aqueous TFA, 10 % triethylamine in DMF, several times with DMF, and finally twice with diethyl ether. The resin is stored at 4 °C.

**Glueing of the library beads.** As glue, the two component adhesive "Kraft-Mix", provided by Henkel (Düsseldorf, Germany) was used. The two components were mixed and diluted to the factor three by toluene to lower the viscosity of the mixture. The glue volume was calculated to result in a 150  $\mu$ m layer on the glass petri dish (70 mm inner diameter). The adhesive mixture was pipetted onto the glass petri dish on a horizontal plain, which was heated to 80 °C. The heat source was removed and the glue film was allowed to harden. After a few minutes the library beads, thoroughly suspended in a mixture of 20 % DCM and 80 % toluene, were spread on the petri dish. Then the adhesion layer was allowed to harden for 36 hours and stored at 4 °C. The period of time between pipetting the adhesive mixture onto the dish and spreading the suspended library is dependent on the room temperature. A linear functional relationship has been found by regression:  $t$  (drying of the mixture in minutes) =  $33.5 - 0.83 T$  (room temperature in °C) for an interval between 19 and 26 °C. Deviation of

five seconds from this relation leads either to a full penetration of the glue matrix or to a failure of the fixation of the TentaGel beads, as revealed by microscopic analysis.

**Screening of the fixed library.** For all screening steps, a total reagent volume of 3 mL for each step of the procedure was found to be sufficient to cover the hydrophobic adhesive layer. Every single serum was introduced with a dilution of 1:100 of the original quantity. NHS was purchased bei Coulter (Fullerton, CA). HIV-positive sera derived from patients in Germany were provided by the Georg-Speyer-Haus, Department of Infectious Diseases, Frankfurt, Germany; HIV-positive sera derived from patients of other countries (Belarus, Brazil, China, India, Russia, South Africa, Thailand and Tanzania) were provided by UNAIDS, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt, Germany.

First, the library beads were incubated with a solution of 1 % BSA in 1xTBS (tris buffered saline) for 2 h at 4 °C for blocking. After washing twice with 1xTBS the library was incubated with the serum diluted in 0.1 % BSA in 1xTBS overnight at 4 °C. After washing twice with 1xTBS the library was incubated under identical conditions with a secondary anti-human antibody IgG (H+L) ex goat labelled with the fluorescent dye Alexa488 (provided by MoBiTec, Göttingen, Germany). The plate again has been washed twice and analyzed under a fluorescence microscope (TE 300, Nikon, Tokio, Japan). Reactive beads were identified by intense fluorescence, photographed (Sony DXC-9100 CCD camera, exposure time 0.1 s) and positionally recognized by a background millimeter grid pattern. After microscopic analysis, the immune complex has been removed by intense washing with 6 M guanidine hydrochloride adjusted to pH 1 (4 x 15 min). Every identified bead position then has been photographed again to exclude blind reactivity. Then the screening cycle could be repeated.

**MALDI sample preparation.** Individual beads were picked with a thin steel needle, and placed into an Eppendorf cap containing a solution of 10 % (v/v) of triethylamine in water. The cleaving reaction was run at room temperature overnight. A 1 µL aliquot of the reaction mixture was pipetted onto the sample plate and dried in a cold airflow. Then 0.5 µL of a solution of 0.1 mol/L dihydroxy benzoic acid (DHB) in 30 % aqueous acetonitrile containing 0.1% TFA was dropped onto this sample and dried in a cold airflow. In any cases, spicular crystals have been obtained.

**Mass spectrometry.** The MALDI mass spectra were recorded on a PE Biosystems (Foster City, CA) Voyager DE Pro time-of-flight mass spectrometer. All data were acquired

in the positive ion reflector mode with delayed extraction at a delay time of 70 ns. The low mass gate was set to 900 Da. For each spectrum, 128 laser pulses have been accumulated. A mixture of Angiotensin I and III ( $10^{-5}$  molar each) has been used for external calibration. Since the identification of peptide sequence is based on specific capping resulting in large mass differences one-time external calibration (for a whole series of experiments) was sufficient resulting in a mass accuracy of  $\pm 1$  Da. Spectra were typically recorded at a mass resolution of about 2500 (FWHM), tuning of the instrument to better resolution values was not necessary.

**Statistical analysis.** The PCA (principal component analysis) was performed with *Mathematica*. Neural network analysis was done with the program *Smart*.<sup>21,22</sup>

**Acknowledgment.** This work was supported by the Fonds der Chemischen Industrie, the DFG and the MPG. We thank J. Meiler and J.B. Ferebee for helpful suggestions during statistical analysis and providing the algorithm *Smart* and UNAIDS for providing HIV-positive sera.

**Figure 1.** Typical microscopic photograph of a reactive bead by means of fluorescence intensity (top). This bead has been picked and analyzed by MALDI mass spectrometry. Its mass spectrum is shown below. The main peptide, Ac-GMQMGTGKAW, and its three corresponding coding peptides have been identified by *Biblio* with a quality factor of 100 %. The additional peaks, marked with “A” have also been taken into account, but resulted in lower quality factors. A major byproduct is methionin oxidation indicated by ‘Met-O’ (bottom).

**Figure 2.** PCA analysis of the peptides identified as rective with sera pool HIV-1 A. Correlation diagram of principle component 1 vs 2 (top) and 1 vs 3 (bottom), are shown.

**Figure 3.** PCA analysis of the peptides identified as rective with sera pool HIV-1 C. Correlation diagram of principle component 1 vs 2 (top) and 1 vs 3 (bottom), are shown.

**Figure 4.** PCA analysis of the peptides identified as rective with sera pool HIV-1 E. Correlation diagram of principle component 1 vs 2 (top) and 1 vs 3 (bottom), are shown.

**Figure 5.** Sensitivity diagram of the 40 used input parameters with respect to the four sera pools as output parameters. Five input parameters are set for one amino acid position.

**Figure 6.** Dependency of the sensitivity of the eight varied amino acid positions from the sera pools.

**Figure 7.** Dependency of the sensitivity of the five individual amino acid parameters from the sera pools (from left): sterical influence, polarizability, van der Waals-Volume, hydrophobicity, isoelectric point.

## References

- [1] Kuiken, C.; Foley, B.; Hahn, B.; Marx, P. et al. (Eds.), *Human Retroviruses and AIDS 1999*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, 1999
- [2] Gao, F.; Robertson, D.L.; Morrison, S.G.; Hui, H. et al., *J. Virol.* **1996**, *70*, 7013 – 7029
- [3] Sabino, E.C.; Shpaer, E.G.; Morgado, M.G.; Korber, B.T.M. et al., *J. Virol.* **1994**, 6340 – 6346
- [4] Cheingsong-Popov, R.; Callow, D.; Kaleebu, P.; Beddows, S. et al., *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1994**, *11*, 1379 – 1386
- [5] Cheingsong-Popov, R.; Osmanov, S.; Pau, C.P.; Schochetman, G. et al., *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1998**, *14*, 311 – 318
- [6] Pau, C.P.; Holloman-Candal, D.L.; Luo, C.C.; Kalish, M.L. et al., *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1994**, *11*, 1369 – 1377
- [7] Hoelscher, M.; Hanker, S.; Barin, F.; Cheingsong-Popov, R. et al., *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1998**, *14*, 139 – 149
- [8] Gehring, S.; Mayaan, S.; Ruppach, H.; Balfe, P. et al., *J. AIDS Hum. Retrovirol.* **1997**, *15*, 296 – 303
- [9] Baillou, A.; Denis, F.; M'Boup, S.; Chout, R. et al., *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1993**, *9*, 1209 – 1215
- [10] Barin, F.; Lahbabi, Y.; Buzelai, L.; Lejeune, B. et al., *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1996**, *12*, 1279 – 1289
- [11] Kostrikis, L.G.; Ngai, H.; Moore, J.P.; Ho, D.D., *J. Virol.* **1996**, *70*, 445 – 458
- [12] Moore, J.P.; Leu, J.; Qin, L.; Korber, B.; Ho, D.D., *J. Virol.* **1996**, *70*, 427 – 444
- [13] Nyambi, P.N.; Lewi, P.; Andries, K.; Janssens, W. et al., *J. Virol.* **1996**, *70*, 6235 – 6243
- [14] Weber, J.; Beddows, S.; Kaleebu, P.; Björndahl, A. et al., *J. Virol.* **1996**, *70*, 7827 – 7832
- [15] Plantier, J.-C.; Le Pogam, S.; Poisson, F.; Buzelay, L. et al., *J. Virol.* **1998**, *72*, 677 – 683
- [16] Zolla-Pazner, S.; Gorny, M.K.; Nyambi, P.; van Cott, T.C.; Nádas, A., *J. Virol.* **1999**, *73*, 4042 – 4051
- [17] Lam, K.S.; Salmon, S.S.; Hersh, E.M.; Hruba, V.J. et al., *Nature* **1991**, *354*, 82 – 84
- [18] Furka, Á.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, F., *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487 – 493

- [19] Hoffmann, C.; Blechschmidt, D.; Krüger, R.; Karas, M., Griesinger, C., *J. Comb. Chem.*, accepted.
- [20] Fields, G.B.; Noble, R.L. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *35*, 161 – 214
- [21] Meiler, J., [www.jens-meiler.de](http://www.jens-meiler.de), **2001**
- [22] Meiler, J., Will, M., *submitted*, **2001**
- [23] [www.hiv-web.lanl.gov](http://www.hiv-web.lanl.gov)
- [24] Blankemeyer-Menge, B.; Nimitz, M.; Frank, R., *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1701 – 1704

**Table 1.**

amino acid positions									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S	I <sup>2</sup>	H	I <sup>2</sup>	G	P	G	R <sup>5</sup>	A	F
R	T <sup>3</sup>	R	L <sup>1</sup>		L		Q <sup>3</sup>	V	L
G	V <sup>3</sup>	T	M <sup>1</sup>		Q		K <sup>2</sup>	T	Y
K	M <sup>1</sup>	P			S		H <sup>4</sup>		W
		S			T				
		N							
		Q							

Library scheme of the synthesized decapeptide library with 80.640 species. Coding positions are indicated by superscripts. The capping reagents are given in Table 2.

**Table 2.**

group	modification	abbreviation
1	Acetyl-	Ac-
2	Benzoyl-	Bz-
3	Formyl-	For-
4	2-Naphtoyl-	Naph-
5	4-Acetaminobenzoyl-	Aab-

N-terminal capping groups used in synthesizing the encoded library. Any permanently blocked amino acid is introduced to an amount of five percent with respect to the resin occupancy.

**Table 3.**

sequence	sera pools of HIV-1 clade				$\Sigma$
	A	B	C	E	
Ac-KMQMGTGKTF	+		+		2
Ac-SMQMGLGKTW				+	1
Ac-KMQMGPGQW			+		1
Ac-KIPMGTGRAF			+		1
Ac-GMPMGSGQW	+		+		2
Ac-GIPMGQGHTW	+		+		2
Ac-GMPMGTGHTL			+		1
n. det.		+	+		2
Ac-KIPMGTGHVF				+	1
Ac-SVQMGTGHTW	+		+	+	3
Ac-STRMGTGQAL	+	+	+	+	4
Ac-SMTLPGRTW	+				1
Ac-GMQMGTGKAW		+	+		2
Ac-GMQMGPGHAF			+	+	2
Ac-SMSLGLGHAW	+				1
Ac-KMTMGQGRAW	+			+	2
Ac-RMRIGTGHTY				+	1
Ac-SIRMGTGRTW	+				1
Ac-KIRIGTGRTL				+	1
Ac-GMRMGQGHVL	+				1
Ac-SVNMGLGRTW	+			+	2
Ac-GMPLGTGKTF	+			+	2
Ac-RTRIGPGRTY	+			+	2
Ac-GIRMGPGQAF	+				1
Ac-KIQLGSGHTF	+				1
Ac-KTNMGTGHTL	+		+	+	3
Ac-SIHMGTGQVW				+	1
Ac-SMQLGPGKTF	+		+		2
Ac-GMPMGTGQAW	+				1
Ac-KIQMGTGKAW		+	+	+	3
Ac-KTRMGQGQW			+		1
Ac-RMTMGQGHVW	+				1
Ac-KMQLGQGQTF	+		+	+	3
Ac-KVQMGPQKTF	+				1
Ac-KMHIGTGQAW	+			+	2
Ac-KMQMGTGKVL				+	1
Ac-RMPMGTGHTY	+		+		2

Crossreactivity pattern of all highly reactive peptides identified by means of fluorescence intensity. The sequence of one bead could not be determined.

**Table 4.**

name	$\Xi^{[a]}$	$\alpha^{[b]}$	$\nu_v^{[c]}$	$\pi^{[d]}$	$I^{[e]}$
<i>ALA</i>	1,28	0,05	1,00	0,31	6,11
<i>GLY</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	6,07
<i>VAL</i>	3,67	0,14	3,00	1,22	6,02
<i>LEU</i>	2,59	0,19	4,00	1,70	6,04
<i>ILE</i>	4,19	0,19	4,00	1,80	6,04
<i>PHE</i>	2,94	0,29	5,89	1,79	5,67
<i>TYR</i>	2,94	0,30	6,47	0,96	5,66
<i>TRP</i>	3,21	0,41	8,08	2,25	5,94
<i>THR</i>	3,03	0,11	2,60	0,26	5,60
<i>SER</i>	1,31	0,06	1,60	-0,04	5,70
<i>ARG</i>	2,34	0,29	6,13	-1,01	10,74
<i>LYS</i>	1,89	0,22	4,77	-0,99	9,99
<i>HIS</i>	2,99	0,23	4,66	0,13	7,69
<i>ASP</i>	1,60	0,11	2,78	-0,77	2,95
<i>GLU</i>	1,56	0,15	3,78	-0,64	3,09
<i>ASN</i>	1,60	0,13	2,95	-0,60	6,52
<i>GLN</i>	1,56	0,18	3,95	-0,22	5,65
<i>MET</i>	2,35	0,22	4,43	1,23	5,71
<i>PRO</i>	2,67	0,00	2,72	0,72	6,80
<i>CYS</i>	1,77	0,13	2,43	1,54	6,35

Amino acid parameters used as input parameters for neural network analysis: a) sterical influence, b) polarizability, c) van der Waals volume, d) hydrophobicity, e) isoelectric point.

Figure 1.

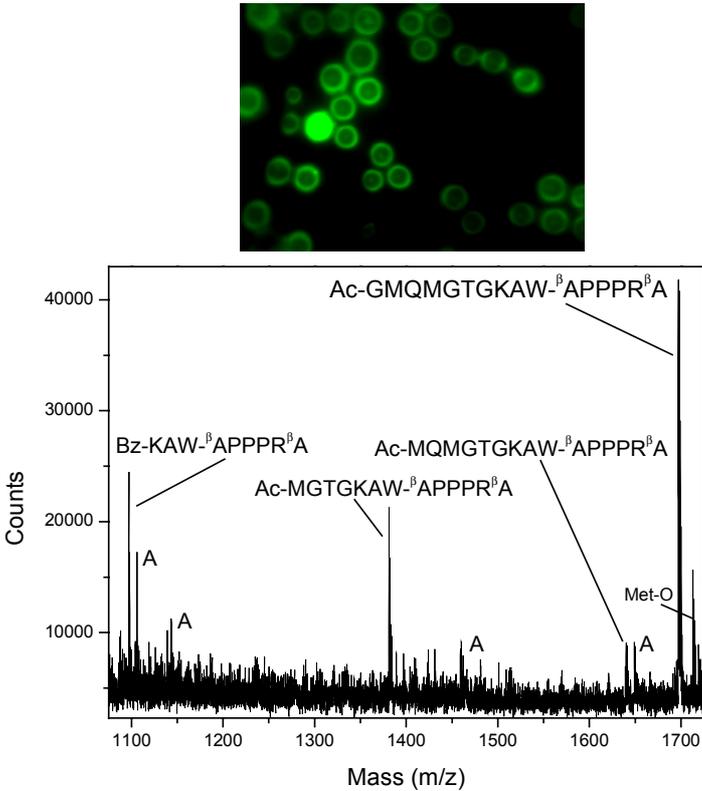


Figure 2.

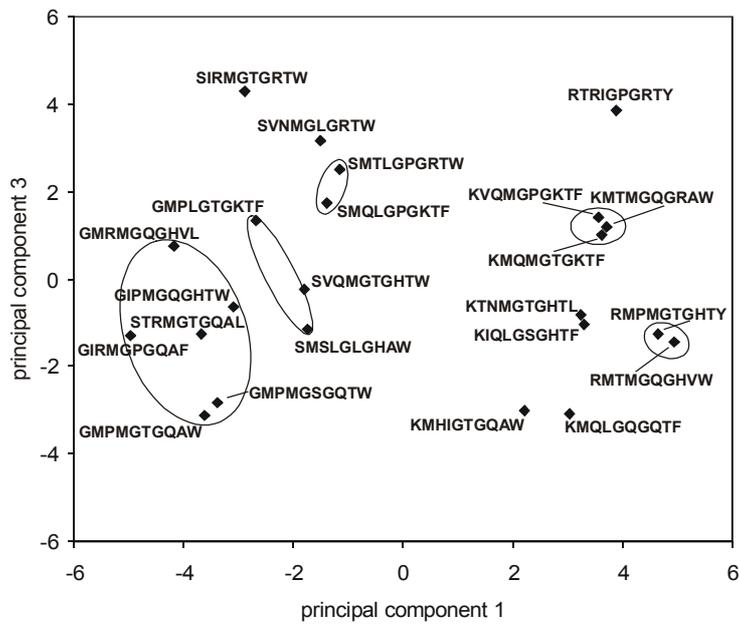
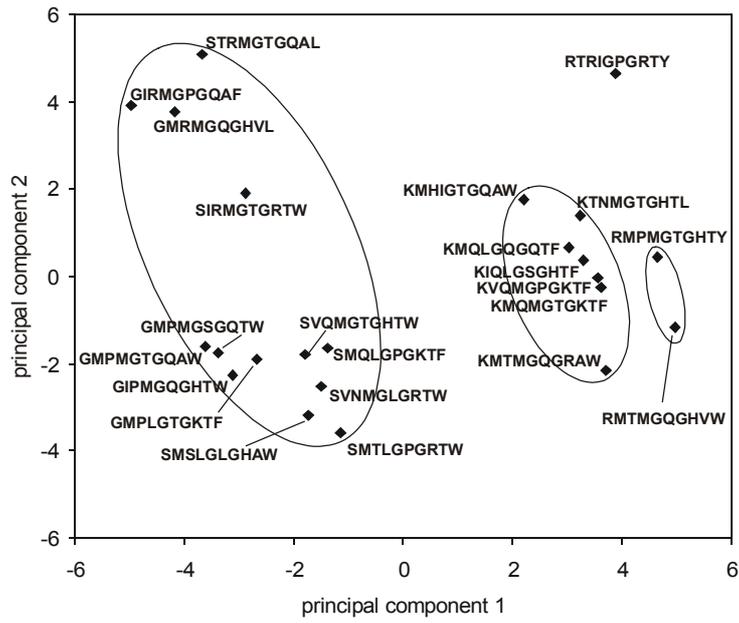


Figure 3.

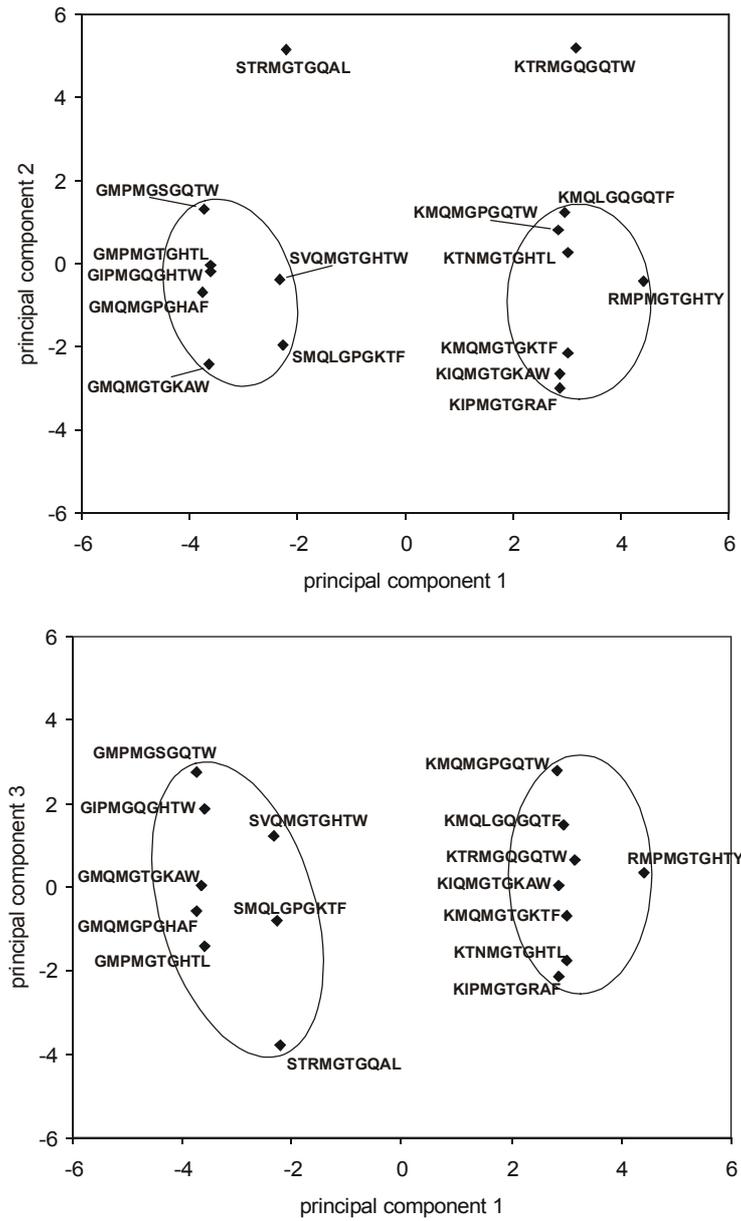


Figure 4.

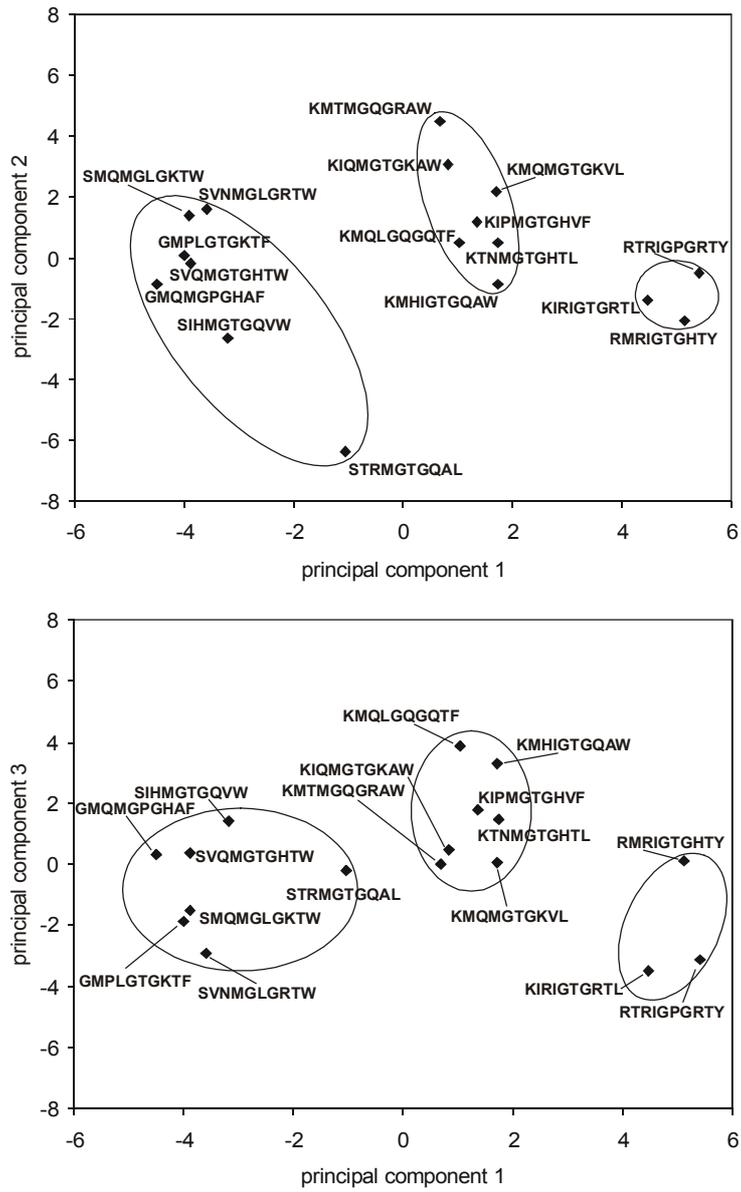


Figure 5.

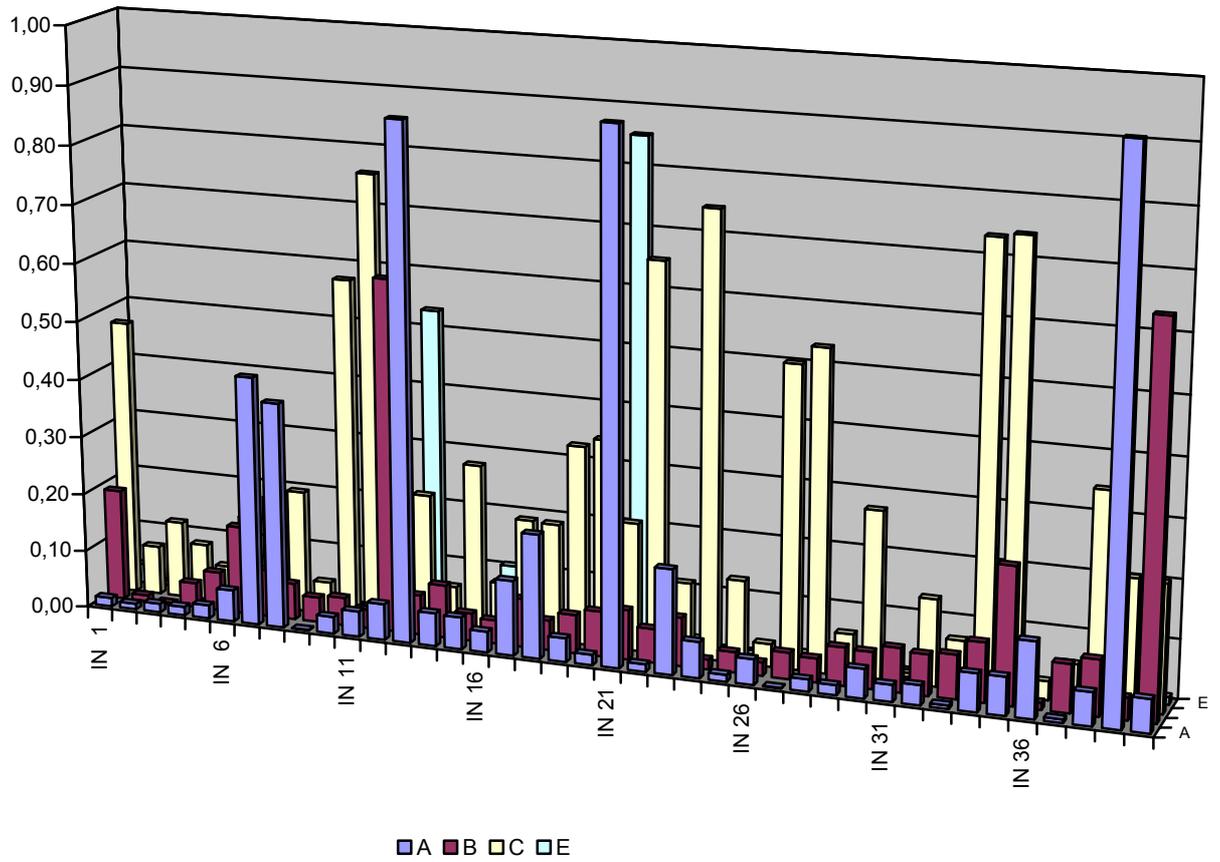
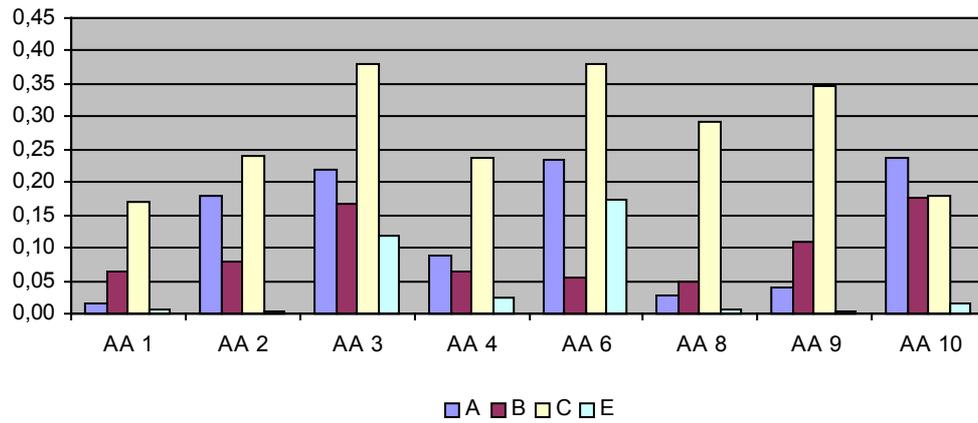
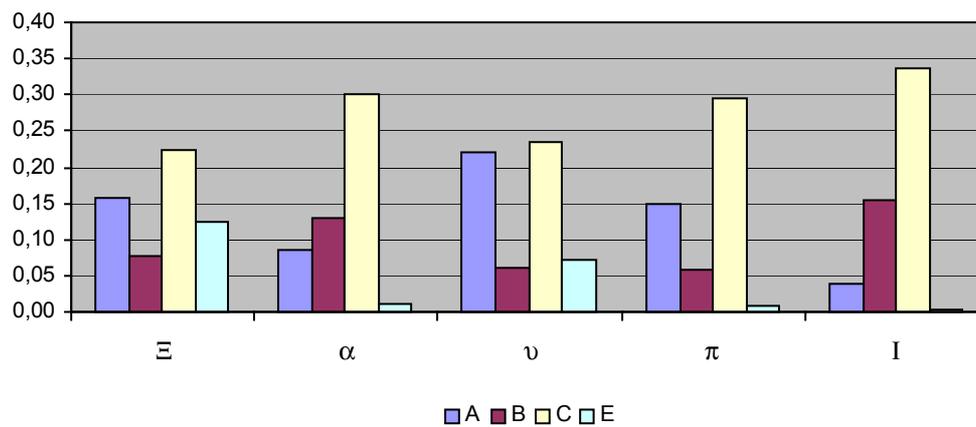


Figure 6.



**Figure 7.**



## 11 Zusammenfassung und Ausblick

Die enorme genetische Variabilität von HIV-1<sup>[14],[50]</sup> und die mangelnde Korrelation zwischen genetisch definierten Subtypen einerseits und antigener Variation<sup>[51]-[56]</sup> andererseits verhindern bisher die Entwicklung eines effizienten, breit neutralisierenden Impfstoffes. Neueren Ansätzen liegt daher das Konzept einer serologischen Klassifikation zu Grunde<sup>[61],[62]</sup>, die verschiedene HIV-Subtypen nach ihrer serologischen Reaktivität und nicht nach ihrem genetischen Ursprung klassifiziert. Diese Ansätzen beruhten allerdings auf der Verwendung ausgewählter Consensus-Modellpeptide der immunodominanten V3-Region des viralen Hüllproteins gp120 und monoklonaler Antikörper weniger HIV-1-Subtypen<sup>[61]</sup>. Somit ist nicht auszuschließen, dass aus dem Einsatz weiterer Peptide und anderer Antikörper bislang unidentifizierte Serotypen resultieren. Es lag nahe, den ursprünglichen Ansatz auf eine wesentlich breitere Basis von Antikörpern und Peptiden zu stellen. Als Antikörperquelle kamen hierbei die polyklonalen Seren HIV-1-positiver Patienten in Betracht; man machte sich dabei das native HIV-spezifische Antikörperreservoir zu Nutze. Seitens der Peptide als Zielmoleküle einer Ermittlung serologischer Reaktivität bot sich ein kombinatorischer Zugang an.

Ziel der vorliegenden Arbeit war demnach die Entwicklung eines immunologischen Testsystems für das Screening humaner HIV-positiver Seren gegen kombinatorisch erzeugte Peptide mit dem Hintergrund, einen minimalen Satz reaktiver Peptide zu identifizieren, die eine serologisch basierte Charakterisierung der Reaktivität verschiedener HIV-1-Subtypen erlaubt. Um Reaktivitätsmuster zwischen Seren verschiedener Subtypen ermitteln und ausschließlich signifikante, hochreaktive Sequenzen finden zu können, sollte dieses Assay zudem die Möglichkeit der mehrfachen Wiederholbarkeit mit derselben Peptidbibliothek bieten.

Diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit umgesetzten Ziele lassen sich somit wie folgt zusammenfassen:

- Entwicklung eines Verfahrens zur schnellen und eindeutigen massenspektrometrischen Sequenzierung von Peptiden aus kombinatorischen Bibliotheken,
- Entwicklung eines immunologischen Testsystems für das iterative Screening HIV-positiver Seren gegen festphasengebundene Peptide,

- Screening von Serenpools verschiedener genetisch bestimmter Subtypen von HIV-1 gegen eine kombinatorische Peptidbibliothek, die die genetische Variation der V3-Region von gp120 reflektiert, und
- Multivariate Analyse der gefundenen Peptidsequenzen mit dem Ziel einer serologischen Interpretation derselben.

Das Verfahren zur schnellen und im Vergleich zum herkömmlichen Kettenabbauverfahren nach Edman weniger aufwändigen massenspektrometrischen Sequenzierung als reaktiv bestimmter Peptide basiert auf der adaptiven Einführung Kettenabbruch erzeugender Sequenzen während der Synthese der kombinatorischen Peptidbibliothek nach einer modifizierten „One Bead One Peptide“-Synthese<sup>[118],[119]</sup>. Diese Codierung wird sequenztreu durch den Einsatz von Mischungen aus der Fmoc-geschützten Aminosäure, die für diese Sequenzposition vorgesehen ist, und ihres N-terminal permanent blockierten Derivats eingeführt. Das Programm *Biblio* optimiert das Codierungsmuster hinsichtlich minimaler Einführung von Terminationssequenzen und minimalem Einsatz Kettenabbruch erzeugender Reagenzien, um den Anteil des Hauptpeptids pro Bead nur so gering wie möglich zu vermindern. Eine MALDI-massenspektrometrische Analyse der Peptide eines betreffenden Beads liefert somit neben dem Signal des Hauptpeptids auch die Sequenz des Peptide codierenden Signale. Diese werden von *Biblio* zur gesuchten Peptidsequenz decodiert.

Des weiteren konnte ein immunologisches Testsystem für das iterative Screening festphasengebundener Peptide entwickelt werden. Dieses beruht auf der Detektion der Bindung des Serumantikörpers an das Peptid durch einen Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet und mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert ist. Eine Bindung ließ sich somit fluoreszenzmikroskopisch nachweisen. Um eine Wiederholbarkeit des Screenings zu gewährleisten, wurde die Peptidbibliothek mittels eines Epoxidharzklebstoffs auf der Probenunterlage fixiert. Eine Entfernung des Immunkomplexes gelingt durch mehrfache Behandlung mit pH 1.

Eine 80640 Spezies umfassende Decapeptidbibliothek, die die genetische Variabilität der immunodominanten V3-Schleife der viralen Hüllproteins gp120 von HIV-1 wiedergibt, wurde gegen Serenpools verschiedener HIV-1-Subtypen gemäß diesem Verfahren iterativ gescreent. Insgesamt 36 Peptide konnten aufgrund ihrer intensiven Fluoreszenz als

hochreaktiv erkannt werden; sie wurden mit MALDI-Massenspektroskopie und anschließender Decodierung durch *Biblio* sequenziert. Eine Auswahl von vier der 36 ermittelten Sequenzen erwies sich als ausreichend für eine Differenzierung der zugrunde liegenden HIV-1-Subtypen.

Eine anschließende multivariate Analyse der gefundenen Sequenzen in bezug auf ihr Seroreaktivitätsmuster ermöglichte die Bestimmung neuer, konservierter Epitope der Bindung polyklonaler Serenantikörper von HIV-1 und die Identifikation der für diese Bindung kritischen Aminosäurepositionen der betrachteten Decapeptide. Diese Epitope könnten in nachfolgenden Studien auf ihre Bedeutung hinsichtlich ihres Neutralisationspotentials bezüglich primärer HIV-Isolate getestet werden.

Das hier entwickelte Verfahren zum iterativen Screening codierter Peptidbibliotheken jedoch ist nicht auf das HIV-System beschränkt, es bietet vielmehr einen universellen Zugang zur reaktivitätsbasierten Evaluation festphasengebundener Substanzbibliotheken, die die volle genetische Variabilität ihrer biologischen Zielregion abbilden. Eine dieser Regionen könnte beispielsweise der Antigenrezeptor von B-Lymphocyten darstellen, der die B-Zellen durch Kontakt mit einem Antigen aktiviert. Diese regen die B-Zelle zur Proliferation und deren Nachkommen zur Differenzierung zu antikörpersezernierenden Zellen gegen diese Antigene an. Sie bilden damit ein interessantes Ziel, auf diesem Wege eine effektive Immunantwort hervorzurufen<sup>[146],[150]</sup>.



## 12 Anhang

### 12.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### 12.1.1 Peptidchemie und organische Festphasensynthese

##### *Silylierung der Glasgeräte*

Um die Adsorption der Polymerkugeln an die Innenwand der Reaktionsgefäße für die Peptidchemie zu verhindern, ist es erforderlich, die Hydrophilie der Glasoberfläche zu erniedrigen. Die freien Hydroxylgruppen der Glasoberfläche werden daher mit Dichlordimethylsilan silyliert. Das Reaktionsgefäß wird zu zwei Dritteln mit dem Silylierungsreagenz, 50 % Dichlordimethylsilan in abs. Toluol, befüllt. Man lässt eine Stunde lang unter Benetzung der kompletten Innenfläche schütteln. Danach wird die Lösung entfernt und das Reaktionsgefäß drei mal fünf Minuten mit entsprechenden Volumina Toluol, Methanol und Aceton gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird das Reaktionsgefäß für eine Stunde bei 60 °C getrocknet. Diese mit einer Fritte versehenen Glasgeräte werden für die Synthese der Einzelpeptide und die Synthese der Aminosäurederivate verwendet. Für die Synthesen der Peptidbibliotheken wurden mit einem Filterpfopfen beschickte 10 mL-Polypropylen-Spritzen eingesetzt, um den Harzverlust während der mehrfachen Teilungen und Umfüllungen des Harzes zu minimieren. Die Teilung des Harzes selbst erfolgt im abgeschwollenen Zustand nach mehrfachem gründlichen Waschen mit DMF und Ether.

##### *Belegung des Harzes mit der ersten Aminosäure*

a) o-Chlorotriethylchlorid-Harz: Man suspendiert die gewünschte Menge o-Chlorotriethyl-Harz in 10 mL DCM/g Harz. Man gibt die in bezug auf die einzustellende Harzbelegung gewählte Menge der Fmoc-geschützten Aminosäure (zweifacher molarer Überschuss) in wenig DCM und 3 mMol DIEA/g Harz hinzu und lässt 3 h bei Raumtemperatur schütteln. Hiernach setzt man 3 mL Methanol/g Harz und 500 µL DIEA/g Harz zu, um freie Valenzen des Harzes zu verethern. Man lässt weitere 15 min schütteln. Nun entfernt man die Reaktionslösung und wäscht je zwei Mal zwei Minuten mit DMF und Diethylether. Die zu erzielende Harzbelegung beträgt bis zu 1 mMol/g Harz.

b) PAM-Harz: Dieses Harz ist nur mit einer Aminosäure vorbelegt kommerziell verfügbar. Die Belegung beträgt in der Regel 0.58 mMol/g Harz. Für die hier durchgeführten Synthesen wurde mit BOC-Glycin vorbelegtes Harz eingesetzt. Die gewünschte Menge Harz wird in 10 mL DCM/g Harz suspendiert. Hiernach wird das Harz vier mal für je 15 Minuten mit 50 % TFA in DCM versetzt, um die BOC-Schutzgruppe abzuspalten. Das Harz wird danach einige Minuten mit DCM und drei mal für je fünf Minuten mit einer Lösung von 5 % DIEA in DCM gewaschen. Schließlich wird das Harz noch gründlich mit DCM und Ether gespült.

c) TentaGel HMB-Harz: Die zu erzielende Aminosäurebelegung des Harzes ist von der Belegung des Harzes mit der Ankergruppierung abhängig; diese liegt meist bei 0.26 mMol/g. Nach Quellen des Harzes in DCM (10 mL DCM/g Harz) wird dieses mit einer Lösung von 4 eq der gewünschten Fmoc-geschützten Aminosäure, 4 eq MSNT und 3 eq Methylimidazol in DCM (10 mL DCM/g Harz) versetzt und lässt 4 h kuppeln. Hiernach wird ein Kaiser-Tests (siehe unten) durchgeführt. Bei einem positiven Ergebnis wird erneut belegt, bei einem negativen Ergebnis kann die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten werden. In den Fällen, in denen TentaGel-Basisharz ohne Anker eingesetzt wurde, konnte die Aminosäure gemäß Kupplungsvorschrift direkt an den freien N-Terminus gekuppelt werden.

#### *Kaiser-Test*

Verwendete Lösungen:

0.85 Mol (80 g) Phenol in 20 mL Ethanol

2.8 mMol (0.5 g) Ninhydrin in 10 mL Ethanol

33 mg KCN in 50 mL Wasser (10 mMol); hiervon werden 2 mL auf 100 mL mit Pyridin aufgefüllt.

#### a) Qualitativ

Man entnimmt dem Ansatz wenige Harzkugeln, wäscht diese mehrmals mit Isopropanol und trocknet sie durch Absaugen von der Waschlösung. Diese werden in ein Eppendorfgesäß überführt und mit je zwei Tropfen der oben genannten Lösungen versetzt. Man erhitzt fünf Minuten auf 100 °C. Bei negativem Testergebnis sind Kügelchen und überstehende Lösung gelb, bei positivem Ergebnis sind beide grünlich bis intensiv blau.

b) Quantitativ

Die in Kap. 3 beschriebene Farbreaktion wird folgendermaßen quantitativ ausgewertet: Hat man die Fmoc-Schutzgruppe von der Aminosäure abgespalten, entnimmt man einige mg Harz und wäscht dieses mehrmals gründlich mit DMF und Diethylether. Man versetzt mit je vier Tropfen der ersten beiden und acht Tropfen der dritten Lösung, schüttelt das Eppendorfggefäß und erhitzt sieben Minuten auf 100 °C. Man überführt die Lösung in einen Messkolben (50 mL), füllt mit 60 %igem wässrigen Ethanol auf und misst im Absorptionsmaximum bei 570 nm. Die Harzbelegung wird wie folgt berechnet:

$$\text{Harzbelegung}[m\text{Mol} / g] = \frac{\text{Extinktion} * \text{Verdünnung}[m\text{L}] * 10^6}{\epsilon * \text{Einwaage}[mg]}$$

$\epsilon$  (570 nm) = 15000 [L/Mol\*cm] für alle Aminosäuren außer Gly

$\epsilon$  (570 nm) = 10000 [L/Mol\*cm] für Gly

*Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe*

Das Harz wird für 20 Minuten mit einer 40 %igen Lösung von Piperidin in abs. DMF versetzt (5 mL/200 mg Harz). Man wäscht anschließend drei Minuten mit abs. DMF. Dieser Vorgang wird drei Mal wiederholt. Nach der dritten Behandlung mit der Abspalllösung wäscht man fünf mal fünf Minuten mit abs. DMF und versetzt erneut mit der Abspalllösung. Nach 20 Minuten wird eine Probe dieser Lösung UV-spektrometrisch vermessen. Ist bei 300 nm noch eine Schulter vorhanden, wird so lange weiter abgespalten, bis bei 300 nm kein Fmoc-Piperidin-Addukt in der Originallösung mehr nachweisbar ist.

*Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäure an die Peptidkette*

Nach vorangegangenem Abspaltschritt wird der Ansatz fünf Mal fünf Minuten mit abs. DMF gewaschen. Dann versetzt man das Harz mit den vorher in einem Becherglas in abs. DMF gerade gelösten jeweiligen Kupplungsreagenzien (12 eq der Fmoc-geschützten Aminosäure, 18 eq HOBt) und spült das Becherglas mit wenig abs. DMF nach. Hiernach pipettiert man 13.2 eq DIC in das Reaktionsgefäß. Man lässt zunächst 4 h bei Raumtemperatur kuppeln und kontrolliert die Vollständigkeit der Kupplung mit dem Kaiser-Test, bevorzugt aber durch den Einsatz einer Bromphenolblau-Lösung (0.05 M in DMF; 20

$\mu\text{L/g}$  Harz). Bei positivem Testergebnis wird für je eine Stunde so lange nachgekuppelt, bis dieser negativ ausfällt. Am Harz haftende Bromphenolblau-Reste lassen sich leicht durch Waschen mit einer Lösung von 5 % DIEA in DMF entfernen. Werden Mischungen aus Fmoc-geschützter und permanent blockierter Aminosäure eingesetzt, beträgt das Mischungsverhältnis 11.4 : 0.6 eq bzgl. der tatsächlichen Harzbelegung.

#### *Acetylierung des N-Terminus bei Peptidsynthesen*

Das in DMF gequollene, bis auf den N-Terminus voll geschützte Harz wird mit einer Lösung aus 10 eq Acetanhydrid und 50 eq TEA (1 mL/100 mg Harz) versetzt. Man lässt 2 h bei Raumtemperatur reagieren. Anschließend wäscht man ein mal mit einer Lösung von 10 % TEA in DMF und danach gründlich mit DMF und Ether.

#### *Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen*

a) o-Chlorotrylchlorid-Harz und b) PAM-Harz: Man versetzt das Harz mit einer Mischung (1 mL/100 mg Harz) aus 82.5 % TFA, je 5 % Thioanisol, Phenol und Wasser sowie 2.5 % EDT („Reagenz K“) versetzt und lässt vier Stunden reagieren. Hiernach wird mehrfach gründlich mit DMF gewaschen. Im Falle des o-Chlorotrylchlorid-Harzes wird das Peptid gleichzeitig vom Harz abgespalten; durch Variation der Reaktionsdauer mit HPLC-Kontrolle des mit MTBE gefällten Rohpeptids (mehrfache Fällung, Zentrifugation und erneute Suspension zur Grobentfernung der Abspaltreageagenzien) können die Abspaltbedingungen optimiert werden. Im Falle des PAM-Harzes verbleibt das entschützte Peptid am Harz.

c) TentaGel-Harz: Das Harz wird mit einer Mischung (1 mL/100 mg Harz) aus 82 % TFA, 6 % Mercaptoessigsäure und je 4 % Thioanisol, Phenol und Wasser versetzt. Man lässt vier Stunden bei Raumtemperatur reagieren. Hiernach wird zwei mal mit 90 %er wässriger TFA, zwei mal mit 10 %igem TEA in DMF und mehrfach gründlich mit DMF gewaschen.

#### *Abspaltung des Peptids vom Harz*

a) o-Chlorotrylchlorid-Harz: Das mit Ether gründlich gewaschene Harz wird mit einer Mischung aus TFE und DCM (1:1 v/v, 2 mL/100 mg Harz) versetzt und eine Stunde

geschüttelt. Dieser Vorgang wird wiederholt, das Harz mit DCM gewaschen und die Fraktionen vereinigt. Nach Einengen der Lösung und Versetzen mit wenig Wasser wird das Rohpeptid oder das Aminosäurederivat an der Gefriertrocknungsanlage getrocknet.

b) PAM-Harz: Nach der Entschützung der Seitenketten des Peptids wird das Harz mit einer Mischung aus TFA und TFMSA (10:1 v/v, 2 mL/100 mg Harz) versetzt. Nach 10 Minuten Reaktionszeit kann das Peptide im Falle einer präparativen Harzabspaltung mit Ether bei 0 °C gefällt und abzentrifugiert werden. Man wäscht mehrmals mit Ether nach. Für eine Präparation auf dem MALDI-Probenteller ist dieser Schritt nicht notwendig. Hier lässt man die Abspaltlösung abziehen und versetzt den Rückstand mit der MALDI-Matrix.

c) TentaGel-Harz: Nach der Entschützung der Seitenketten des Peptids wird eine Spatelspitze des Harzes mit HMB-Anker mit 400 µL einer 1 N NaOH-Lösung versetzt. Man schüttelt 20 Minuten bei Raumtemperatur, neutralisiert mit Essigsäure und lyophilisiert die Probe. Für die Harzabspaltung einzelner Beads auf dem Probenteller wurde eine eigene Vorschrift entwickelt (s. dort). Im Falle von TentaGel-Harz ohne HMB-Anker erfolgte die Abspaltung mit 400 µL einer 20 mg/mL enthaltenden CNBr-Lösung in 0.1 N HCl durch Reaktion im Dunkeln über Nacht und anschließender Gefriertrocknung der Probe.

#### *Vorschriften für die Synthese der N-terminal derivatisierten Aminosäuren*

Für die Synthese der N-terminal derivatisierten Aminosäuren wird o-Chlorotrylchlorid-Harz (Beadgröße 200-400 mesh, mit 2 % DVB quervernetzt) eingesetzt und die Belegung mit der Aminosäure nach oben beschriebenem Verfahren auf 0.7 mMol/g Harz eingestellt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird die für die gewünschte Cappinggruppe zu wählende Carbonsäure mittels DIC/HOBt-Verfahren an die freien N-Termini gekuppelt (3 eq Säurekomponente, 3.3 eq DIC, 4.5 eq HOBt, 4 h Reaktionsdauer). Die Abspaltung vom Harz erfolgt gemäß dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Verfahren. Ohne die Notwendigkeit einer Aufreinigung ergeben sich Gesamtausbeuten von 85-90 % bezüglich der theoretischen Harzbelegung.

Zur Darstellung der formylierten Derivate wurden zwei Kupplungsvarianten eingesetzt:

WSC-Variante: 2 eq WSC\*HCl werden in wenig DCM suspendiert und bei 0 °C mit 4 eq Ameisensäure versetzt. Nach 15 Minuten gibt man die Lösung zum mit DMF gequollenen Harz, das mit der N-terminal entschützten Aminosäure belegt ist, versetzt mit 1 eq NMM und belässt das Reaktionsgefäß unter gelegentlichem Schwenken bei 0 °C. Hiernach lässt man noch über Nacht bei Raumtemperatur reagieren und arbeitet dann wie gewohnt auf.

EEDQ-Variante: Man versetzt das Harz, das mit der N-terminal entschützten Aminosäure belegt ist, mit einer Lösung aus 1.1 eq Ameisensäure und 1.2 eq EEDQ in wenig DCM und lässt über Nacht bei Raumtemperatur reagieren. Hiernach wird wie gewohnt aufgearbeitet.

### 12.1.2 MALDI-Massenspektroskopie

Einzelne TentaGel-Beads werden mit einer Stahlnadel gepickt und in ein Eppendorfggefäß platziert, das 10 µL einer Lösung von 10 % TEA in Wasser enthält. Die Harzabspaltung erfolgt über Nacht. Ein Aliquot (meist 1 µL) dieser Lösung wird auf den Probenhalter pipettiert; man lässt die Lösung abdampfen. Danach werden 1 µL (für lose Beads) oder 0.5 µL (für vom Klebefilm entfernte Beads) einer 0.1 M Lösung von DHB in 30 %igem wässrigen Acetonitril, die 0.1 % TFA enthält, aufpipettiert, und trocknet die Mischung mit Hilfe eines Föns niedriger Stufe. Man erhält nadelförmige Kristalle der MALDI-Matrix.

Die MALDI-Massenspektren werden im Positivionen-Reflektordetektormodus mit einer Saugspannungsverzögerung von 70 ns aufgenommen. Je 128 Laserpulse werden für ein Spektrum summiert. Im Falle loser Beads wird das Niedrigmassengatter bei 600 D, im Falle vom Klebefilm entfernter Beads bei 900 D aktiviert. Ein Gemisch aus Angiotensin I und III (je  $10^{-5}$  M) dient zur externen Kalibrierung. Die gefundene Massenauflösung (im Sinne der Definition mittels der Halbwertsbreite eines Peaks) von ca. 2500 ist hinreichend für eine durch die Codierungs- und Decodierungsanforderungen benötigte Massenbestimmungsgenauigkeit von  $\pm 1$  D.

### 12.1.3 Codierung und Decodierung kombinatorischer Bibliotheken

Alle Codierungs- und Decodierungsschritte kombinatorischer Peptidbibliotheken wurden mit dem Programm *Biblio*<sup>[126]-[128]</sup> durchgeführt. Dessen Funktionsweise ist in den Kap. 6 bzw. 7 der vorliegenden Arbeit beschrieben. Hierbei wird wie folgt vorgegangen: Zunächst werden die zur Verfügung gestellten N-terminalen Cappinggruppen und deren Massen (z.B. 42 D für die Acetylgruppe) sowie das gewählte Massentoleranzintervall in die entsprechenden Eingabemasken des Programms eingegeben. Für alle synthetisierten Bibliotheken wurde ein Toleranzintervall von  $\pm 1$  D eingesetzt. Dann wird die zu codierende Bibliothek zeilenweise in die Eingabemaske „Bearbeiten einer Bibliothek“ eingegeben. Jede Aminosäureposition der Bibliothek wird als zusammenhängende Abfolge von Einbuchstabensymbolen der Aminosäuren eingegeben. Dies sei für die diesem Abschnitt zugrunde liegende Heptapeptidbibliothek „Modellcap2-Lib“, die in den Kap. 6 bzw. 7 der vorliegenden Arbeit diskutiert werden, beispielhaft erläutert: Die Aminosäureposition 10 dieser Bibliothek enthält die Aminosäuren P, I und L (siehe Abb. 12.1 bzw. 12.8), die einzugebende Buchstabenfolge lautet also „PIL“. Dies wird für alle sechs restlichen Aminosäurepositionen der Heptapeptidbibliothek wiederholt. Daraufhin berechnet *Biblio* ein optimales Cappingmuster; die Parameter dieser Optimierung sind in den Kapiteln 6 und 7 der vorliegenden Arbeit ausgeführt. Man erhält folgendes Bibliotheksschema als Ausgabematrix (Abb. 12.1):

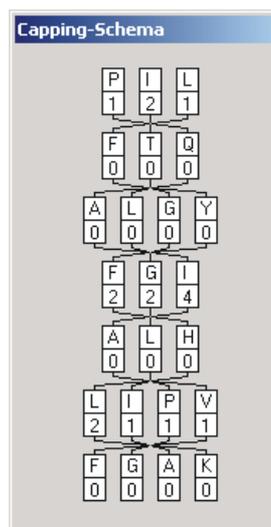


Abb. 12.1: Ausgabeschema der von Biblio codierten Heptapeptidbibliothek „Modellcap2-Lib“. Unter den Einbuchstabensymbolen für die Aminosäuren sind die Cappinggruppen notiert: 0 = kein Capping, 1 = Acetyl-, 2 = Benzoyl-, 4 = Propionyl-. Die Aminosäurepositionen sind in Syntheserichtung von oben nach unten (10 bis 1) aufgeführt. Die Verbindungslinien symbolisieren den Verlauf der „Split, Mix and Combine“-Synthese.

Unter jedem Aminosäurebuchstaben ist die terminierende Gruppe mit einer Zahl codiert. Im vorliegenden Fall der Heptapeptidbibliothek bedeutet „0“ kein Capping, „1“ Capping mit der Acetylgruppe, „2“ Capping mit der Benzoylgruppe und „4“ Capping mit der Propionylgruppe. Die ebenfalls angebotene 2-Naphtoylgruppe (Symbol „3“) erwies sich als nicht notwendig für diese Bibliothek. Schließlich wird die Synthese der Bibliothek diesen Vorgaben entsprechend durchgeführt.

Im Folgenden sei die Decodierung der Massen eines Einzelbead-MALDI-Massenspektrums exemplarisch dargestellt. Das in Abb. 12.2 gegebene Spektrum ist ein typisches MALDI-Massenspektrum, das eine Sequenz aus den 299 Stichproben der Heptapeptidbibliothek „Modellcap2-Lib“ wiedergibt. Die für die Decodierung der Sequenz verwendeten Peaks sind mit ihren monoisotopischen Massen abgebildet.

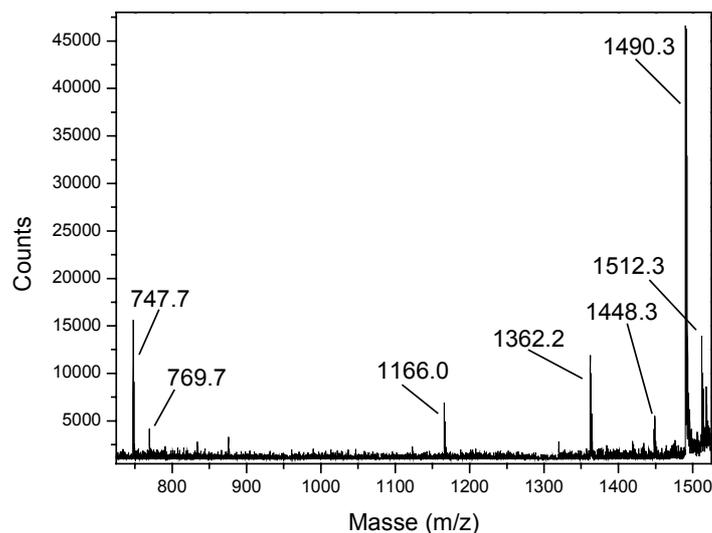


Abb. 12.2: Typisches Einzelbead-MALDI-Massenspektrum aus der Bibliothek „Modellcap2-Lib“. Die für die Decodierung mit *Biblio* verwendeten Peaks sind mit ihren monoisotopischen Massen ( $M+H$ ) markiert. Die Zuordnung der Peaks ist in Abb. 12.2 (umseitig) gegeben.

Diese Peaks werden nun in das entsprechende Dialogfeld von *Biblio* eingegeben. Zuvor jedoch muss berücksichtigt werden, dass die vorliegende Programmversion von *Biblio* den Massenbeitrag des Linkers nicht berücksichtigen kann. Dessen Massenbeitrag muss somit von den gemessenen Massen abgezogen werden, um sie der Decodierung zugänglich zu machen. Des weiteren ist *Biblio* in der vorliegenden Programmversion nicht in der Lage, den Beitrag der Acetylierung des Hauptpeptids (42 D) bei der Codierung bzw. Decodierung einzuberechnen. Im Laufe der Serienmessungen zeigte sich allerdings, dass das MS-Signal

des Hauptpeptids in der Regel mit der deutlich stärksten Intensität auftritt. Man konnte sich somit behelfen, indem man ein solches Signal als mutmaßliches Hauptpeptid annahm, und eine um den Beitrag der Acetylierung (42 D) niedrigere Masse in das Dialogfeld eingab. Beide geforderten Leistungsmerkmale (Beiträge des Linkers und der Acetylierung des Hauptpeptids) werden in der nächsten Programmversion (Version 3) verfügbar sein.

Aus den in dieser Weise korrigierten Massen berechnet das Programm 100 Sequenzvorschläge, die mit Qualitätsfaktoren gewichtet sind, die die Übereinstimmung der berechneten Massen der einzelnen Capping- und Hauptpeptide mit den gemessenen Massen wiedergeben. Ein Qualitätsfaktor von 100 % bedeutet eine völlige Übereinstimmung aller gemessenen Massen mit den durch *Biblio* für diese Sequenz berechneten Massen im Rahmen des gegebenen Massenintervalls, das für alle codierten Bibliotheken der vorliegenden Arbeit  $\pm 1$  D beträgt. Die Massenbestimmungsgenauigkeit bei den gemessenen Spektren beträgt ebenso  $\pm 1$  D; um zufällige Messungenauigkeiten berücksichtigen zu können, schlägt *Biblio* auch Sequenzen vor, deren Massen stärker als  $\pm 1$  D von der berechneten Masse abweichen. Diesen kommt ein entsprechend niedrigerer Qualitätsfaktor zu. Die Sequenz mit dem höchsten Qualitätsfaktor gibt die richtige Sequenz wieder. Nachfolgend aufgeführt sind die Qualitätsfaktoren und die Häufigkeit dieser Faktoren der Sequenzvorschläge für o.g. Spektrum.

Qualitätsfaktor [%]	Häufigkeit
100	1
90	1
75	5
70	3
65	1
57.5	2
50	87

Tab. 12.1: Qualitätsfaktoren und deren Häufigkeit für die Massen des Spektrums in Abb. 12.2

Es zeigte sich ferner, dass *Biblio* für alle erfolgreich decodierten Sequenzen nur je eine einzige Sequenz mit einem Qualitätsfaktor von 100 % vorschlug; dies galt auch dann, wenn ein Massenspektrum neben den Haupt- und Codierungssequenzen zusätzliche Signale enthielt (siehe Abb. 12.2). Das Programm berechnete auch mit diesem überbestimmten Satz von Massen nur eine Sequenz, der ein Qualitätsfaktor von 100 % zukam. Daher wurden nur

Sequenzen als richtig angesehen, denen *Biblio* einen Qualitätsfaktor von 100 % zuordnete. Im vorliegenden Beispiel wichen beispielsweise bei der Sequenz mit einem Qualitätsfaktor von 90 % (Ac-KVLIYQP) zwei der vier vorhergesagten Massen um je 1.5 D von den gemessenen Massen ab, eine Abweichung die außerhalb des Intervalls von  $\pm 1$  D liegt. Da vor jeder Messreihe, wie in Kap. 12.1.12 beschrieben, stets geeicht wurde, kann eine solche Abweichung von den vorhergesagten Werten ausgeschlossen werden. Somit konnten dieser Sequenzvorschlag und solche mit noch niedrigerem Qualitätsfaktor verworfen werden. Abb. 12.3 zeigt das decodierte Spektrum. Die weiteren Peaks ergeben sich aus den Massendifferenzen zu den zugrunde liegenden Referenzsignalen.

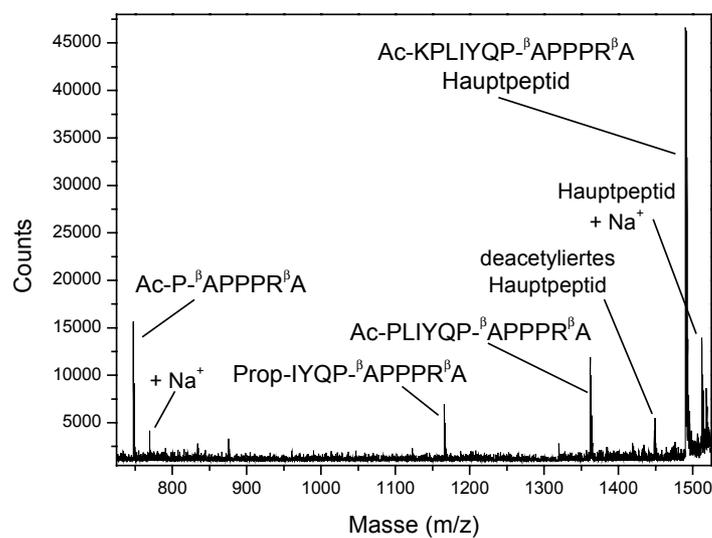


Abb. 12.3: Decodiertes Einzelbead-Massenspektrum der Sequenz Ac-KPLIYQP. Das Spektrum weist außerdem das typische Verunreinigungsmuster eines Einzelbeadspektrums auf (Natriumaddukte zweier Peptide und ein Nebenproduktpeak, der das deacetylierte Hauptpeptid wiedergibt).

In Tab. 12.2 (umseitig) sind die berechneten und gemessenen monoisotopischen Massen der erwarteten Peptide dieser Sequenz aufgeführt.

Peptid	Summenformel (M+H <sup>+</sup> )	berechnete Masse [D] (M+H <sup>+</sup> )	gefundene Masse [D] (M+H <sup>+</sup> )
Ac-KPLIYQP- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>71</sub> H <sub>113</sub> N <sub>18</sub> O <sub>17</sub>	1489.8	1490.3
Ac-PLIYQP- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>65</sub> H <sub>101</sub> N <sub>16</sub> O <sub>16</sub>	1361.8	1362.2
Prop-IYQP- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>55</sub> H <sub>85</sub> N <sub>14</sub> O <sub>14</sub>	1165.6	1166.0
Ac-P- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>34</sub> H <sub>55</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	747.4	747.7

Tab. 12.2: Berechnete und gemessene monoisotopische Massen der erwarteten Peptide der Sequenz Ac-KPLIYQP. Die Massendifferenz beträgt maximal 0.5 D.

### 12.1.4 Klebefixierung von TentaGel-Beads

Für die Klebefixierung der festphasengebundenen Beads wird ein Zweikomponenten-Epoxidklebstoff auf Basis von Bisphenol A, Handelsname „Henkel Kraft-Mix“ eingesetzt. Die Klebung wird auf Glaspetrischalen mit einem Innendurchmesser von 70 mm durchgeführt, deren Rückseite mit einem Millimeterraster versehen wird (siehe Kap. 8). Das Volumen der Klebemischung wird so bemessen, dass eine Schichtdicke des Klebefilms von 150 µm resultiert. Je 335 µL beider viskoser Komponenten und 1330 µL abs. Toluol werden gründlich vermischt und homogenisiert, so dass eine fließfähige Lösung mit einer Verdünnung von 2:1 (Lösemittel : Klebstoff, v/v) resultiert. Diese wird auf eine auf 80 °C vorgewärmte Petrischale pipettiert und waagrecht gleichmäßig verteilt. Man heizt noch wenige Sekunden nach und lässt das Lösemittel dann unter einem gut ziehenden Abzug turbulenzfrei ablüften. Nach einigen Minuten werden die in einer Mischung aus DCM und Toluol (1:4, v/v) suspendierten Beads gleichmäßig auf die Klebefläche aufgetragen und man lässt die Klebung 36 h unter dem Abzug aushärten.

Die Trocknungsdauer vor der Auftragung der Beads auf die Klebefläche ist empfindlich von der Raumtemperatur abhängig. Abb. 12.4 gibt die durch lineare Regression ermittelte Kennlinie wieder, die für eine Klebung der Schichtdicke 150 µm gefunden wurde. Der funktionale Zusammenhang lautet:  $t$  (Trocknungsdauer in Minuten) =  $33.5 - 0.83T$  (Temperatur in °C). Diese Kennlinie gilt nur für ein Temperaturintervall zwischen 19 und 26 °C.

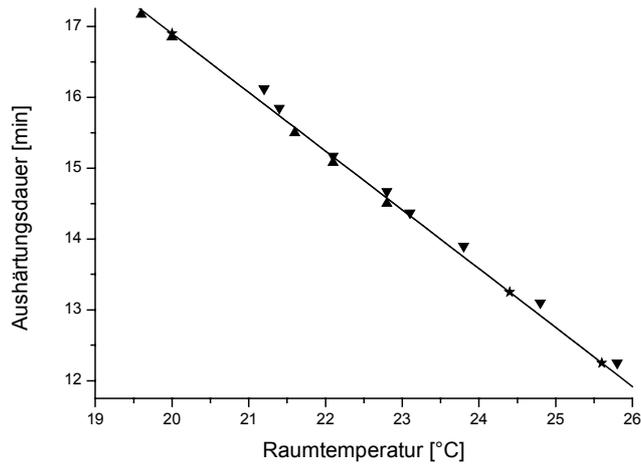


Abb. 12.4: Kennlinie der Klebefixierung. Dreiecke mit der Spitze nach unten indizieren eine leicht zu lange, mit der Spitze nach oben eine leicht zu kurze Wartezeit vor der Auftragung.

Eine Abweichung von lediglich fünf Sekunden gegenüber der durch diese Kennlinie definierten Trocknungsdauer führt bereits zum Misslingen der Klebung; wartet man zu lange, haften die Beads nicht; wartet man nicht lange genug, versinken die Beads im Klebefilm, was unter dem Mikroskop unter Zuhilfenahme einer Stahlnadelspitze leicht festzustellen ist. Die erforderliche Belegungsdichte der Beads wurde bereits in Kapitel 8 der vorliegenden Arbeit diskutiert.

### 12.1.5 Protokolle der biologischen Tests

#### *ELISA-Test mit Beads in Suspension, typische Vorschrift*

Eine Spatelspitze der zu testenden Beads wird in einer einprozentigen Lösung von Milchpulver in 1xTBS-Puffer suspendiert (Gesamtvolumen der Reaktionsmischung: 1 mL) und 2 h bei 0 °C zur Blockade hydrophiler Oberflächen der Beadmatrix inkubiert (Gesamtvolumen der Reaktionsmischung 1 mL). Alternativ kann für alle Schritte auch 1xPBS-Puffer eingesetzt werden, wenn der Sekundärantikörper nicht mit alkalischer Phosphatase markiert ist. Nach mehrfacher gründlicher Waschung der Beads mit 1xTBS-Puffer wird das Harz mit dem Serum in einer Verdünnung von 1:500 in einer 0.1 %igen Lösung von Milchpulver in 1xTBS oder 1xPBS über Nacht bei 0 °C inkubiert. Nach Entfernung des Serums und erneuter gründlicher Waschung mit 1xTBS oder 1xPBS werden die Beads mit dem Sekundärantikörper unter identischen Bedingungen, aber nur 2 h lang bei 0 °C inkubiert und dann gewaschen. Hiernach werden die jeweiligen Farbstoffe oder Substrate bzw. das Streptavidin/R-Phycoerythrin-Konjugat nach Herstellerangaben rekonstituiert und im Puffer verdünnt. Nach Umsetzung der Farbstoffe mit den Beads (Dauer und Bedingungen nach Herstellerangaben) und einem erneuten Waschschrift werden Farbreaktionen unter dem Durchlichtmikroskop fotografisch dokumentiert. Die Ansätze mit R-Phycoerythrin werden unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

#### *Immunfluoreszenzscreening mit klebefixierten Beads, typische Vorschrift*

Die zu testenden Beads werden in einer einprozentigen Lösung von BSA in 1xTBS-Puffer gequollen und 2 h bei 0 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen der Reaktionsmischung beträgt 3 mL für die verwendete Petrischalengröße (70 mm Durchmesser). Man wäscht mehrfach gründlich mit 1xTBS und inkubiert die Beads dann mit dem Serum (1:100) in einer 0.1 %igen Lösung von BSA in 1xTBS über Nacht bei 0 °C. Nach erneuter gründlicher Waschung mit 1xTBS werden die Beads 2 h im Dunkeln unter ansonsten identischen Bedingungen mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:100) inkubiert, gründlich mit 1xTBS gewaschen und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Hierzu wird ein 10fach vergrößerndes Fluoreszenzobjektiv verwendet. Jede Aufnahme entspricht einer Probenschalenfläche von etwa 1 mm<sup>2</sup>. Die Belichtungszeiten für die Fluoreszenzphotografien mit der CCD-Kamera liegen in Abhängigkeit der Stärke des

Hintergrunds zwischen 0.02 und 0.1 s. Zur Reduktion des einstrahlenden Fluoreszenzlichts wird ein Hitzeabsorptions- und ein ND4-Helligkeitsfilter eingesetzt. Belichtungskorrekturen der Aufnahmen durch Verstärkung oder Kontraststeigerung erwiesen sich nicht als notwendig.

Die Entfernung des Immunkomplexes erfolgt durch viermalige, je viertelstündige Inkubation mit 6 M Guanidinhydrochlorid-Lösung, die mit konz. HCl auf pH 1 eingestellt war. Hiernach werden die Beads erneut gründlich mit 1xTBS gewaschen.

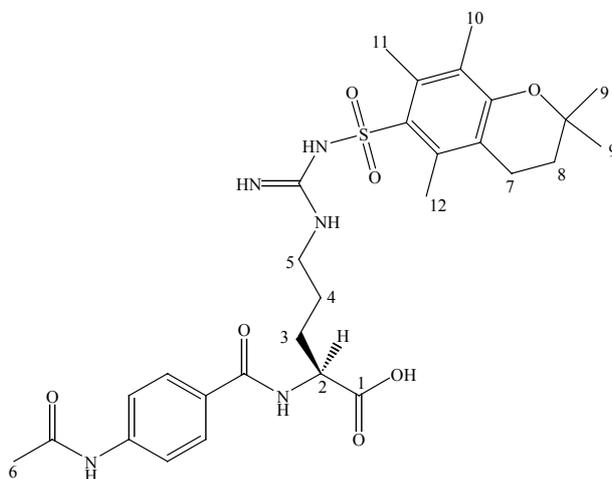
Verwendete Pufferlösungen:

1xTBS:	50 mM Tris*HCl, pH 7.5 150 mM NaCl ad 1 L mit destilliertem Wasser
1xPBS:	150 mM Kaliumphosphat, pH 7.2 150 mM NaCl ad 1 L mit destilliertem Wasser

## 12.2 Synthetische Daten

### 12.2.1 Aminosäurederivate

#### 12.2.1.1 N- $\alpha$ -4-Acetaminobenzoyl-N<sup>G</sup>-2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-L-Arginin



Die Darstellung erfolgte gemäß Standardvorschrift (Kap. 12.1.1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, 300 K, DMSO,  $\delta$  in ppm): 10.14 (s, 1H, OH), 8.42 (d, 1H,  $^3J_{\text{NH, H2}} = 7.7$  Hz, NH-Arg), 7.95 (s, 1H, NH-Aab), 7.82 (d, 2H,  $^3J_{\text{O-Ar}} = 8.7$  Hz, Aab-Ar), 7.65 (d, 2H,  $^3J_{\text{O-Ar}} = 8.7$  Hz, Aab-Ar), 6.80-6.40 (m, 3H, Gua-H), 3.85 (q, 1H, H-2), 3.06 (m, 2H, H<sub>2</sub>-5), 2.58-2.46 (m, 4H, H<sub>2</sub>-7, H<sub>2</sub>-3), 2.08 (m, 9H, H<sub>3</sub>-10, H<sub>3</sub>-11, H<sub>3</sub>-12), 2.07 (s, 3H, H<sub>3</sub>-6), 1.75 (m, 2H, H<sub>2</sub>-4), 1.50 (m, 2H, H<sub>2</sub>-8), 1.25 (s, 6H, H<sub>3</sub>-9)

**<sup>13</sup>C-NMR** (250 MHz, 300 K, DMSO,  $\delta$  in ppm): 173.611 (Aab-CO), 168.615 (CO-NH-Aab), 165.888, 162.247, 155.939, 152.287, 142.003, 134.474, 134.026, 128.256, 128.135, 122.599, 117.931, 117.697 (Aromaten), 73.395 (C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Pmc), 38.499, 35.719, 32.088, 30.719, 28.040, 26.385, 24.051, 20.693, 18.077, 17.014, 11.849 (Alkyl-C, Methylen-C)

**IR** (KBr-Pressling, in cm<sup>-1</sup>): 3333 (N-H(CO)), 2928 (OH), 1637 (CO), 1542 (CO-NH), 1164 (R-SO<sub>2</sub>-N)

**MW** (C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S): 601.7 g/Mol

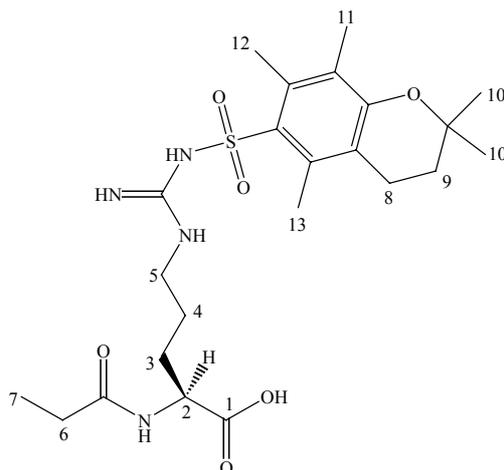
**ESI-MS**: 602.3 g/Mol (M+H<sup>+</sup>)

**DC:**  $R_f = 0.12$  ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH} = 90:8:2$ )

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +43.0^\circ$  ( $c = 1\%$  in DMF)

**Schmelzpunkt:** 116-117 °C

### 12.2.1.2 N- $\alpha$ -Propionyl-N<sup>G</sup>-2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-L-Arginin



Die Darstellung erfolgte gemäß Standardvorschrift (Kap. 12.1.1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, 300 K,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm): 7.15 (d, 1H,  $^3J_{\text{NH,H2}} = 7.4$  Hz, NH-Arg), 6.50-6.20 (m, 3H, Gua-H), 3.85 (q, 1H,  $^3J_{\text{H-2,NH}} = 7.5$  Hz,  $^3J_{\text{H-2,H-3}} = 15.1$  Hz, H-2), 2.60-2.44 (m, 4H, H<sub>2</sub>-5, H<sub>2</sub>-8), 2.19 (q, 2H,  $^3J_{\text{H-6,Me-7}} = 7.5$  Hz,  $^3J_{\text{H-6,H6}} = 15.1$  Hz, H<sub>2</sub>-6), 1.84 (m, 6H, H<sub>2</sub>-3, H<sub>2</sub>-4, H<sub>2</sub>-9), 1.22 (m, 9H, H<sub>3</sub>-11, H<sub>3</sub>-12, H<sub>3</sub>-13), 1.02 (m, 9H, H<sub>3</sub>-7, H<sub>3</sub>-10)

**<sup>13</sup>C-NMR** (250 MHz, 300 K, DMSO,  $\delta$  in ppm): 175.737 (Amid-CO), 175.030 (COOH), 153.860, 142.993, 132.771, 132.616, 122.160, 118.105 (Aromat), 73.755 (C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Pmc), 31.494, 30.289, 29.421, 29.379, 29.153, 28.950, 26.744, 25.318, 21.385, 18.437, 17.397, 12.093, 9.761 (Alkyl-C, Methylen-C)

**IR** (KBr-Pressling, in  $\text{cm}^{-1}$ ): 3350 (N-H(CO)), 2974 (OH), 1652 (CO), 1542 (CO-NH), 1164 (R-SO<sub>2</sub>-N)

**MW** ( $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ ): 496.6 g/Mol

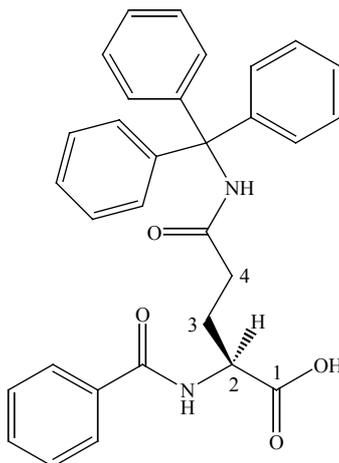
**ESI-MS:** 495.4 (M-H<sup>+</sup>)

**DC:**  $R_f = 0.27$  ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH} = 90:8:2$ )

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +15.2^\circ$  ( $c = 0.5\%$  in DMF)

**Schmelzpunkt:** 84-85 °C

### 12.2.1.3 N- $\alpha$ -Benzoyl-N- $\gamma$ -trityl-L-Glutamin



Die Darstellung erfolgte gemäß Standardvorschrift (Kap. 12.1.1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz, 300 K,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm): 7.28-7.07 (m, 20H, Aromaten), 3.83 (q, 1H,  $^3J_{\text{H-2,NH}} = 8.8$  Hz,  $^3J_{\text{H-2,H-3}} = 17.5$  Hz, H-2), 2.72-2.66 (m, 2H, H<sub>2</sub>-4), 2.55-2.45 (m, 2H, H<sub>2</sub>-3)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (250 MHz, 300 K, DMSO,  $\delta$  in ppm): 173.258 (Trt-Amid-CO), 173.070 (Bz-CO), 168.486 (COOH), 144.120, 132.759, 131.874, 128.638, 128.545, 127.995, 127.376, 127.161 (Aromaten), 71.067 (C-Trt), 33.573, 26.824, 23.288 (Methylen-C)

**IR** (KBr-Pressling, in  $\text{cm}^{-1}$ ): 3308 (N-H(CO)), 2932 (OH), 1650 (CO), 1523 (CO-NH), 766, 700 (monosubst. Aromaten)

**MW** ( $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$ ): 492.6 g/Mol

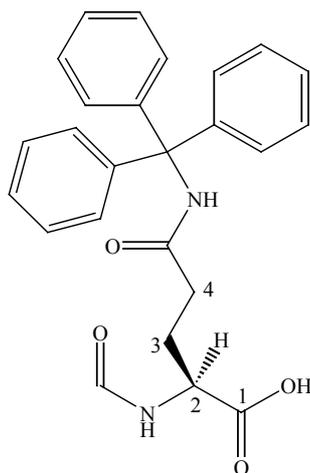
**ESI-MS:** 491.3 ( $\text{M-H}^+$ )

**DC:**  $R_f = 0.65$  ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH} = 90:8:2$ )

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +3.4^\circ$  ( $c = 0.5\%$  in DMF)

**Schmelzpunkt:** 77-78 °C

#### 12.2.1.4 N- $\alpha$ -Formyl-N- $\gamma$ -trityl-L-Glutamin



Die Darstellung erfolgte gemäß der WSC-Variante (Kap. 12.1.1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz, 300 K, DMSO,  $\delta$  in ppm): 8.66 (s, 1H, COOH), 8.29 (d, 1H,  $^3J_{\text{Formyl,Amid}} = 8.1$  Hz, For-H), 7.30-7.15 (m, 15H, Aromaten), 3.87 (q, 1H,  $^3J_{\text{H-2,NH}} = 9.5$  Hz,  $^3J_{\text{H-2,H-3}} = 19.1$  Hz, H-2), 1.96-1.88 (m, 2H, H<sub>2</sub>-4), 1.76-1.65 (m, 2H, H<sub>2</sub>-3)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (250 MHz, 300 K, DMSO,  $\delta$  in ppm): 172.881 (Trt-Amid-CO), 171.119 (For-CO), 164.454 (COOH), 128.469, 128.170, 127.779, 127.386 (Aromaten), 69.176 (C-Trt), 50.055, 32.278, 27.167 (Methylen-C)

**IR** (KBr-Pressling, in  $\text{cm}^{-1}$ ): 3289 (N-H(CO)), 2926 (OH), 1731 (For-CO), 1654 (CO), 1524 (CO-NH), 767, 701 (monosubst. Aromaten)

**MW** ( $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ ): 416.5 g/Mol

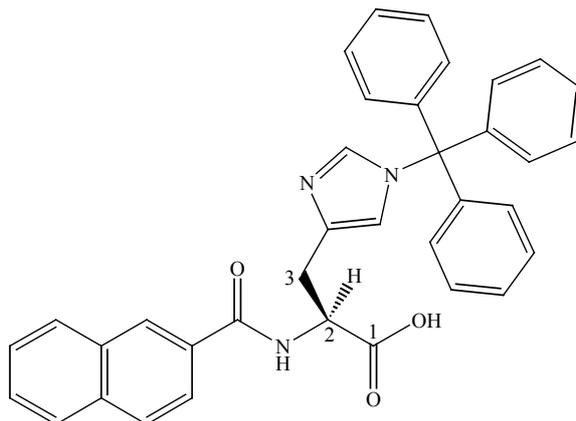
**ESI-MS:** 415.3 ( $\text{M-H}^+$ )

**DC:**  $R_f = 0.40$  ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH} = 90:8:2$ )

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +2.7^\circ$  ( $c = 1\%$  in DMF)

**Schmelzpunkt:** 200-201 °C

### 12.2.1.5 N- $\alpha$ -2-Naphtoyl-N-im-trityl-L-Histidin



Die Darstellung erfolgte gemäß Standardvorschrift (Kap. 12.1.1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, 300 K,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm): 8.22 (s, 1H, N=CH-N), 7.99 (s, 1H, C=CH-N), 7.58-7.15 (m, 22H, Aromaten), 3.88 (q, 1H,  $^3J_{\text{H-2,NH}} = 8.8$  Hz,  $^3J_{\text{H-2,H-3}} = 17.7$  Hz, H-2), 2.92 (d, 2H,  $^2J_{\text{H-3,H-3}} = 28.6$  Hz, H<sub>2</sub>-3)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (400 MHz, 300 K, DMSO,  $\delta$  in ppm): 174.149 (Naph-CO), 166.412 (COOH), 141.158, 137.043, 134.772, 132.597, 131.113, 129.521, 128.993, 128.397, 128.321, 128.226, 128.070, 127.070 (Aromaten), 36.502, 28.432 (Methylen-C)

**IR** (KBr-Pressling, in  $\text{cm}^{-1}$ ): 3393 (N-H(CO)), 2928 (OH), 1653 (CO), 1552 (CO-NH), 778, 701 (monosubst. Aromaten)

**MW** ( $\text{C}_{36}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$ ): 551.6 g/Mol

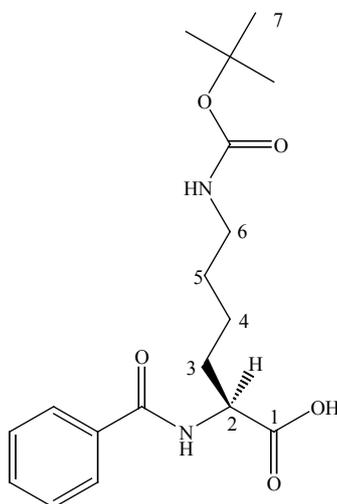
**ESI-MS:** 552.4 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )

**DC:**  $R_f = 0.60$  ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH} = 90:8:2$ )

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 21.0^{\circ}$  (c = 0.5 % in DMF)

**Schmelzpunkt:** 61-62 °C

### 12.2.1.6 N- $\alpha$ -Benzoyl-N- $\epsilon$ -*tert*-butyloxycarbonyl-L-Lysin



Die Darstellung erfolgte gemäß Standardvorschrift (Kap. 12.1.1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz, 300 K,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm): 7.47-7.30 (m, 5H, Aromat), 4.25-4.21 (m, 1H, H-2), 3.17-3.02 (m, 2H,  $\text{H}_2$ -6), 2.01.-1.90 (m, 6H,  $\text{H}_2$ -3,  $\text{H}_2$ -4,  $\text{H}_2$ -5), 1.43 (s, 9H,  $\text{H}_9$ -7)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (250 MHz, 300 K,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm): 174.508 (Bz-CO), 162.717 (COOH), 133.520, 131.776, 128.505, 127.197 (Aromat), 52.628 (C-( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 39.923, 36.555, 31.441, 29.092, 28.905, 28.363 (Methylen-C, Methyl-C)

**IR** (KBr-Pressling, in  $\text{cm}^{-1}$ ): 3373 (N-H(CO)), 2934 (OH), 1685, 1652 (CO), 1552 (CO-NH)

**MW** ( $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$ ): 350.4 g/Mol

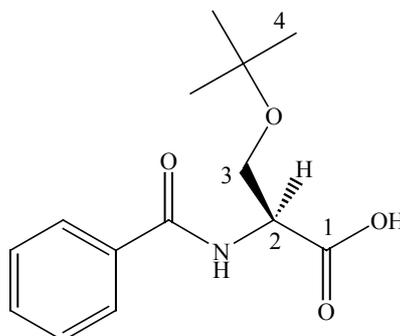
**ESI-MS:** 349.3 ( $\text{M-H}^+$ )

**DC:**  $R_f = 0.62$  ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH:AcOH = 90:8:2)

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 1.6^{\circ}$  (c = 1 % in DMF)

**Schmelzpunkt:** 192-193 °C

### 12.2.1.7 N- $\alpha$ -Benzoyl-O-*tert*-butyl-L-Serin



Die Darstellung erfolgte gemäß Standardvorschrift (Kap. 12.1.1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz, 300 K,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm): 7.78.-7.77, 7.48-7.34 (m, 5H, Aromat), 3.90 (m, 2H,  $\text{H}_2$ -3), 3.63 (q, 1H,  $^3J_{\text{H-2,NH}} = 4.8$  Hz,  $^3J_{\text{H-2,H-3}} = 9$  Hz, H-2), 1.14 (s, 9H,  $\text{H}_9$ -4)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (250 MHz, 300 K,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm): 173.004 (Bz-CO), 167.517 (COOH), 133.776, 131.835, 128.601, 127.147 (Aromat), 53.117 (C-( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 36.612, 31.562, 27.344 (Methylen-C, Methyl-C)

**IR** (KBr-Pressling, in  $\text{cm}^{-1}$ ): 3433 (N-H(CO)), 2928 (OH), 1732, 1698 (CO), 1558 (CO-NH)

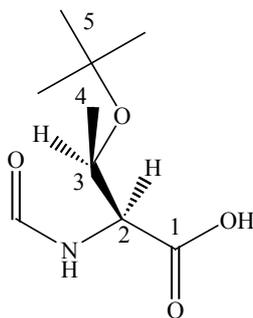
**MW** ( $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ ): 265.3 g/Mol

**ESI-MS:** 264.1 ( $\text{M-H}^+$ )

**DC:**  $R_f = 0.67$  ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH:AcOH = 90:8:2)

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 27.0^{\circ}$  (c = 0.5 % in DMF)

**Schmelzpunkt:** 55-56 °C

**12.2.1.8 N- $\alpha$ -Formyl-O-<sup>tert</sup>-butyl-L-Threonin**

Die Darstellung erfolgte gemäß der EEDQ-Variante (Kap. 12.1.1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, 300 K, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm): 8.21 (s, 1H, For-H), 4.33 (m, 1H, H-3), 3.88 (q, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H-2,NH</sub> = 8.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-2,H-3</sub> = 17.4 Hz, H-2), 1.22 (s, 9H, H<sub>9-5</sub>), 1.08 (d, 3H, <sup>3</sup>J<sub>H-3,H-4</sub> = 6.4 Hz, H<sub>3-4</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (250 MHz, 300 K, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm): 171.554 (For-CO), 161.247 (COOH), 76.497, 66.116 (Methylen-C), 56.002 (C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.056 (<sup>t</sup>Bu-C), 18.060 (Methyl-C)

**IR** (KBr-Pressling, in cm<sup>-1</sup>): 3289 (N-H(CO)), 2926 (OH), 1731 (CHO), 1654 (CO), 1524 (CO-NH),

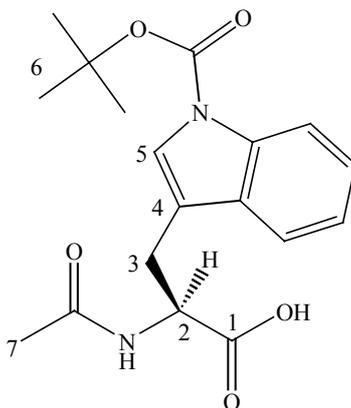
**MW** (C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>): 203.2 g/Mol

**ESI-MS**: 201.9 (M-H<sup>+</sup>)

**DC**: R<sub>f</sub> = 0.55 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:AcOH = 90:8:2)

**Drehwert**: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 24.0° (c = 1 % in DMF)

**Schmelzpunkt**: 128-129 °C

12.2.1.9 N- $\alpha$ -Acetyl-N-in-*tert.*butyloxycarbonyl-L-Tryptophan

Die Darstellung erfolgte gemäß Standardvorschrift (Kap. 12.1.1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz, 300 K, DMSO,  $\delta$  in ppm): 8.23 (d, 1H,  $^3J_{\text{NH,H-2}} = 7.9$  Hz), 8.03-8.00, 7.62-7.60, 7.35-7.22 (m, 4H, Aromaten), 7.50 (s, 1H, H-5), 4.50 (q, 1H,  $^3J_{\text{H-2,NH}} = 8.5$  Hz,  $^3J_{\text{H-2,H-3}} = 13.4$  Hz, H-2), 3.05 (m, 2H, H<sub>2</sub>-3), 1.79 (s, 3H, H<sub>3</sub>-7), 1.62 (s, 9H, H<sub>9</sub>-6)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (250 MHz, 300 K, DMSO,  $\delta$  in ppm): 173.034 (Ac-CO), 169.221 (COOH), 148.981 (BOC-CO), 124.304, 123.721, 122.485, 119.061, 116.453, 114.649 (Indolylaromat), 59.338 (C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.658, 26.488, 22.302 (Methylen-C, Methyl-C)

**IR** (KBr-Pressling, in  $\text{cm}^{-1}$ ): 3317 (N-H(CO)), 2986 (OH), 1736, 1714, 1619 (CO), 1554 (CO-NH), 763 (o-disubstituierter Aromat)

**MW** (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 346.4 g/Mol

**ESI-MS**: 345.3 (M-H<sup>+</sup>)

**DC**: R<sub>f</sub> = 0.58 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:AcOH = 90:8:2)

**Drehwert**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +39.0^\circ$  (c = 0.5 % in DMF)

**Schmelzpunkt**: 174-175 °C

## 12.2.2 Peptide

### 12.2.2.1 GE9622

GE9622 ist ein Undecapeptid, dessen erste zehn Aminosäuren der Consensus-Sequenz der V3-Schleife von HIV-1-Subtyp B entsprechen. Das Peptid ist das V3-Epitop der Antikörper zweier der verwendeten Seren (GE96002 und GE98002). Die Primärstruktur lautet:



Die Synthese wurde auf mit Glycin vorbelegten PAM-Harz (250 mg; 0.58 mMol/g) nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) wie beschrieben durchgeführt, nachdem die BOC-Schutzgruppe abgespalten wurde. Das Syntheseprotokoll sei nachfolgend aufgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
10. Fmoc-Phe-OH	674.3	F	4 h	6 * 20 min
9. Fmoc-Ala-OH	541.7	A	4 h	6 * 20 min
8. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	1153.3	R	4 h	6 * 20 min
7. Fmoc-Gly-OH	517.3	G	4 h	6 * 20 min
6. Fmoc-Pro-OH	587.1	P	4 h	7 * 20 min
5. Fmoc-Gly-OH	517.3	G	4 h	8 * 20 min
4. Fmoc-Ile-OH	614.2	I	4 h	10 * 20 min
3. Fmoc-His(Trt)-OH	1078.3	H	4 h	11 * 20 min
2. Fmoc-Ile-OH	614.2	I	4 h	11 * 20 min
1. Fmoc-Ser(tBu)-OH	667.1	S	4 h	11 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Der N-Terminus ist das freie Amin. Die Seitenketten des Peptids wurden mit Reagenz K über eine Reaktionsdauer von 7 h abgespalten. Das Peptid wurde uncodiert synthetisiert und harzgebunden eingesetzt. Zur finalen Synthesekontrolle wurden einige Milligramm Peptid mittels TFA/TFMSA vom Harz abgespalten. Das Rohpeptid wurde mittels RP-HPLC untersucht. Das Peptid weist eine Retentionszeit von  $t_R = 18.13$  min bei den gewählten Säulenbedingungen auf (0-100 % ACN + 0.1 % TFA in 50 Minuten, Eurospher RP18; Detektion bei 220 nm). Die Charakterisierung des Produkts mittels ESI-MS bestätigte die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse ( $\text{C}_{50}\text{H}_{78}\text{N}_{16}\text{O}_{13}$ ) beträgt 1111.3 D; die gefundene Molmasse 1111.9 D ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

### 12.2.2.2 GE9701

GE9701 ist ein Undecapeptid, dessen erste zehn Aminosäuren einer Sequenz der V3-Schleife von HIV-1-Subtyp B entsprechen. Das Peptid ist das V3-Epitop der Antikörper eines der verwendeten Seren (GE97012). Die Primärstruktur lautet:



Die Synthese wurde auf mit Glycin vorbelegten PAM-Harz (250 mg; 0.58 mMol/g) nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) wie beschrieben durchgeführt, nachdem die BOC-Schutzgruppe abgespalten wurde. Das Syntheseprotokoll ist nachfolgend gegeben:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
10. Fmoc-Phe-OH	674.3	F	4 h	6 * 20 min
9. Fmoc-Ala-OH	541.7	A	4 h	6 * 20 min
8. Fmoc-Lys(BOC)-OH	815.2	K	4 h	6 * 20 min
7. Fmoc-Gly-OH	517.3	G	4 h	6 * 20 min
6. Fmoc-Pro-OH	587.1	P	4 h	7 * 20 min
5. Fmoc-Gly-OH	517.3	G	4 h	8 * 20 min
4. Fmoc-Ile-OH	614.2	I	4 h	10 * 20 min
3. Fmoc-His(Trt)-OH	1078.3	H	4 h	11 * 20 min
2. Fmoc-Ile-OH	614.2	I	4 h	11 * 20 min
1. Fmoc-Ser(tBu)-OH	667.1	S	4 h	11 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Der N-Terminus ist das freie Amin. Die Seitenketten des Peptids wurden mit Reagenz K über eine Reaktionsdauer von 7 h abgespalten. Das Peptid wurde uncodiert synthetisiert und harzgebunden eingesetzt. Zur finalen Synthesekontrolle wurden einige Milligramm Peptid mittels TFA/TFMSA vom Harz abgespalten. Das Rohpeptid wurde mittels RP-HPLC untersucht. Das Peptid weist eine Retentionszeit von  $t_R = 18.22$  min bei den gewählten Säulenbedingungen auf (0-100 % ACN + 0.1 % TFA in 50 Minuten, Eurospher RP18; Detektion bei 230 nm). Die Charakterisierung des Produkts mittels ESI-MS bestätigte die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse ( $\text{C}_{50}\text{H}_{78}\text{N}_{14}\text{O}_{13}$ ) beträgt 1083.2 D; die gefundene Molmasse 1082.9 D ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

**12.2.2.3 RU9801**

RU9801 ist ein Undecapeptid, dessen erste zehn Aminosäuren einer Sequenz der V3-Schleife von HIV-1-Subtyp B entsprechen. Das Peptid ist das V3-Epitop der Antikörper eines der verwendeten Seren (RU98010). Die Primärstruktur lautet:



Die Synthese wurde auf mit Glycin vorbelegten PAM-Harz (250 mg; 0.58 mMol/g) nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) wie beschrieben durchgeführt, nachdem die BOC-Schutzgruppe abgespalten wurde. Das Syntheseprotokoll ist hier aufgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
10. Fmoc-Phe-OH	674.3 F	4 h	6 * 20 min
9. Fmoc-Ala-OH	541.7 A	4 h	6 * 20 min
8. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	1153.3 R	4 h	6 * 20 min
7. Fmoc-Gly-OH	517.3 G	4 h	6 * 20 min
6. Fmoc-Pro-OH	587.1 P	4 h	7 * 20 min
5. Fmoc-Gly-OH	517.3 G	4 h	8 * 20 min
4. Fmoc-Ile-OH	614.2 I	4 h	10 * 20 min
3. Fmoc-His(Trt)-OH	1078.3 H	4 h	11 * 20 min
2. Fmoc-Ile-OH	614.2 I	4 h	11 * 20 min
1. Fmoc-Gly-OH	517.3 G	4 h	11 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Der N-Terminus ist das freie Amin. Die Seitenketten des Peptids wurden mit Reagenz K über eine Reaktionsdauer von 7 h abgespalten. Das Peptid wurde uncodiert synthetisiert und harzgebunden eingesetzt. Zur finalen Synthesekontrolle wurden einige Milligramm Peptid mittels TFA/TFMSA vom Harz abgespalten. Das Rohpeptid wurde mittels RP-HPLC untersucht. Das Peptid weist eine Retentionszeit von  $t_R = 19.03$  min bei den gewählten Säulenbedingungen auf (0-100 % ACN + 0.1 % TFA in 50 Minuten, Eurospher RP18; Detektion bei 222.5 nm). Die Charakterisierung des Produkts mittels ESI-MS bestätigte die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse ( $\text{C}_{50}\text{H}_{78}\text{N}_{14}\text{O}_{13}$ ) beträgt 1081.2 D; die gefundene Molmasse 1080.9 D ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

#### 12.2.2.4 C-Myc-ref

Dieses 12 Aminosäuren lange Peptid ist das Kernepitop des gegen das humane Protoonkogen *c-myc* gerichteten monoklonalen Antikörpers 9E10. Es wird als Referenzpeptid für die festphasengebundene Immunfluoreszenz eingesetzt. Die Primärstruktur lautet:



Die Synthese wurde auf mit Glycin vorbelegten PAM-Harz (300 mg; 0.58 mMol/g) nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) wie beschrieben durchgeführt, nachdem die BOC-Schutzgruppe abgespalten wurde. Das Syntheseprotokoll ist nachfolgend gegeben:

Aminosäure (mg)	Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
11. Fmoc-Leu-OH 737.9 L	4 h	5 * 20 min
10. Fmoc-Leu-OH 737.9 L	4 h	6 * 20 min
9. Fmoc-Asp(OtBu)-OH 859.2 D	4 h	6 * 20 min
8. Fmoc-Glu(OtBu)-OH 888.4 E	4 h	6 * 20 min
7. Fmoc-Glu(OtBu)-OH 888.4 E	4 h	6 * 20 min
6. Fmoc-Ser(tBu)-OH 800.5 S	4 h	6 * 20 min
5. Fmoc-Ile-OH 737.9 I	4 h	7 * 20 min
4. Fmoc-Leu-OH 737.9 L	4 h	7 * 20 min
3. Fmoc-Lys(BOC)-OH 978.2 K	4 h	8 * 20 min
2. Fmoc-Gln(Trt)-OH 1275.1 Q	4 h	8 * 20 min
1. Fmoc-Glu(OtBu)-OH 888.4 E	4 + 2 h	8 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Der N-Terminus ist das freie Amin. Die Seitenketten des Peptids wurden mit Reagenz K über eine Reaktionsdauer von 7 h abgespalten. Das Peptid wurde uncodiert synthetisiert und harzgebunden eingesetzt. Zur finalen Synthesekontrolle wurden einige Milligramm Peptid mittels TFA/TFMSA vom Harz abgespalten. Das Rohpeptid wurde mittels RP-HPLC untersucht. Das Peptid weist eine Retentionszeit von  $t_R = 31.44$  min bei den gewählten Säulenbedingungen auf (0-40 % ACN + 0.1 % TFA in 40 Minuten, 100 % bei 45 Minuten, Eurospher RP18; Detektion bei 220 nm). Die Charakterisierung des Produkts mittels ESI-MS bestätigte die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse ( $\text{C}_{59}\text{H}_{100}\text{N}_{14}\text{O}_{23}$ ) beträgt 1373.5 D; die gefundene Molmasse 1373.0 D ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

### 12.2.2.5 Syntheserie „12capLAGV“

Diese Serie umfasst insgesamt 12 Pentapeptide, die als erster Test der synthetischen Umsetzbarkeit des Cappingkonzepts dienen. Einzelheiten sind in Kap. 5.1 ausgeführt. Gemeinsames Basispeptid aller Spezies war das auf o-Chlorotriylchlorid-Harz synthetisierte Tetrapeptid LAGV (gesamte Harzmenge 750 mg, 0.65 mMol/g). Das Harz wurde gemäß Standardvorschrift mit Fmoc-Valin belegt, die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und die Synthese nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) durchgeführt. Nachfolgend sei das Syntheseprotokoll der Basiskomponente gegeben:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
3. Fmoc-Gly-OH	1739.2 G	4 h	6 * 20 min
2. Fmoc-Ala-OH	1821.1 A	4 h	6 * 20 min
1. Fmoc-Leu-OH	2067.4 L	4 h	6 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurden pro Teilansatz je 50 mg tetrapeptidbelegtes Harz entnommen und mit einer 9:1-Mischung aus der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure und den 12 nachfolgend genannten Aminosäurederivaten gemäß DIC/HOBt-Verfahren wie beschrieben gekuppelt.

Ac-Ala-OH	Ac-Gly-OH	Ac-Phe-OH
BOC-Ala-OH	BOC-Gly-OH	BOC-Phe-OH
Bz-Ala-OH	Bz-Gly-OH	Bz-Phe-OH
For-Ala-OH	For-Gly-OH	For-Phe-OH

Alle 12 Pentapeptidmischungen wurden nach der finalen Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wie beschrieben vom Harz abgespalten, HPLC-chromatographisch untersucht und ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Kap. 5.1 zusammengefasst. Die Identität aller Modellpeptide konnte durch ESI-MS bestätigt werden (umseitig):

Peptid	Summenformel	berechnete Masse [D]	gefundene Masse [D] (M+H <sup>+</sup> )
LAGV	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	358.4	359.2
ALAGV	C <sub>19</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	429.5	430.3
FLAGV	C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	505.6	506.4
GLAGV	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	415.5	416.3
Ac-ALAGV	C <sub>21</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	471.5	472.3
BOC-ALAGV	C <sub>24</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	529.6	530.6
Bz-ALAGV	C <sub>26</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	533.6	534.4
For-ALAGV	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	457.5	458.2
Ac-FLAGV	C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	547.6	548.3
BOC-FLAGV	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	605.7	606.4
Bz-FLAGV	C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	609.7	610.2
For-FLAGV	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	533.6	534.4
Ac-GLAGV	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	457.5	458.4
BOC-GLAGV	C <sub>23</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	515.6	516.4
Bz-GLAGV	C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	519.6	520.3
For-GLAGV	C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	443.5	444.3

### 12.2.2.6 Cap4G8

Dieses Octapeptid ist eine erste Modellverbindung für das Konzept der gezielten Erzeugung von Kettenabbruchsequenzen (siehe Kap. 5.1). Die Primärstruktur des Hauptpeptids lautet:



Die vier N-terminalen Aminosäuren sind mit den nachfolgend genannten Terminationsgruppen gecappt. Das molare Verhältnis der Mischung zwischen der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure und den permanent blockierten Aminosäuren beträgt 9:1 bezüglich der tatsächlichen Harzbelegung, d.h. die bereits blockierten Bindungsstellen des Harzes wurden berücksichtigt und die Mengen der Aminosäuren an das geforderte Verhältnis entsprechend angepasst.

Position	gecappte AS
4	Ac-Ala-OH
3	For-Phe-OH
2	BOC-Ala-OH
1	Bz-Gly-OH

Die Synthese wurde auf 100 mg o-Chlorotriylchlorid-Harz bei einer Harzbelegung von 0.65 mMol/g durchgeführt. Das Harz wurde mit Fmoc-Valin nach Standardvorschrift (Kap. 12.1.1) belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Das Syntheseprotokoll (DIC/HOBt-Verfahren, Kap. 12.1.1) sei nachfolgend angeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
7. Fmoc-Gly-OH	231.9	G	4 h	4 * 20 min
6. Fmoc-Ala-OH	242.8	A	4 h	4 * 20 min
5. Fmoc-Leu-OH	275.7	L	4 h	4 * 20 min
4. Fmoc-Ala-OH	218.5	A	4 h	4 * 20 min
+ Ac-Ala-OH	10.2	Ac-A		
3. Fmoc-Phe-OH	244.8	F	4 h	4 * 20 min
+ For-Phe-OH	13.6	For-F		
2. Fmoc-Ala-OH	177.0	A	4 h	5 * 20 min
+ BOC-Ala-OH	12.0	BOC-A		
1. Fmoc-Gly-OH	152.1	G	4 h	5 * 20 min
+ Bz-Gly-OH	10.2	Bz-G		

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Einige Milligramm des Harzes wurden nach der finalen Fmoc-Entschützung zur Abspaltung des Peptids wie beschrieben mit TFE/DCM behandelt. Das Rohpeptidgemisch wurde HPLC-chromatographisch untersucht (siehe Kap. 5.1) und einzelne Fraktionen mittels ESI-MS analysiert. Die Identität aller Modellpeptide konnte bestätigt werden:

Peptid	Summenformel	berechnete Masse [D]	gefundene Masse [D] (M+H <sup>+</sup> )
GAFALAGV	C <sub>33</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>	704.8	705.6
Bz-GAFALAGV	C <sub>40</sub> H <sub>58</sub> N <sub>8</sub> O <sub>10</sub>	808.9	809.5
BOC-AFALAGV	C <sub>36</sub> H <sub>57</sub> N <sub>7</sub> O <sub>10</sub>	747.8	748.6
For-FALAGV	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	604.6	605.5
Ac-ALAGV	C <sub>21</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	471.4	472.3

### 12.2.2.7 Cap11G11

Dieses Undecapeptid ist eine Modellverbindung für das Konzept der gezielten Erzeugung von Kettenabbruchsequenzen (siehe Kap. 5.1), die an zehn Aminosäurepositionen vom C-Terminus an mit Ac-Ala-OH nicht sequenztreu gecappt wurde, um die MALDI-massenspektroskopische Analysierbarkeit des zu erwartenden Peptidgemisches im picomolaren Bereich zu überprüfen. Die Primärstruktur des Hauptpeptids lautet:



Die ersten zehn N-terminalen Aminosäuren entsprechen der Consensus-Sequenz der V3-Schleife von HIV-1-Subtyp B. Das molare Verhältnis der Mischung zwischen der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure und den permanent blockierten Aminosäuren beträgt 95:5 bezüglich der tatsächlichen Harzbelegung, d.h. die bereits blockierten Bindungsstellen des Harzes wurden berücksichtigt und die Mengen der Aminosäuren an das geforderte Verhältnis entsprechend angepasst. Die Synthese wurde auf mit BOC-Glycin vorbelegtem PAM-Harz (200 mg; 0.58 mMol/g) gemäß dem beschriebenen DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) nach Abspaltung der BOC-Schutzgruppe durchgeführt. Das Syntheseprotokoll ist nachfolgend gegeben:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
10. Fmoc-Phe-OH	512.3 F	4 h	5 * 20 min
+ Ac-Ala-OH	9.1 Ac-A		
9. Fmoc-Ala-OH	391.1 A	4 h	6 * 20 min
+ Ac-Ala-OH	8.7 Ac-A		
8. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	791.7 R	4 h	6 * 20 min
+ Ac-Ala-OH	8.2 Ac-A		
7. Fmoc-Gly-OH	337.1 G	4 h	6 * 20 min
+ Ac-Ala-OH	7.8 Ac-A		
6. Fmoc-Pro-OH	363.4 P	4 h	6 * 20 min
+ Ac-Ala-OH	7.4 Ac-A		
5. Fmoc-Gly-OH	304.2 G	4 h	6 * 20 min
+ Ac-Ala-OH	7.1 Ac-A		
4. Fmoc-Ile-OH	343.5 I	4 h	6 * 20 min
+ Ac-Ala-OH	6.7 Ac-A		
3. Fmoc-His(Trt)-OH	572.3 H	4 h	6 * 20 min
+ Ac-Ala-OH	6.4 Ac-A		
2. Fmoc-Ile-OH	310.0 I	4 h	6 * 20 min
+ Ac-Ala-OH	6.1 Ac-A		
1. Fmoc-Ser(tBu)-OH	319.5 S	4 h	6 * 20 min
+ Ac-Ala-OH	5.8 Ac-A		

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Der N-Terminus des Hauptpeptids ist das freie Amin. Die Schutzgruppen der Seitenketten wurden mit Reagenz K 7 h lang entfernt. Mittels TFMSA/TFA wurden einige Milligramm Peptid vom Harz abgespalten und HPLC-chromatographisch untersucht (0 – 100 % ACN + 0.1 % TFA in 50 Minuten; Eurospher RP18, Detektion bei 220 nm; 30 Minuten gezeigt). Die einzelnen Peptidfraktionen ließen sich nicht vollständig voneinander separieren. Die Peaks, die ESI-massenspektroskopisch nachweisbare Peptide enthielten, sind markiert.

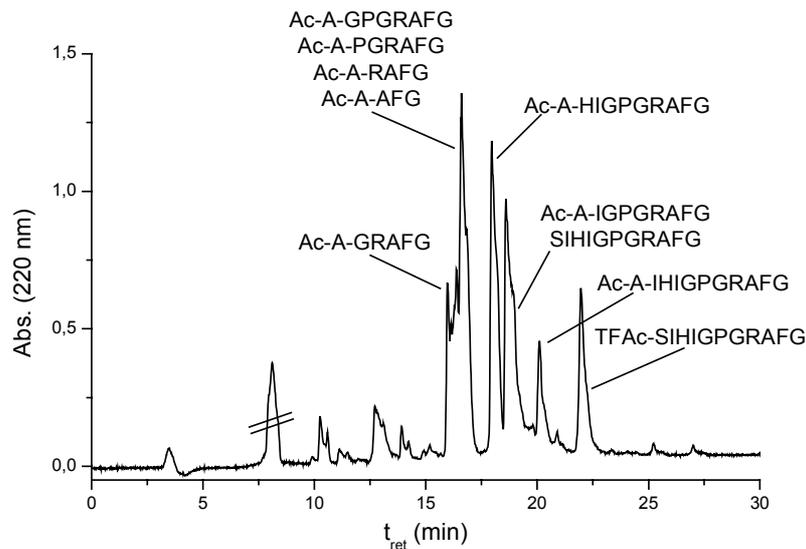


Abb. 12.5: HPLC-Chromatogramm von Cap11G11

Das Ergebnis einer zusätzlich durchgeführten MALDI-massenspektrometrischen Einzelbeadanalyse ist in Kap. 5.1 beschrieben. Nachfolgend sind die Peptide aufgeführt, die massenspektrometrisch charakterisiert werden konnten. Zusätzlich zu dem Hauptpeptid und den gecappten Peptiden trat des weiteren ein mit TFA acetyliertes Undecapeptid als Artefakt der Seitenkettenschutzgruppenabspaltung auf. Die Signale des Einzelbead-MALDI-Massenspektrums wurden im Positivionen-Reflektordetektormodus gemessen. Gegeben sind die monoisotopischen Massen.

Peptid	Summenformel	ber. Masse [D]	gef. Masse ESI-MS [D] (M+H <sup>+</sup> )	gef. Masse MALDI-MS [D] (M+H <sup>+</sup> )
SIHIGPGRAFG	C <sub>50</sub> H <sub>78</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	1111.3	1111.9	1111.7
TFAc-SIHIGPGRAFG	C <sub>52</sub> F <sub>3</sub> H <sub>77</sub> N <sub>16</sub> O <sub>17</sub>	1207.3	1207.8	1207.7
Ac-A-IHIGPGRAFG	C <sub>52</sub> H <sub>80</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	1137.3	1137.9	1137.7
Ac-A-HIGPGRAFG	C <sub>46</sub> H <sub>69</sub> N <sub>15</sub> O <sub>12</sub>	1024.1	1024.8	1024.6
Ac-A-IGPGRAFG	C <sub>40</sub> H <sub>62</sub> N <sub>12</sub> O <sub>11</sub>	887.0	887.7	887.5
Ac-A-GPGRAFG	C <sub>34</sub> H <sub>51</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub>	773.8	774.6	774.4
Ac-A-PGRAFG	C <sub>32</sub> H <sub>48</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	716.8	717.5	717.4
Ac-A-GRAFG	C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> N <sub>9</sub> O <sub>8</sub>	619.7	620.5	620.3
Ac-A-RAFG	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> N <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	562.6	563.4	563.3
Ac-A-AFG	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	406.4	407.4	n. det.
Ac-A-FG	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	335.4	n. det.	n. det.
Ac-A-G	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	188.2	n. det.	n. det.

### 12.2.2.8 Ac-GE9622-TG-A bzw. GE9622-TG-A („B-consensus“)

GE9622-TG-A ist ein 16 Aminosäuren langes Peptid, dessen erste zehn Aminosäuren der Consensus-Sequenz der V3-Schleife von HIV-1-Subtyp B entsprechen. Das Peptid ist das V3-Epitop der Antikörper zweier der verwendeten Seren (GE96002 und GE98002). Die Primärstruktur lautet:



Die Synthese wurde auf mit dem HMB-Anker versehenen TentaGel-Harz (150 mg; 0.26 mMol/g) nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) uncodiert durchgeführt, nachdem es wie beschrieben mit Fmoc-geschütztem Methionin belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wurde. Dem funktionellen Decapeptid nachgelagert ist der Hexapeptid-Linker  $^\beta$ APPPRM. Das Syntheseprotokoll sei nachfolgend aufgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
15. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	310.2 R	4 h	3 * 20 min
14. Fmoc-Pro-OH	157.9 P	4 h	3 * 20 min
13. Fmoc-Pro-OH	157.9 P	4 h	3 * 20 min
12. Fmoc-Pro-OH	157.9 P	4 h	3 * 20 min
11. Fmoc- $^\beta$ Ala-OH	145.7 $^\beta$ A	4 h	3 * 20 min
10. Fmoc-Phe-OH	181.3 F	4 h	3 * 20 min
9. Fmoc-Ala-OH	145.7 A	4 h	3 * 20 min
8. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	310.2 R	4 h	3 * 20 min
7. Fmoc-Gly-OH	139.1 G	4 h	3 * 20 min
6. Fmoc-Pro-OH	157.9 P	4 h	3 * 20 min
5. Fmoc-Gly-OH	139.1 G	4 h	3 * 20 min
4. Fmoc-Ile-OH	165.4 I	4 h	4 * 20 min
3. Fmoc-His(Trt)-OH	290.0 H	4 h	4 * 20 min
2. Fmoc-Ile-OH	165.4 I	4 h	4 * 20 min
1. Fmoc-Ser(tBu)-OH	179.4 S	4 h	4 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde das Harz in gleiche Teile geteilt; eine Hälfte des harzgebundenen Peptids wurde wie beschrieben acetyliert. Hiernach wurden die Seitenkettenschutzgruppen in beiden Ansätzen gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz über 4 h abgespalten. Beide Peptide wurden harzgebunden

eingesetzt. Zur Synthesekontrolle wurden jeweils einige Milligramm Peptid mit 1 N NaOH von den Harzen wie beschrieben abgespalten und ESI-massenspektrometrisch untersucht. Beide Rohfraktionen wiesen neben den gewünschten Verbindungen lediglich einige Addukte selbiger Peptide mit einer durch die Abspaltung verursachten Natriumlast (Hauptpeptid + 1 bzw. + 2 Na<sup>+</sup>) auf.

Für GE9622-TG-A (C<sub>77</sub>H<sub>122</sub>N<sub>24</sub>O<sub>18</sub>S, berechnete Masse 1704.0 g/Mol) wurde eine Masse von 1703.9 g/Mol (M+H<sup>+</sup>) gefunden, für das N-terminal acetylierte Ac-GE9622-TG-A (C<sub>79</sub>H<sub>124</sub>N<sub>24</sub>O<sub>19</sub>S, berechnete Masse 1746.1 g/Mol) eine Masse von 1745.4 g/Mol (M+H<sup>+</sup>).

**12.2.2.9 Ac-GE9622-TG-O bzw. GE9622-TG-O**

Diese Peptide weisen dieselbe Primärstruktur und Funktion wie die in 12.2.2.8 beschriebenen Peptide auf. Die Synthese erfolgt hier jedoch zu Vergleichszwecken für die biologischen Tests auf TentaGel-Basisharz ohne HMB-Anker. Die Kupplung der ersten Aminosäure an den freien N-Terminus des Harzes erfolgt wie die gesamte Synthese gemäß dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1). Es wurden 150 mg Harz eingesetzt. Ein quantitativer Kaiser-Test ergab eine Harzbelegung von 0.25 mMol/g. Nachfolgend ist das Syntheseprotokoll gegeben:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
16. Fmoc-Met-OH	167.1 M	4 h	3 * 20 min
15. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	298.3 R	4 h	3 * 20 min
14. Fmoc-Pro-OH	151.8 P	4 h	3 * 20 min
13. Fmoc-Pro-OH	151.8 P	4 h	3 * 20 min
12. Fmoc-Pro-OH	151.8 P	4 h	3 * 20 min
11. Fmoc- <sup>β</sup> Ala-OH	140.1 <sup>β</sup> A	4 h	3 * 20 min
10. Fmoc-Phe-OH	174.3 F	4 h	3 * 20 min
9. Fmoc-Ala-OH	140.1 A	4 h	3 * 20 min
8. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	298.3 R	4 h	3 * 20 min
7. Fmoc-Gly-OH	133.8 G	4 h	3 * 20 min
6. Fmoc-Pro-OH	151.8 P	4 h	3 * 20 min
5. Fmoc-Gly-OH	133.8 G	4 h	3 * 20 min
4. Fmoc-Ile-OH	159.0 I	4 h	4 * 20 min
3. Fmoc-His(Trt)-OH	278.9 H	4 h	4 * 20 min
2. Fmoc-Ile-OH	159.0 I	4 h	4 * 20 min
1. Fmoc-Ser(tBu)-OH	172.5 S	4 h	4 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde das Harz in gleiche Teile geteilt; eine Hälfte des harzgebundenen Peptids wurde wie beschrieben acetyliert. Hiernach wurden die Seitenkettenschutzgruppen in beiden Ansätzen gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz über 4 h abgespalten. Beide Peptide wurden harzgebunden eingesetzt. Zur Synthesekontrolle wurden jeweils einige Milligramm Peptid mittels CNBr wie beschrieben abgespalten und ESI-massenspektrometrisch untersucht.

Beide Rohfraktionen wiesen neben den gewünschten Verbindungen lediglich einige Addukte selbiger Peptide mit einer durch die Abspaltung verursachten Natrium- bzw. Kaliumlast (Hauptpeptid + 1 Na<sup>+</sup> bzw. + 1 K<sup>+</sup>) auf. Aufgrund der Abspaltbedingungen liegt das C-terminale Methionin beider Peptide in diesen Spektren als Homoserin bzw. Homoserinlacton vor.

Nachfolgend aufgeführt sind somit die für GE9622-TG-O (C<sub>77</sub>H<sub>122</sub>N<sub>24</sub>O<sub>18</sub>S, berechnete Masse 1704.0 g/Mol) im ESI-Massenspektrum gefundenen Derivate.

- 1673.6 g/Mol (M+H<sup>+</sup>) für das C-terminale Homoserin (C<sub>76</sub>H<sub>120</sub>N<sub>24</sub>O<sub>19</sub>, berechnete Masse 1673.9 g/Mol) und
- 1655.5 g/Mol (M+H<sup>+</sup>) für das C-terminale Homoserinlacton (C<sub>76</sub>H<sub>118</sub>N<sub>24</sub>O<sub>18</sub>, berechnete Masse 1655.9 g/Mol).

Für das N-terminal acetylierte Ac-GE9622-TG-O (C<sub>79</sub>H<sub>124</sub>N<sub>24</sub>O<sub>19</sub>S, berechnete Masse 1746.1 g/Mol) wurden die Massen der entsprechenden Derivate ebenfalls mittels ESI-MS bestimmt:

- 1715.6 g/Mol (M+H<sup>+</sup>) für das C-terminale Homoserin (C<sub>78</sub>H<sub>122</sub>N<sub>24</sub>O<sub>20</sub>, berechnete Masse 1715.9 g/Mol) und
- 1697.5 g/Mol (M+H<sup>+</sup>) für das C-terminale Homoserinlacton (C<sub>78</sub>H<sub>120</sub>N<sub>24</sub>O<sub>19</sub>, berechnete Masse 1697.9 g/Mol).

### 12.2.2.10 Ac-C-Myc-TG-A bzw. C-Myc-TG-A

Die 11 N-terminalen Aminosäuren dieses 17 Aminosäuren langen Peptids sind das Kernepitop des gegen das humane Protoonkogen *c-myc* gerichteten monoklonalen Antikörpers 9E10. Es wird als Referenzpeptid für die festphasengebundene Immunfluoreszenz eingesetzt. Die Primärstruktur lautet:



Die Synthese wurde auf mit dem HMB-Anker versehenen TentaGel-Harz (120 mg; 0.26 mMol/g) nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) uncodiert durchgeführt, nachdem es wie beschrieben mit Fmoc-geschütztem Methionin belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wurde. Dem funktionellen Decapeptid nachgelagert ist der Hexapeptid-Linker  $^\beta\text{APPPRM}$ . Das Syntheseprotokoll ist nachfolgend gegeben:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
16. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	248.2 R	4 h	3 * 20 min
15. Fmoc-Pro-OH	126.3 P	4 h	3 * 20 min
14. Fmoc-Pro-OH	126.3 P	4 h	3 * 20 min
13. Fmoc-Pro-OH	126.3 P	4 h	3 * 20 min
12. Fmoc- $^\beta$ Ala-OH	116.6 $^\beta\text{A}$	4 h	3 * 20 min
11. Fmoc-Leu-OH	132.4 L	4 h	3 * 20 min
10. Fmoc-Leu-OH	132.4 L	4 h	3 * 20 min
9. Fmoc-Asp(OtBu)-OH	154.1 D	4 h	3 * 20 min
8. Fmoc-Glu(OtBu)-OH	159.3 E	4 h	3 * 20 min
7. Fmoc-Glu(OtBu)-OH	159.3 E	4 h	3 * 20 min
6. Fmoc-Ser(tBu)-OH	143.6 S	4 h	3 * 20 min
5. Fmoc-Ile-OH	132.4 I	4 h	4 * 20 min
4. Fmoc-Leu-OH	132.4 L	4 h	4 * 20 min
3. Fmoc-Lys(BOC)-OH	175.5 K	4 h	4 * 20 min
2. Fmoc-Gln(Trt)-OH	247.8 Q	4 h	4 * 20 min
1. Fmoc-Glu(OtBu)-OH	159.3 E	4 h	4 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde das Harz in gleiche Teile geteilt; eine Hälfte des harzgebundenen Peptids wurde wie beschrieben acetyliert. Hiernach wurden die Seitenkettenschutzgruppen in beiden Ansätzen gemäß der

Vorschrift für TentaGel-Harz über 4 h abgespalten. Beide Peptide wurden harzgebunden eingesetzt. Zur Synthesekontrolle wurden jeweils einige Milligramm Peptid mit 1 N NaOH von den Harzen wie beschrieben abgespalten und ESI-massenspektrometrisch untersucht. Beide Rohfraktionen wiesen neben den gewünschten Verbindungen lediglich Addukte selbiger Peptide mit einer durch die Abspaltung verursachten Natriumlast (Hauptpeptid + 1 Na<sup>+</sup>) sowie einen durch die Oxidation des C-terminalen Methionin verursachten Zusatzpeak auf.

Für C-Myc-TG-A (C<sub>86</sub>H<sub>144</sub>N<sub>22</sub>O<sub>28</sub>S, berechnete Masse 1966.3 g/Mol) wurde eine Masse von 1967.9 g/Mol (M+H<sup>+</sup>) gefunden, für das N-terminal acetylierte Ac-C-Myc-TG-A (C<sub>88</sub>H<sub>146</sub>N<sub>22</sub>O<sub>29</sub>S, berechnete Masse 2008.3 g/Mol) eine Masse von 2008.9 g/Mol (M+H<sup>+</sup>).

**12.2.2.11 Ac-C-Myc-TG-O bzw. C-Myc-TG-O**

Diese Peptide weisen dieselbe Primärstruktur und Funktion wie die in 12.2.2.10 beschriebenen Peptide auf. Die Synthese erfolgt hier jedoch zu Vergleichszwecken für die biologischen Tests auf TentaGel-Basisharz ohne HMB-Anker. Die Kupplung der ersten Aminosäure an den freien N-Terminus des Harzes erfolgt wie die gesamte Synthese gemäß dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1). Es wurden 120 mg Harz eingesetzt. Ein quantitativer Kaiser-Test ergab eine Harzbelegung von 0.25 mMol/g. Nachfolgend ist das Syntheseprotokoll gegeben:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
17. Fmoc-Met-OH	133.7 M	4 h	3 * 20 min
16. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	238.7 R	4 h	3 * 20 min
15. Fmoc-Pro-OH	121.5 P	4 h	3 * 20 min
14. Fmoc-Pro-OH	121.5 P	4 h	3 * 20 min
13. Fmoc-Pro-OH	121.5 P	4 h	3 * 20 min
12. Fmoc- <sup>β</sup> Ala-OH	112.1 <sup>β</sup> A	4 h	3 * 20 min
11. Fmoc-Leu-OH	127.3 L	4 h	3 * 20 min
10. Fmoc-Leu-OH	127.3 L	4 h	3 * 20 min
9. Fmoc-Asp(OtBu)-OH	148.1 D	4 h	3 * 20 min
8. Fmoc-Glu(OtBu)-OH	153.2 E	4 h	3 * 20 min
7. Fmoc-Glu(OtBu)-OH	153.2 E	4 h	3 * 20 min
6. Fmoc-Ser(tBu)-OH	138.1 S	4 h	3 * 20 min
5. Fmoc-Ile-OH	127.3 I	4 h	4 * 20 min
4. Fmoc-Leu-OH	127.3 L	4 h	4 * 20 min
3. Fmoc-Lys(BOC)-OH	168.7 K	4 h	4 * 20 min
2. Fmoc-Gln(Trt)-OH	238.3 Q	4 h	4 * 20 min
1. Fmoc-Glu(OtBu)-OH	153.2 E	4 h	4 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde das Harz in gleiche Teile geteilt; eine Hälfte des harzgebundenen Peptids wurde wie beschrieben acetyliert. Hiernach wurden die Seitenkettenschutzgruppen in beiden Ansätzen gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz über 4 h abgespalten. Beide Peptide wurden harzgebunden eingesetzt. Zur Synthesekontrolle wurden jeweils einige Milligramm Peptid mittels CNBr wie beschrieben abgespalten und ESI-massenspektrometrisch untersucht. Aufgrund der

Abspaltbedingungen liegt das C-terminale Methionin beider Peptide in diesen Spektren als Homoserin bzw. Homoserinlacton vor.

Nachfolgend aufgeführt sind somit die für C-Myc-TG-O ( $C_{86}H_{144}N_{22}O_{28}S$ , berechnete Masse 1966.3 g/Mol) im ESI-Massenspektrum gefundenen Derivate.

- 1935.8 g/Mol ( $M+H^+$ ) für das C-terminale Homoserin ( $C_{85}H_{142}N_{22}O_{29}$ , berechnete Masse 1936.2 g/Mol) und
- 1917.8 g/Mol ( $M+H^+$ ) für das C-terminale Homoserinlacton ( $C_{85}H_{140}N_{22}O_{28}$ , berechnete Masse 1918.2 g/Mol).

Für das N-terminal acetylierte Ac-C-Myc-TG-O ( $C_{88}H_{146}N_{22}O_{29}S$ , berechnete Masse 2008.3 g/Mol) wurden die Massen der entsprechenden Derivate ebenfalls mittels ESI-MS bestimmt:

- 1978.0 g/Mol ( $M+H^+$ ) für das C-terminale Homoserin ( $C_{87}H_{144}N_{22}O_{30}$ , berechnete Masse 1978.2 g/Mol) und
- 1960.0 g/Mol ( $M+H^+$ ) für das C-terminale Homoserinlacton ( $C_{87}H_{142}N_{22}O_{29}$ , berechnete Masse 1960.2 g/Mol).

**12.2.2.12 B-R01**

Die ersten zehn Aminosäuren dieses 16 Aminosäuren langen Peptids entsprechen dem Epitop der monoklonalen Antikörper 447 und 1108, die für die Erprobung der festphasengebundenen Immunfluoreszenz eingesetzt wurden (Kap. 8.3). Der N-Terminus des Peptids ist acetyliert. Die Funktion der hexapeptidischen Linkerkonstruktion ist in den Kap. 6 bzw. 7 der vorliegenden Arbeit näher beschrieben; somit lautet die Primärstruktur:



Das Syntheseprotokoll ist nachfolgend gegeben:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
15. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	827.2	R	4 h	3 * 20 min
14. Fmoc-Pro-OH	421.0	P	4 h	3 * 20 min
13. Fmoc-Pro-OH	421.0	P	4 h	3 * 20 min
12. Fmoc-Pro-OH	421.0	P	4 h	3 * 20 min
11. Fmoc- $\beta$ Ala-OH	388.6	$\beta$ A	4 h	3 * 20 min
10. Fmoc-Phe-OH	459.4	F	4 h	3 * 20 min
+ Ac-Phe-OH	13.0	Ac-F		
9. Fmoc-Ala-OH	369.1	A	4 h	3 * 20 min
8. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	746.6	R	4 h	3 * 20 min
+ Prop-Arg(Pmc)-OH	29.5	Prop-R		
7. Fmoc-Gly-OH	334.9	G	4 h	3 * 20 min
6. Fmoc-Pro-OH	379.0	P	4 h	3 * 20 min
5. Fmoc-Gly-OH	318.2	G	4 h	3 * 20 min
+ Bz-Gly-OH	10.1	Bz-G		
4. Fmoc-Ile-OH	359.3	I	4 h	3 * 20 min
+ Bz-Ile-OH	12.6	Bz-I		
3. Fmoc-His(Trt)-OH	630.0	H	4 h	3 * 20 min
2. Fmoc-Ile-OH	341.3	I	4 h	3 * 20 min
+ Naph-Ile-OH	14.5	Naph-I		
1. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	640.1	R	4 h	3 * 20 min

Die Synthese wurde auf dem TentaGel-HMB-Harz (400 mg; 0.26 mMol/g) nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) wie beschrieben durchgeführt, nachdem es mit Fmoc- $\beta$ Alanin belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wurde. Das Peptid wurde synthetisch

nach den Vorgaben von *Biblio* codiert. Dieses Peptid ist in der Bibliothek „V3Bcap-Lib“ enthalten und als Einzelverbindung entsprechend synthetisiert worden. Fünf Cappingschritte waren daher notwendig: die Aminosäurepositionen 2, 4, 5, 8 und 10 wurden gecappt. Das molare Verhältnis der Mischung zwischen der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure und den permanent blockierten Aminosäuren beträgt 95:5 bezüglich der tatsächlichen Harzbelegung, d.h. die bereits blockierten Bindungsstellen des Harzes wurden berücksichtigt und die Mengen der Aminosäuren an das geforderte Verhältnis entsprechend angepasst.

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Nach Acetylierung des N-Terminus wurden die Schutzgruppen der Seitenketten gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz 4 h lang abgespalten. Das codierte Peptid wurde festphasengebunden eingesetzt. Einige Milligramm Peptid wurden mit 1 N NaOH vom Harz abgespalten und HPLC-chromatographisch untersucht. Das entsprechende Chromatogramm ist in Kap. 6 bzw. 7 gezeigt. Die fünf erwarteten Terminationssequenzen und das Hauptpeptid konnten MALDI-massenspektrometrisch durch Abspaltung von einem einzigen Bead nachgewiesen werden, wie nachfolgend aufgeführt (Spektrum siehe Kap. 5.2). Es wurde im Positivionen-Reflektordetektormodus gemessen. Gegeben sind die monoisotopischen Massen.

Peptid	Summenformel	ber. Masse [D]	gef. Masse MALDI-MS [D] (M+H <sup>+</sup> )
Ac-RIHIGPGRAF- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>80</sub> H <sub>127</sub> N <sub>27</sub> O <sub>18</sub>	1755.0	1755.7
Naph-IHIGPGRAF- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>83</sub> H <sub>118</sub> N <sub>23</sub> O <sub>17</sub>	1710.0	1710.6
Bz-IGPGRAF- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>67</sub> H <sub>99</sub> N <sub>19</sub> O <sub>15</sub>	1410.6	1411.3
Bz-GPGRAF- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>61</sub> H <sub>88</sub> N <sub>18</sub> O <sub>14</sub>	1297.5	1298.2
Prop-RAF- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>48</sub> H <sub>75</sub> N <sub>15</sub> O <sub>11</sub>	1038.3	1039.0
Ac-F- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>38</sub> H <sub>56</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	796.9	797.7

### 12.2.2.13 B-R03Q08

Die ersten zehn Aminosäuren dieses 16 Aminosäuren langen Peptids entsprechen einer Sequenz der V3-Region des viralen Hüllproteins gp120 des HIV-1-Subtyps B. Diese Sequenz wurde bei der Erprobung der festphasengebundenen Immunfluoreszenz als reaktiv identifiziert (Kap. 8.6). Der N-Terminus des Peptids ist acetyliert. Die Funktion der hexapeptidischen Linkerkonstruktion ist in den Kap. 6 bzw. 7 der vorliegenden Arbeit näher beschrieben; somit lautet die Primärstruktur:



Das Syntheseprotokoll ist nachfolgend gegeben:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
15. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	827.2	R	4 h	3 * 20 min
14. Fmoc-Pro-OH	421.0	P	4 h	3 * 20 min
13. Fmoc-Pro-OH	421.0	P	4 h	3 * 20 min
12. Fmoc-Pro-OH	421.0	P	4 h	3 * 20 min
11. Fmoc- $^\beta$ Ala-OH	388.6	$^\beta$ A	4 h	3 * 20 min
10. Fmoc-Phe-OH	459.4	F	4 h	3 * 20 min
+ Ac-Phe-OH	13.0	Ac-F		
9. Fmoc-Ala-OH	369.1	A	4 h	3 * 20 min
8. Fmoc-Gln(Trt)-OH	687.9	Q	4 h	3 * 20 min
+ Bz-Gln(Trt)-OH	29.2	Bz-Q		
7. Fmoc-Gly-OH	334.9	G	4 h	3 * 20 min
6. Fmoc-Pro-OH	379.0	P	4 h	3 * 20 min
5. Fmoc-Gly-OH	318.2	G	4 h	3 * 20 min
+ Bz-Gly-OH	10.1	Bz-G		
4. Fmoc-Ile-OH	359.3	I	4 h	3 * 20 min
+ Bz-Ile-OH	12.6	Bz-I		
3. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	673.8	R	4 h	3 * 20 min
2. Fmoc-Ile-OH	341.3	I	4 h	3 * 20 min
+ Naph-Ile-OH	14.5	Naph-I		
1. Fmoc-Ser(tBu)-OH	370.3	S	4 h	3 * 20 min

Die Synthese wurde auf dem TentaGel-HMB-Harz (400 mg; 0.26 mMol/g) nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) wie beschrieben durchgeführt, nachdem es mit Fmoc- $^\beta$ Alanin belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wurde. Das Peptid wurde synthetisch

nach den Vorgaben von *Biblio* codiert. Dieses Peptid ist in der Bibliothek „V3Bcap-Lib“ enthalten und als Einzelverbindung entsprechend synthetisiert worden. Fünf Cappingschritte waren daher notwendig: die Aminosäurepositionen 2, 4, 5, 8 und 10 wurden gecappt. Das molare Verhältnis der Mischung zwischen der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure und den permanent blockierten Aminosäuren beträgt 95:5 bezüglich der tatsächlichen Harzbelegung, d.h. die bereits blockierten Bindungsstellen des Harzes wurden berücksichtigt und die Mengen der Aminosäuren an das geforderte Verhältnis entsprechend angepasst.

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Nach Acetylierung des N-Terminus wurden die Schutzgruppen der Seitenketten gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz 4 h lang abgespalten. Das codierte Peptid wurde festphasengebunden eingesetzt. Einige Milligramm Peptid wurden mit 1 N NaOH vom Harz abgespalten und HPLC-chromatographisch untersucht. Das Hauptpeptid wurde als dominierender Peak bei  $t_R = 19.12$  min (0-100 % ACN + 0.1 % TFA in 50 Minuten, Eurospher RP18; Detektion bei 227.5 nm) gefunden. Die Charakterisierung der Produkte mittels MALDI-MS bestätigte die Existenz der gewünschten Verbindungen: Die fünf erwarteten Terminationsequenzen und das Hauptpeptid konnten durch Abspaltung von einem einzigen Bead nachgewiesen werden, wie nachfolgend aufgeführt (Spektrum siehe Kap. 5.2). Es wurde im Positivionen-Reflektordetektormodus gemessen. Gegeben sind die monoisotopischen Massen.

Peptid	Summenformel	ber. Masse [D]	gef. Masse MALDI-MS [D] (M+H <sup>+</sup> )
Ac-SIRIGPGQAF- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>76</sub> H <sub>121</sub> N <sub>23</sub> O <sub>20</sub>	1676.9	1677.7
Naph-IRIGPGQAF- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>82</sub> H <sub>119</sub> N <sub>22</sub> O <sub>18</sub>	1701.0	1701.5
Bz-IGPGQAF- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>66</sub> H <sub>95</sub> N <sub>17</sub> O <sub>16</sub>	1382.6	1383.3
Bz-GPGQAF- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>60</sub> H <sub>84</sub> N <sub>16</sub> O <sub>15</sub>	1269.4	1270.3
Bz-QAF- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>51</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	1058.2	1059.1
Ac-F- <sup>β</sup> APPPR <sup>β</sup> A	C <sub>38</sub> H <sub>56</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	796.9	797.9

### 12.2.2.14 NoV3

Dieses C-terminal ebenfalls mit einem hexapeptidischen Linker versehene Peptid dient in den immunologischen Testreihen als eine der Negativreferenzen und ist insgesamt 16 Aminosäuren lang. Seine zehn funktionalen Aminosäuren sind zufällig gewählt; eine Codierung wurde nicht durchgeführt. Es erwies sich mit keinem der eingesetzten Seren als reaktiv. Der N-Terminus ist acetyliert; die Primärstruktur lautet somit formal:



Die Synthese wurde auf TentaGel-HMB-Harz (400 mg, 0.26 mMol/g) nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) durchgeführt, nachdem es wie beschrieben mit Fmoc- $\beta$ Ala-OH belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wurden. Nachfolgend ist das Syntheseprotokoll gegeben:

Aminosäure (mg)	Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
15. Fmoc-Arg(Pmc)-OH 827.2 R	4 h	3 * 20 min
14. Fmoc-Pro-OH 421.0 P	4 h	3 * 20 min
13. Fmoc-Pro-OH 421.0 P	4 h	3 * 20 min
12. Fmoc-Pro-OH 421.0 P	4 h	3 * 20 min
11. Fmoc- $\beta$ Ala-OH 388.6 $\beta$ A	4 h	3 * 20 min
10. Fmoc-Gln(Trt)-OH 762.2 Q	4 h	3 * 20 min
9. Fmoc-His(Trt)-OH 773.4 H	4 h	3 * 20 min
8. Fmoc-Tyr(tBu)-OH 573.5 Y	4 h	3 * 20 min
7. Fmoc-Ser(tBu)-OH 478.5 S	4 h	3 * 20 min
6. Fmoc-Asn(Trt)-OH 744.7 N	4 h	3 * 20 min
5. Fmoc-Ala-OH 388.6 A	4 h	3 * 20 min
4. Fmoc-Thr(tBu)-OH 496.0 T	4 h	3 * 20 min
3. Fmoc-Phe-OH 483.5 F	4 h	3 * 20 min
2. Fmoc-Ala-OH 388.6 A	4 h	3 * 20 min
1. Fmoc-Trp(BOC)-OH 657.2 W	4 h	3 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Nach der Acetylierung des N-Terminus wurden die Seitenketten des Peptids gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz über eine Reaktionsdauer von 4 h abgespalten. Das Peptid wurde harzgebunden eingesetzt. Zur finalen Synthesekontrolle wurden einige Milligramm Peptid mittels 1 N NaOH vom Harz

abgespalten. Das Rohpeptid wurde mittels RP-HPLC untersucht. Das Peptid weist eine Retentionszeit von  $t_R = 20.56$  min bei den gewählten Säulenbedingungen auf (0-100 % ACN + 0.1 % TFA in 50 Minuten, Eurospher RP18; Detektion bei 230 nm). Die Charakterisierung des Produkts mittels ESI-MS bestätigte die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse ( $C_{86}H_{118}N_{24}O_{23}$ ) beträgt 1856.0 D; die gefundene Molmasse 1855.6 D ( $M+H^+$ ).

**12.2.2.15 1324E**

Die zehn funktionalen Aminosäuren dieses 16 Aminosäuren langen Peptids entsprechen dem Epitop des monoklonalen Antikörpers 1324E. Peptid und Antikörper wurden als Referenz für die Entwicklung des festphasengebundenen Immunfluoreszenzscreenings eingesetzt. (Kap. 8.3). Das Peptid wurde uncodiert synthetisiert. Der N-Terminus ist acetyliert; erneut wurde der hexapeptidische  $\beta$ APPPR $\beta$ A-Linker gewählt. Die Primärstruktur lautet:



Die Synthese wurde auf TentaGel-HMB-Harz (400 mg, 0.26 mMol/g) nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) durchgeführt, nachdem es wie beschrieben mit Fmoc- $\beta$ Ala-OH belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wurden. Nachfolgend gegeben ist das Syntheseprotokoll:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
15. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	827.2 R	4 h	3 * 20 min
14. Fmoc-Pro-OH	421.0 P	4 h	3 * 20 min
13. Fmoc-Pro-OH	421.0 P	4 h	3 * 20 min
12. Fmoc-Pro-OH	421.0 P	4 h	3 * 20 min
11. Fmoc- $\beta$ Ala-OH	388.6 $\beta$ A	4 h	3 * 20 min
10. Fmoc-Gly-OH	371.1 G	4 h	3 * 20 min
9. Fmoc-Ile-OH	441.1 I	4 h	3 * 20 min
8. Fmoc-Val-OH	423.6 V	4 h	3 * 20 min
7. Fmoc-Ser(tBu)-OH	478.5 S	4 h	3 * 20 min
6. Fmoc-Thr(tBu)-OH	496.0 T	4 h	3 * 20 min
5. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	827.2 R	4 h	3 * 20 min
4. Fmoc-Thr(tBu)-OH	496.0 T	4 h	3 * 20 min
3. Fmoc-Asn(Trt)-OH	744.7 N	4 h	3 * 20 min
2. Fmoc-Asn(Trt)-OH	744.7 N	4 h	3 * 20 min
1. Fmoc-Ser(tBu)-OH	478.5 S	4 h	3 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Nach der Acetylierung des N-Terminus wurden die Seitenketten des Peptids gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz über eine Reaktionsdauer von 4 h abgespalten. Das Peptid wurde harzgebunden eingesetzt. Zur finalen

Synthesekontrolle wurden einige Milligramm Peptid mittels 1 N NaOH vom Harz abgespalten. Das Rohpeptid wurde mittels RP-HPLC untersucht. Das Peptid weist eine Retentionszeit von  $t_R = 15.68$  min bei den gewählten Säulenbedingungen auf (0-100 % ACN + 0.1 % TFA in 50 Minuten, Eurospher RP18; Detektion bei 227.5 nm). Die Charakterisierung des Produkts mittels ESI-MS bestätigte die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse ( $C_{70}H_{118}N_{24}O_{24}$ ) beträgt 1679.9 D; die gefundene Molmasse 1679.4 D ( $M+H^+$ ).

**12.2.2.16 91-5/p24**

Die zehn funktionalen Aminosäuren dieses 18 Aminosäuren langen Peptids entsprechen dem Epitop des monoklonalen Antikörpers 91-5/p24. Peptid und Antikörper wurden als Referenz für die Entwicklung des festphasengebundenen Immunfluoreszenzscreenings eingesetzt. (Kap. 8.3). Das Peptid wurde uncodiert synthetisiert. Der N-Terminus ist acetyliert; erneut wurde der hexapeptidische  $\beta$ APPPR $\beta$ A-Linker gewählt. Die Primärstruktur lautet:



Die Synthese wurde auf TentaGel-HMB-Harz (400 mg, 0.26 mMol/g) nach dem DIC/HOBt-Verfahren (Kap. 12.1.1) durchgeführt, nachdem es wie beschrieben mit Fmoc- $\beta$ Ala-OH belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wurden. Nachfolgend gegeben ist das Syntheseprotokoll:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
17. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	827.2 R	4 h	3 * 20 min
16. Fmoc-Pro-OH	421.0 P	4 h	3 * 20 min
15. Fmoc-Pro-OH	421.0 P	4 h	3 * 20 min
14. Fmoc-Pro-OH	421.0 P	4 h	3 * 20 min
13. Fmoc- $\beta$ Ala-OH	388.6 $\beta$ A	4 h	3 * 20 min
12. Fmoc-Glu(OtBu)-OH	530.9 E	4 h	3 * 20 min
11. Fmoc-Asn(Trt)-OH	744.7 N	4 h	3 * 20 min
10. Fmoc-Ile-OH	441.1 I	4 h	3 * 20 min
9. Fmoc-Thr(tBu)-OH	496.0 T	4 h	3 * 20 min
8. Fmoc-Glu(OtBu)-OH	530.9 E	4 h	3 * 20 min
7. Fmoc-Lys(BOC)-OH	584.9 K	4 h	3 * 20 min
6. Fmoc-Leu-OH	441.9 L	4 h	3 * 20 min
5. Fmoc-Met-OH	463.6 M	4 h	3 * 20 min
4. Fmoc-Gln(Trt)-OH	762.2 Q	4 h	3 * 20 min
3. Fmoc-Met-OH	463.6 M	4 h	3 * 20 min
2. Fmoc-Ala-OH	388.6 A	4 h	3 * 20 min
1. Fmoc-Ala-OH	388.6 A	4 h	3 * 20 min

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde durch Bromphenolblau-Zugabe, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Nach der Acetylierung des N-Terminus wurden

die Seitenketten des Peptids gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz über eine Reaktionsdauer von 4 h abgespalten. Das Peptid wurde harzgebunden eingesetzt. Zur finalen Synthesekontrolle wurden einige Milligramm Peptid mittels 1 N NaOH vom Harz abgespalten. Das Rohpeptid wurde mittels RP-HPLC untersucht. Das Peptid weist eine Retentionszeit von  $t_R = 21.78$  min bei den gewählten Säulenbedingungen auf (0-100 % ACN + 0.1 % TFA in 50 Minuten, Eurospher RP18; Detektion bei 225 nm). Die Charakterisierung des Produkts mittels ESI-MS bestätigte die Existenz der gewünschten Verbindung. Die errechnete Molmasse ( $C_{86}H_{144}N_{24}O_{27}S_2$ ) beträgt 2010.4 D; die gefundene Molmasse 2009.9 D ( $M+H^+$ ). Oxidation der Methionine wurde massenspektrometrisch nicht detektiert.

## 12.2.3 Peptidbibliotheken

### 12.2.3.1 V3B-PAM-Lib

V3B-PAM-Lib ist eine Decapeptidbibliothek, die aus 625000 Peptiden besteht. Sie enthält die jeweils maximal fünf häufigsten Aminosäuren der Spitze der V3-Schleife des viralen Hüllproteins gp120 des HIV-1-Subtyps B, die in der LANL-Datenbank aufgeführt sind<sup>[50]</sup>. Wie alle kombinatorischen Bibliotheken wurde auch diese nach der „One Bead One Peptide“-Methode von Furka (siehe Kap. 8.3) erstellt. Die Bibliothek wurde uncodiert auf mit Glycin vorbelegtem PAM-Harz (500 mg, 0.58 mMol/g) ohne Linker synthetisiert, nachdem die BOC-Schutzgruppe des Glycin wie beschrieben abgespalten wurde. Ein Harzüberschuss (siehe Kap. 6 bzw. 7) wurde nicht gewählt. Wie bei der Synthese einzelner Peptide wurde das DIC/HOBt-Verfahren eingesetzt, auch hier mit je 12 eq Fmoc-Aminosäure, 13.2 eq DIC und 18 eq HOBt pro Position. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit einer Lösung von 40 % Piperidin in DMF abgespalten. Die Teilung des Harzes erfolgte jeweils in abgeschwollenem und getrockneten Zustand. Das Schema der Bibliothek V3B-PAM-Lib ist in Abb. 12.6 gegeben:

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C
	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	
	G	V	P	V	A	L		K	V	L	
H <sub>2</sub> N-	R	G	N	T		Q		Q	T	V	-R
	D	K	T	F		F		S	S	Y	
	H		S	K		A		G	G	S	

Abb. 12.6: Peptidbibliothek V3B-PAM-Lib

Der N-Terminus der Peptide ist das freie Amin; der C-Terminus, hier durch R angedeutet, ist die mit Glycin als Abstandsgruppe belegte feste Phase, das PAM-PS-Harz.

Die Menge der verwendeten Reagenzien und der Lösemittelmenge (DMF) reduziert sich entsprechend der nach dem Teilen des Harzes erhaltenen Harzmenge. Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde immer mit Bromphenolblau, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Nach der Abspaltung der BOC-Schutzgruppe wurde das Harz in 5 gleich große Portionen geteilt (je 100 mg) und wie folgt weiter umgesetzt.

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
10. Fmoc-Phe-OH	269.6	F	4 h
10. Fmoc-Leu-OH	246.0	L	4 h
10. Fmoc-Val-OH	236.2	V	4 h
10. Fmoc-Tyr(tBu)-OH	319.9	Y	4 h
10. Fmoc-Ser(tBu)-OH	266.8	S	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 5 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen, gewogen und in fünf gleiche Portionen zu je 100 mg geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
9. Fmoc-Ala-OH	216.7	A	4 h
9. Fmoc-Val-OH	236.2	V	4 h
9. Fmoc-Thr(tBu)-OH	276.7	T	4 h
9. Fmoc-Ser(tBu)-OH	266.8	S	4 h
9. Fmoc-Gly-OH	206.9	G	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 5 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen, gewogen und in fünf gleiche Portionen zu je 100 mg geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
8. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	461.3	R	4 h
8. Fmoc-Lys(BOC)-OH	326.1	K	4 h
8. Fmoc-Gln(Trt)-OH	425.0	Q	4 h
8. Fmoc-Ser(tBu)-OH	266.8	S	4 h
8. Fmoc-Gly-OH	206.9	G	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 5 * 20 min			

Das Harz wurde gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und gewogen. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit
7. Fmoc-Gly-OH	1034.6 G	4 h
Fmoc-Abspaltung: 5 * 20 min		

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen, gewogen (515 mg) und in fünf gleiche Portionen zu je 103 mg geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit
6. Fmoc-Pro-OH	234.8 P	5 h
6. Fmoc-Leu-OH	246.0 L	5 h
6. Fmoc-Gln(Trt)-OH	425.0 Q	5 h
6. Fmoc-Phe-OH	269.6 F	5 h
6. Fmoc-Ala-OH	216.7 A	5 h
Vereinigung des Harzes		
Fmoc-Abspaltung: 5 * 20 min		

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen, gewogen (515 mg) und in zwei gleiche Portionen zu je ca. 257 mg geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit
5. Fmoc-Gly-OH	517.3 G	5 h
5. Fmoc-Ala-OH	541.7 A	5 h
Vereinigung des Harzes		
Fmoc-Abspaltung: 5 * 20 min		

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen, gewogen (515 mg) und in fünf gleiche Portionen zu je 103 mg geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit
4. Fmoc-Ile-OH	246.0 I	6 h
4. Fmoc-Val-OH	236.2 V	6 h
4. Fmoc-Thr(tBu)-OH	276.7 T	6 h
4. Fmoc-Phe-OH	269.6 F	6 h
4. Fmoc-Lys(BOC)-OH	326.1 K	6 h
Vereinigung des Harzes		
Fmoc-Abspaltung: 6 * 20 min		

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen, gewogen (520 mg) und in fünf gleiche Portionen zu je 104 mg geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit
3. Fmoc-His(Trt)-OH	431.3 H	6 h
3. Fmoc-Pro-OH	234.8 P	6 h
3. Fmoc-Asn(Trt)-OH	415.3 N	6 h
3. Fmoc-Thr(tBu)-OH	276.7 T	6 h
3. Fmoc-Ser(tBu)-OH	266.8 S	6 h
Vereinigung des Harzes		
Fmoc-Abspaltung: 6 * 20 min		

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen, gewogen (520 mg) und in vier gleiche Portionen zu je 130 mg geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit
2. Fmoc-Ile-OH	307.5 I	6 h
2. Fmoc-Val-OH	295.3 V	6 h
2. Fmoc-Gly-OH	258.7 G	6 h
2. Fmoc-Lys(BOC)-OH	407.6 K	6 h
Vereinigung des Harzes		
Fmoc-Abspaltung: 6 * 20 min		

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen, gewogen (520 mg) und in vier gleiche Portionen zu je 104 mg geteilt. Dann wurde der letzte Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit
1. Fmoc-Ser(tBu)-OH	266.8 S	6 h
1. Fmoc-Gly-OH	206.9 G	6 h
1. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	461.3 R	6 h
1. Fmoc-Asp(OtBu)-OH	286.4 D	6 h
1. Fmoc-His(Trt)-OH	431.3 H	6 h
Vereinigung des Harzes		
Fmoc-Abspaltung: 6 * 20 min		

Zuletzt wurden die Seitenkettenschutzgruppen mit 7 h lang 10 mL Reagenz K abgespalten und das Harz gründlich mit DIEA, DMF und Ether gewaschen. Die Bibliothek war damit für Bindungsassays verwendbar und wurde harzgebunden eingesetzt.

### 12.2.3.2 Modellcap-Lib

Modellcap-Lib ist eine Pentapeptidbibliothek, die aus 144 Peptiden besteht. Sie enthält willkürlich gewählte Aminosäuren und diente als erste Modellbibliothek zur gezielten Erzeugung von Kettenabbruchsequenzen und deren Anwendung auf die kombinatorische Synthese (siehe Kap. 6 bzw. 7). Wie alle kombinatorischen Bibliotheken wurde auch diese nach der „One Bead One Peptide“-Methode von Furka (siehe Kap. 8.3) erstellt. Die Bibliothek wurde mittels *Biblio* codiert. Das Codierungsschema sah zwei Aminosäurepositionen (2 und 5) vor, an denen gecappt werden musste (siehe Abb. 12.7). Die Bibliothek wurde auf TentaGel-HMB-Harz (300 mg, 0.26 mMol/g) synthetisiert, nachdem zunächst ein hexapeptidischer Linker,  $\beta$ APPPRM, C-terminal eingeführt wurde.

Ein Harzüberschuss von einem Drittel (siehe Kap. 6 bzw. 7) der als Berechnungsgrundlage dienenden Harzmenge von 300 mg wurde gewählt, um eventuelle Verluste des in abgeschwollenem Zustand zur Verklumpung und Adhäsion an die Innenwandung der verwendeten Glasgefäße neigenden Harzes während der verschiedenen Teilungs- und Umfüllungsschritte auszugleichen. Die praktische Harzeinwaage betrug somit 400 mg; Synthese und Teilungsschritte jedoch bezogen sich stets auf 300 mg. Der Massenzuwachs der Beads während der Synthese wurde somit auch der Reserveposition zugeschlagen (siehe Kap. 6 bzw. 7). Wie bei der Synthese einzelner Peptide wurde das DIC/HOBt-Verfahren eingesetzt, auch hier mit je 12 eq Fmoc-Aminosäure, 13.2 eq DIC und 18 eq HOBt pro Position. Wenn erforderlich, wurden die Fmoc-geschützte Aminosäure und die N-terminal blockierte Aminosäure im Verhältnis 95:5 bezüglich der tatsächlichen Harzbelegung eingesetzt (11.4 : 0.6 eq), d.h. die bereits blockierten Bindungsstellen des Harzes wurden berücksichtigt und die Mengen der Aminosäuren an das geforderte Verhältnis entsprechend angepasst.

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit einer Lösung von 40 % Piperidin in DMF abgespalten. Die Teilung des Harzes erfolgte jeweils in abgeschwollenem und getrockneten Zustand. Das Schema der Bibliothek Modellcap-Lib ist in Abb. 12.7 (umseitig) gegeben:

N	1	2 <sup>cap</sup>	3	4	5 <sup>cap</sup>	C
H <sub>2</sub> N-	A	F <sup>2</sup>	A	F	I <sup>2</sup>	-R
	G	G <sup>2</sup>	G	Q	L <sup>1</sup>	
		I <sup>4</sup>	L	T		
			Y			

Abb. 12.7: Peptidbibliothek Modellcap-Lib

Der N-Terminus der Peptide ist das freie Amin; der C-Terminus, hier durch R angedeutet, ist die mit dem Hexapeptidlinker <sup>β</sup>APPPRM belegte feste Phase, das TentaGel-Harz. Hochgestellte Indices markieren die einzelnen von *Biblio* verwendeten Cappinggruppen: 1 = Ac-, 2 = Bz-, 3 = Naph-, 4 = Prop-. Die Menge der verwendeten Reagenzien und der Lösemittelmenge (DMF) reduziert sich entsprechend der nach dem Teilen des Harzes erhaltenen Harzmenge. Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde immer mit Bromphenolblau, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Das Harz wurde wie beschrieben mit Fmoc-Met-OH belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Nachfolgend gegeben ist das Syntheseprotokoll des Linkers:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
10. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	620.4 R	4 h	3 * 20 min
9. Fmoc-Pro-OH	315.8 P	4 h	3 * 20 min
8. Fmoc-Pro-OH	315.8 P	4 h	3 * 20 min
7. Fmoc-Pro-OH	315.8 P	4 h	3 * 20 min
6. Fmoc- <sup>β</sup> Ala-OH	291.4 <sup>β</sup> A	4 h	3 * 20 min

Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde das Harz abgeschwollen, in 2 Fraktionen (1 \* 150 mg + Reserveposition) geteilt und wie folgt weiter umgesetzt. Die jeweils oberste Position der folgenden Syntheseschrittprotokolle gibt die Reserveposition wieder.

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit
5. Fmoc-Ile-OH	157.2 I	4 h
+ Bz-Ile-OH	5.6 Bz-I	
5. Fmoc-Leu-OH	157.2 L	4 h
+ Ac-Leu-OH	4.1 Ac-L	
Vereinigung des Harzes		
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min		

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in drei Portionen (2 \* 100 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
4. Fmoc-Phe-OH	114.9	F	4 h
4. Fmoc-Thr(tBu)-OH	117.8	T	4 h
4. Fmoc-Gln(Trt)-OH	181.1	Q	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in vier Portionen (3 \* 75 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
3. Fmoc-Ala-OH	69.3	A	4 h
3. Fmoc-Leu-OH	78.6	L	4 h
3. Fmoc-Gly-OH	66.1	G	4 h
3. Fmoc-Tyr(tBu)-OH	102.2	Y	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in drei Portionen (2 \* 100 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
2. Fmoc-Phe-OH	109.1	F	4 h
+ Bz-Phe-OH	4.0	Bz-F	
2. Fmoc-Gly-OH	83.8	G	4 h
+ Bz-Gly-OH	2.7	Bz-G	
2. Fmoc-Ile-OH	99.6	I	4 h
+ Prop-Ile-OH	2.8	Prop-I	
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in zwei Portionen (1 \* 150 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der letzte Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
l. Fmoc-Gly-OH	125.3	G	4 h
l. Fmoc-Ala-OH	131.2	A	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Zuletzt wurden die Seitenkettenschutzgruppen 4 h lang gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz abgespalten. Das Harz wurde gründlich mit DIEA, DMF und Ether gewaschen. Die weitere Verwendung der Bibliothek ist in den Kap. 6 bzw. 7 der vorliegenden Arbeit dargelegt.

### 12.2.3.3 Modellcap2-Lib

Modellcap2-Lib ist eine Heptapeptidbibliothek, die aus 5184 Peptiden besteht. Sie enthält willkürlich gewählte Aminosäuren und diente als weitere Modellbibliothek zur gezielten Erzeugung von Kettenabbruchsequenzen und deren Anwendung auf die kombinatorische Synthese (siehe Kap. 6 bzw. 7). Wie alle kombinatorischen Bibliotheken wurde auch diese nach der „One Bead One Peptide“-Methode von Furka (siehe Kap. 8.3) erstellt. Die Bibliothek wurde mittels *Biblio* codiert. Das Codierungsschema sah drei Aminosäurepositionen (2, 4 und 7) vor, an denen gecappt werden musste (siehe Abb. 12.8). Die Bibliothek wurde auf TentaGel-HMB-Harz (400 mg, 0.26 mMol/g) synthetisiert, nachdem zunächst ein hexapeptidischer Linker,  $\beta$ APPPR $\beta$ A, C-terminal eingeführt wurde.

Ein Harzüberschuss von einem Drittel (siehe Kap. 6 bzw. 7) der als Berechnungsgrundlage dienenden Harzmenge von 400 mg wurde auch hier gewählt, um eventuelle Verluste des in abgeschwollenem Zustand zur Verklumpung und Adhäsion an die Innenwandung der verwendeten Glasgefäße neigenden Harzes während der verschiedenen Teilungs- und Umfüllungsschritte auszugleichen. Die praktische Harzeinwaage betrug somit 533.3 mg; Synthese und Teilungsschritte jedoch bezogen sich stets auf 400 mg. Der Massenzuwachs der Beads während der Synthese wurde somit auch der Reserveposition zugeschlagen (siehe Kap. 6 bzw. 7). Wie bei der Synthese einzelner Peptide wurde das DIC/HOBt-Verfahren eingesetzt, auch hier mit je 12 eq Fmoc-Aminosäure, 13.2 eq DIC und 18 eq HOBt pro Position. Wenn erforderlich, wurden die Fmoc-geschützte Aminosäure und die N-terminal blockierte Aminosäure im Verhältnis 95:5 bezüglich der tatsächlichen Harzbelegung eingesetzt (11.4 : 0.6 eq), d.h. die bereits blockierten Bindungsstellen des Harzes wurden berücksichtigt und die Mengen der Aminosäuren an das geforderte Verhältnis entsprechend angepasst.

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit einer Lösung von 40 % Piperidin in DMF abgespalten. Die Teilung des Harzes erfolgte jeweils in abgeschwollenem und getrockneten Zustand. Das Schema der Bibliothek Modellcap2-Lib ist in Abb. 12.8 (umseitig) gegeben:

N	1	2 <sup>cap</sup>	3	4 <sup>cap</sup>	5	6	7 <sup>cap</sup>	C
Ac-	A	I <sup>1</sup>	A	F <sup>2</sup>	A	F	I <sup>2</sup>	-R
	G	L <sup>2</sup>	H	G <sup>2</sup>	G	Q	L <sup>1</sup>	
	F	P <sup>1</sup>	L	I <sup>4</sup>	L	T	P <sup>1</sup>	
	K	V <sup>1</sup>			Y			

Abb. 12.8: Peptidbibliothek Modellcap2-Lib

Der N-Terminus der Peptide ist acetyliert; der C-Terminus, hier durch R angedeutet, ist die mit dem Hexapeptidlinker  $\beta$ APPPR $\beta$ A belegte feste Phase, das TentaGel-Harz. Hochgestellte Indices markieren die einzelnen von *Biblio* verwendeten Cappinggruppen: 1 = Ac-, 2 = Bz-, 3 = Naph-, 4 = Prop-. Die Menge der verwendeten Reagenzien und der Lösemittelmenge (DMF) reduziert sich entsprechend der nach dem Teilen des Harzes erhaltenen Harzmenge. Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde immer mit Bromphenolblau, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Das Harz wurde wie beschrieben mit Fmoc- $\beta$ Ala-OH belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Nachfolgend gegeben ist das Syntheseprotokoll des Linkers:

Aminosäure (mg)	Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
12. Fmoc-Arg(Pmc)-OH      827.2 R	4 h	3 * 20 min
11. Fmoc-Pro-OH            421.0 P	4 h	3 * 20 min
10. Fmoc-Pro-OH            421.0 P	4 h	3 * 20 min
9. Fmoc-Pro-OH            421.0 P	4 h	3 * 20 min
8. Fmoc- $\beta$ Ala-OH            388.6 $\beta$ A	4 h	3 * 20 min

Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde das Harz abgeschwollen, in drei Fraktionen (2 \* 133 mg + Reserveposition) geteilt und wie folgt weiter umgesetzt. Die jeweils oberste Position der folgenden Syntheseschrittprotokolle gibt die Reserveposition wieder.

Aminosäure (mg)	Reaktionszeit
7. Fmoc-Pro-OH            133.4 P	4 h
+ Ac-Pro-OH            3.3 Ac-P	
7. Fmoc-Ile-OH            139.7 I	4 h
+ Bz-Ile-OH            4.9 Bz-I	
7. Fmoc-Leu-OH            139.7 L	4 h
+ Ac-Leu-OH            3.7 Ac-L	
Vereinigung des Harzes	
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min	

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in drei Portionen (2 \* 133 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit
6. Fmoc-Gln(Trt)-OH	241.4 Q	4 h
6. Fmoc-Phe-OH	153.2 F	4 h
6. Fmoc-Thr(tBu)-OH	157.1 T	4 h
Vereinigung des Harzes		
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min		

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in vier Portionen (3 \* 100 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit
5. Fmoc-Tyr(tBu)-OH	136.2 Y	4 h
5. Fmoc-Ala-OH	92.3 A	4 h
5. Fmoc-Gly-OH	88.2 G	4 h
5. Fmoc-Leu-OH	104.8 L	4 h
Vereinigung des Harzes		
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min		

Das Harz wurde gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in drei Portionen (2 \* 133 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)		Reaktionszeit
4. Fmoc-Ile-OH	132.7 I	4 h
+ Prop-Ile-OH	3.7 Prop-I	
4. Fmoc-Phe-OH	145.5 F	4 h
+ Bz-Phe-OH	5.4 Bz-F	
4. Fmoc-Gly-OH	111.7 G	4 h
+ Bz-Gly-OH	3.6 Bz-G	
Vereinigung des Harzes		
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min		

Das Harz wurde gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in drei Portionen (2 \* 133 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
3. Fmoc-His(Trt)-OH	232.7	H	4 h
3. Fmoc-Ala-OH	116.9	A	4 h
3. Fmoc-Leu-OH	132.7	L	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in vier Portionen (3 \* 100 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
2. Fmoc-Val-OH	90.8	V	4 h
+ Ac-Val-OH	2.3	Ac-V	
2. Fmoc-Ile-OH	94.6	I	4 h
+ Ac-Ile-OH	2.5	Ac-I	
2. Fmoc-Leu-OH	94.6	L	4 h
+ Bz-Leu-OH	3.4	Bz-L	
2. Fmoc-Pro-OH	90.3	P	4 h
+ Ac-Pro-OH	2.3	Ac-P	
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in vier Portionen (3 \* 100 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
1. Fmoc-Lys(BOC)-OH	125.4	K	4 h
1. Fmoc-Ala-OH	83.3	A	4 h
1. Fmoc-Phe-OH	103.7	F	4 h
1. Fmoc-Gly-OH	79.6	G	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Schließlich wurde der N-Terminus acetyliert. Zuletzt wurden die Seitenkettenschutzgruppen gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz über 4 h abgespalten. Das Harz wurde gründlich mit DIEA, DMF und Ether gewaschen. Die weitere Verwendung der Bibliothek ist in den Kap. 6 bzw. 7 der vorliegenden Arbeit dargelegt.

#### 12.2.3.4 V3Bcap-Lib

V3Bcap-Lib ist eine Decapeptidbibliothek, die aus 432000 Peptiden besteht. Sie enthält diejenigen Aminosäuren der Spitze der V3-Region von gp120 des HIV-1-Subtyps B, die an der jeweiligen Position zu mindestens 1 % in der LANL-Datenbank<sup>[50]</sup> repräsentiert sind und diente als Modellbibliothek mit biologischem Hintergrund zur gezielten Erzeugung von Kettenabbruchsequenzen und deren Anwendung auf die kombinatorische Synthese (siehe Kap. 6 bzw. 7). Wie alle kombinatorischen Bibliotheken wurde auch diese nach der „One Bead One Peptide“-Methode von Furka (siehe Kap. 8.3) erstellt. Die Bibliothek wurde mittels *Biblio* codiert. Das Codierungsschema sah fünf Aminosäurepositionen (2, 4, 5, 8 und 10) vor, an denen gecappt werden musste (siehe Abb. 12.9). Die Bibliothek wurde auf TentaGel-HMB-Harz (650 mg, 0.26 mMol/g) synthetisiert, nachdem zunächst ein hexapeptidischer Linker,  $\beta$ APPPR $\beta$ A, C-terminal eingeführt wurde.

Ein Harzüberschuss von einem Drittel (siehe Kap. 6 bzw. 7) der als Berechnungsgrundlage dienenden Harzmenge von 650 mg wurde auch hier gewählt, um eventuelle Verluste des in abgeschwollenem Zustand zur Verklumpung und Adhäsion an die Innenwandung der verwendeten Glasgefäße neigenden Harzes während der verschiedenen Teilungs- und Umfüllungsschritte auszugleichen. Die praktische Harzeinwaage betrug somit 866.7 mg; Synthese und Teilungsschritte jedoch bezogen sich stets auf 650 mg. Der Massenzuwachs der Beads während der Synthese wurde somit auch der Reserveposition zugeschlagen (siehe Kap. 6 bzw. 7). Wie bei der Synthese einzelner Peptide wurde das DIC/HOBt-Verfahren eingesetzt, auch hier mit je 12 eq Fmoc-Aminosäure, 13.2 eq DIC und 18 eq HOBt pro Position. Wenn erforderlich, wurden die Fmoc-geschützte Aminosäure und die N-terminal blockierte Aminosäure im Verhältnis 95:5 bezüglich der tatsächlichen Harzbelegung eingesetzt (11.4 : 0.6 eq), d.h. die bereits blockierten Bindungsstellen des Harzes wurden berücksichtigt und die Mengen der Aminosäuren an das geforderte Verhältnis entsprechend angepasst.

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit einer Lösung von 40 % Piperidin in DMF abgespalten. Die Teilung des Harzes erfolgte jeweils in abgeschwollenem und getrockneten Zustand. Das Schema der Bibliothek V3Bcap-Lib ist in Abb. 12.9 (umseitig) gegeben. Die Reihenfolge der Aminosäuren pro Position entspricht ihrem Vorkommen in der Datenbank (von oben nach unten abnehmend):

N	1	2 <sup>cap</sup>	3	4 <sup>cap</sup>	5 <sup>cap</sup>	6	7	8 <sup>cap</sup>	9	10 <sup>cap</sup>	C
Ac-	S	I <sup>3</sup>	H	I <sup>2</sup>	G <sup>2</sup>	P	G	R <sup>4</sup>	A	F <sup>1</sup>	-R
	G	V <sup>2</sup>	P	L <sup>1</sup>	A <sup>1</sup>	W		Q <sup>2</sup>	V	W <sup>1</sup>	
	R	L <sup>1</sup>	N	M <sup>1</sup>		L		K <sup>1</sup>	T	L <sup>2</sup>	
			T	V <sup>1</sup>		Q		S <sup>2</sup>	S	V <sup>1</sup>	
			S			F		G <sup>1</sup>	R	I <sup>1</sup>	
			Y							Y <sup>1</sup>	
			R								
			Q								

Abb. 12.9: Peptidbibliothek V3Bcap-Lib

Der N-Terminus der Peptide ist acetyliert; der C-Terminus, hier durch R angedeutet, ist die mit dem Hexapeptidlinker  $\beta$ APPPR $\beta$ A belegte feste Phase, das TentaGel-Harz. Hochgestellte Indices markieren die einzelnen von *Biblio* verwendeten Cappinggruppen: 1 = Ac-, 2 = Bz-, 3 = Naph-, 4 = Prop-. Die Menge der verwendeten Reagenzien und der Lösemittelmenge (DMF) reduziert sich entsprechend der nach dem Teilen des Harzes erhaltenen Harzmenge. Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde immer mit Bromphenolblau, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Das Harz wurde wie beschrieben mit Fmoc- $\beta$ Ala-OH belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Nachfolgend gegeben ist das Syntheseprotokoll des Linkers:

Aminosäure (mg)	Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
15. Fmoc-Arg(Pmc)-OH 1344.2 R	4 h	3 * 20 min
14. Fmoc-Pro-OH 684.1 P	4 h	3 * 20 min
13. Fmoc-Pro-OH 684.1 P	4 h	3 * 20 min
12. Fmoc-Pro-OH 684.1 P	4 h	3 * 20 min
11. Fmoc- $\beta$ Ala-OH 631.4 $\beta$ A	4 h	3 * 20 min

Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde das Harz abgeschwollen, in sechs Fraktionen (5 \* 108.3 mg + Reserveposition) geteilt und wie folgt weiter umgesetzt. Die jeweils oberste Position der folgenden Syntheseschrittprotokolle gibt die Reserveposition wieder.

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
10. Fmoc-Tyr(tBu)-OH	147.6	Y	4 h
+ Ac-Tyr(tBu)-OH	4.8	Ac-Y	
10. Fmoc-Phe-OH	124.4	F	4 h
+ Ac-Phe-OH	3.6	Ac-F	
10. Fmoc-Trp(BOC)-OH	169.1	W	4 h
+ Ac-Trp(BOC)-OH	6.8	Ac-W	
10. Fmoc-Leu-OH	113.5	L	4 h
+ Bz-Leu-OH	4.0	Bz-Leu	
10. Fmoc-Val-OH	109.0	V	4 h
+ Ac-Val-OH	2.7	Ac-V	
10. Fmoc-Ile-OH	113.5	I	4 h
+ Ac-Ile-OH	3.0	Ac-I	
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in fünf Portionen (4 \* 130 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
9. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	255.4	R	4 h
9. Fmoc-Ala-OH	120.0	A	4 h
9. Fmoc-Val-OH	130.8	V	4 h
9. Fmoc-Thr(tBu)-OH	153.2	T	4 h
9. Fmoc-Ser(tBu)-OH	147.8	S	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in fünf Portionen (4 \* 130 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
8. Fmoc-Gly-OH	108.9	G	4 h
+ Ac-Gly-OH	2.3	Ac-G	
8. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	242.7	R	4 h
+ Prop-Arg(Pmc)-OH	9.6	Prop-R	
8. Fmoc-Gln(Trt)-OH	223.6	Q	4 h
+ Bz-Gln(Trt)-OH	9.5	Bz-Q	
8. Fmoc-Lys(BOC)-OH	171.6	K	4 h
+ Ac-Lys(BOC)-OH	5.6	Ac-K	
8. Fmoc-Ser(tBu)-OH	140.4	S	4 h
+ Bz-Ser(tBu)-OH	5.2	Bz-S	
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen und mit Diethylether abgeschwollen. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
7. Fmoc-Gly-OH	544.2	G	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Das Harz wurde gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in fünf Portionen (4 \* 130 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
6. Fmoc-Phe-OH	141.9	F	4 h
6. Fmoc-Pro-OH	123.5	P	4 h
6. Fmoc-Trp(BOC)-OH	192.8	W	4 h
6. Fmoc-Leu-OH	129.4	L	4 h
6. Fmoc-Gln(Trt)-OH	220.2	Q	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Das Harz wurde gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in zwei Portionen (1 \* 325 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
5. Fmoc-Ala-OH	270.7	A	5 h
+ Ac-Ala-OH	6.0	Ac-A	
5. Fmoc-Gly-OH	258.5	G	5 h
+ Bz-Gly-OH	8.2	Bz-G	
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in vier Portionen (3 \* 162.5 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
4. Fmoc-Val-OH	140.2	V	5 h
+ Ac-Val-OH	3.5	Ac-V	
4. Fmoc-Ile-OH	146.0	I	5 h
+ Bz-Ile-OH	5.2	Bz-I	
4. Fmoc-Leu-OH	146.0	L	5 h
+ Ac-Leu-OH	3.8	Ac-L	
4. Fmoc-Met-OH	153.4	M	5 h
+ Ac-Met-OH	4.2	Ac-M	
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 3 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in acht Portionen (7 \* 81.3 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
3. Fmoc-Gln(Trt)-OH	126.2	Q	5 h
3. Fmoc-His(Trt)-OH	128.0	H	5 h
3. Fmoc-Pro-OH	69.7	P	5 h
3. Fmoc-Asn(Trt)-OH	123.3	N	5 h
3. Fmoc-Thr(tBu)-OH	82.1	T	5 h
3. Fmoc-Ser(tBu)-OH	79.2	S	5 h
3. Fmoc-Tyr(tBu)-OH	94.9	Y	5 h
3. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	136.9	R	5 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Das Harz wurde gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in drei Portionen (2 \* 216.7 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
2. Fmoc-Leu-OH	184.9	L	5 h
+ Ac-Leu-OH	4.8	Ac-L	
2. Fmoc-Ile-OH	184.9	I	5 h
+ Naph-Ile-OH	7.9	Naph-I	
2. Fmoc-Val-OH	177.6	V	5 h
+ Bz-Val-OH	6.1	Bz-V	
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether angeschwollen und in drei Portionen (2 \* 216.7 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der letzte Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
1. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	346.7	R	5 h
1. Fmoc-Ser(tBu)-OH	200.6	G	5 h
1. Fmoc-Gly-OH	155.6	S	5 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Schließlich wurde der N-Terminus acetyliert. Zuletzt wurden die Seitenkettenschutzgruppen gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz über 4 h abgespalten. Das Harz wurde gründlich mit DIEA, DMF und Ether gewaschen. Die weitere Verwendung der Bibliothek ist in den Kap. 6 bzw. 7 der vorliegenden Arbeit dargelegt.

### 12.2.3.5 V3AFcap-Lib

Die Decapeptidbibliothek V3AFcap besteht aus 80640 Peptiden und enthält diejenigen Aminosäuren der Spitze der V3-Region von gp120 des HIV-1-Subtypen A bis F, die an der jeweiligen Position zu mindestens 5 % in der LANL-Datenbank<sup>[50]</sup> repräsentiert sind. Ihr Einsatz als Zielgesamtheit für die serologische Analyse verschiedener HIV-1-Subtypen wird in den Kap. 9 und 10 der vorliegenden Arbeit ausgeführt.

Wie alle kombinatorischen Bibliotheken wurde auch diese nach der „One Bead One Peptide“-Methode von Furka (siehe Kap. 8.3) erstellt. Die Bibliothek wurde mittels *Biblio* codiert. Das Codierungsschema sah drei Aminosäurepositionen (2, 4 und 8) vor, an denen gecappt werden musste (siehe Abb. 12.10). Die Bibliothek wurde auf TentaGel-HMB-Harz (700 mg, 0.26 mMol/g) synthetisiert, nachdem zunächst ein hexapeptidischer Linker,  $\beta$ APPPR $\beta$ A, C-terminal eingeführt wurde.

Aufgrund der Ergebnisse der statistischen Analyse der massenspektrometrischen Stichproben, die in den Kap. 6 bzw. 7 dargelegt sind, die unter anderem auf eine Überrepräsentation der Reserveposition in der Bibliothek hindeuteten, wurde hier nur ein Harzüberschuss von 3 % gewählt, um mögliche Harzverluste während der vielfachen Umfüllungs- und Teilungsschritte abzufangen. Die praktische Harzeinwaage betrug somit 721 mg; Synthese und Teilungsschritte jedoch bezogen sich stets auf 700 mg. Der Massenzuwachs der Beads während der Synthese wurde der besagten minimalen Reserveposition zugeschlagen. Wie bei der Synthese einzelner Peptide wurde das DIC/HOBt-Verfahren eingesetzt, auch hier mit je 12 eq Fmoc-Aminosäure, 13.2 eq DIC und 18 eq HOBt pro Position. Wenn erforderlich, wurden die Fmoc-geschützte Aminosäure und die N-terminal blockierte Aminosäure im Verhältnis 95:5 bezüglich der tatsächlichen Harzbelegung eingesetzt (11.4 : 0.6 eq), d.h. die bereits blockierten Bindungsstellen des Harzes wurden berücksichtigt und die Mengen der Aminosäuren an das geforderte Verhältnis entsprechend angepasst.

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit einer Lösung von 40 % Piperidin in DMF abgespalten. Die Teilung des Harzes erfolgte jeweils in abgeschwollenem und getrockneten Zustand. Das Schema der Bibliothek V3AFcap-Lib ist in Abb. 12.10 gegeben. Die Reihenfolge der Aminosäuren pro Position entspricht ihrem Vorkommen über alle betreffenden HIV-1-Subtypen in der Datenbank (von oben nach unten abnehmend):

N	1	2 <sup>cap</sup>	3	4 <sup>cap</sup>	5	6	7	8 <sup>cap</sup>	9	10	C
Ac-	S	I <sup>3</sup>	H	I <sup>2</sup>	G	P	G	R <sup>5</sup>	A	F	-R
	R	T <sup>3</sup>	R	L <sup>1</sup>		L		Q <sup>3</sup>	V	L	
	G	V <sup>3</sup>	T	M <sup>1</sup>		Q		K <sup>2</sup>	T	Y	
	K	M <sup>1</sup>	P			S		H <sup>4</sup>		W	
			S			T					
			N								
			Q								

Abb. 12.10: Peptidbibliothek V3AFcap-Lib

Der N-Terminus der Peptide ist acetyliert; der C-Terminus, hier durch R angedeutet, ist die mit dem Hexapeptidlinker  $\beta$ APPPR $\beta$ A belegte feste Phase, das TentaGel-Harz. Hochgestellte Indices markieren die einzelnen von *Biblio* verwendeten Cappinggruppen: 1 = Ac-, 2 = Bz-, 3 = For-, 4 = Naph, 5 = Aab-. Die Menge der verwendeten Reagenzien und der Lösemittelmenge (DMF) reduziert sich entsprechend der nach dem Teilen des Harzes erhaltenen Harzmenge. Die Vollständigkeit der Kupplungen wurde immer mit Bromphenolblau, die Fmoc-Entschützung UV-spektrometrisch überprüft. Das Harz wurde wie beschrieben mit Fmoc- $\beta$ Ala-OH belegt und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Nachfolgend gegeben ist das Syntheseprotokoll des Linkers:

Aminosäure (mg)	Reaktionszeit	Fmoc-Abspaltung
15. Fmoc-Arg(Pmc)-OH 1447.6 R	4 h	4 * 20 min
14. Fmoc-Pro-OH 736.7 P	4 h	4 * 20 min
13. Fmoc-Pro-OH 736.7 P	4 h	4 * 20 min
12. Fmoc-Pro-OH 736.7 P	4 h	4 * 20 min
11. Fmoc- $\beta$ Ala-OH 679.9 $\beta$ A	4 h	4 * 20 min

Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde das Harz angeschwollen, in vier Fraktionen (3 \* 175 mg + Reserveposition) geteilt und wie folgt weiter umgesetzt. Die jeweils oberste Position der folgenden Syntheseschrittprotokolle gibt die hier minimale Reserveposition wieder.

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
10. Fmoc-Trp(BOC)-OH	287.5	W	4 h
10. Fmoc-Phe-OH	211.6	F	4 h
10. Fmoc-Leu-OH	193.0	L	4 h
10. Fmoc-Tyr(tBu)-OH	250.9	Y	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in drei Portionen (2 \* 233.3 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
9. Fmoc-Thr(tBu)-OH	289.3	T	4 h
9. Fmoc-Ala-OH	226.6	A	4 h
9. Fmoc-Val-OH	247.1	V	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in vier Portionen (3 \* 175 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
8. Fmoc-His(Trt)-OH	321.4	H	4 h
+ Naph-His(Trt)-OH	15.1	Naph-H	
8. Fmoc-Gln(Trt)-OH	316.8	Q	4 h
+ For-Gln(Trt)-OH	11.4	For-Q	
8. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	343.8	R	4 h
+ Aab-Arg(Pmc)-OH	16.4	Aab-R	
8. Fmoc-Lys(BOC)-OH	243.1	K	4 h
+ Bz-Lys(BOC)-OH	9.6	Bz-K	
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Hiernach wurde das Harz gewaschen und mit Diethylether abgeschwollen. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
7. Fmoc-Gly-OH	616.8	G	4 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Das Harz wurde gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in fünf Portionen (4 \* 140 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
6. Fmoc-Thr(tBu)-OH	164.9	T	5 h
6. Fmoc-Pro-OH	140.0	P	5 h
6. Fmoc-Leu-OH	146.7	L	5 h
6. Fmoc-Gln(Trt)-OH	253.4	Q	5 h
6. Fmoc-Ser(tBu)-OH	159.1	S	5 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Das Harz wurde gewaschen und mit Diethylether abgeschwollen. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
5. Fmoc-Gly-OH	616.8	G	5 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Das Harz wurde gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in vier Portionen (3 \* 233.3 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
4. Fmoc-Met-OH	244.0	M	5 h
+ Ac-Met-OH	6.6	Ac-M	
4. Fmoc-Ile-OH	232.2	I	5 h
+ Bz-Ile-OH	8.2	Bz-I	
4. Fmoc-Leu-OH	232.2	L	5 h
+ Ac-Leu-OH	6.0	Ac-L	
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Das Harz wurde gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in sieben Portionen (6 \* 100 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
3. Fmoc-Gln(Trt)-OH	172.0	Q	5 h
3. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	186.6	R	5 h
3. Fmoc-His(Trt)-OH	174.5	H	5 h
3. Fmoc-Thr(tBu)-OH	111.9	T	5 h
3. Fmoc-Pro-OH	95.0	P	5 h
3. Fmoc-Ser(tBu)-OH	108.0	S	5 h
3. Fmoc-Asn(Trt)-OH	168.0	N	5 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Das Harz wurde gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in vier Portionen (3 \* 175 mg + Reserveposition) geteilt. Dann wurde der nächste Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
2. Fmoc-Met-OH	173.9	M	5 h
+ Ac-Met-OH	4.7	Ac-M	
2. Fmoc-Val-OH	158.9	V	5 h
+ For-Val-OH	3.6	For-V	
2. Fmoc-Ile-OH	165.4	I	5 h
+ Bz-Ile-OH	5.8	Bz-I	
2. Fmoc-Thr(tBu)-OH	186.0	T	5 h
+ For-Thr(tBu)-OH	5.0	For-T	
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Das Harz wurde gewaschen, mit Diethylether abgeschwollen und in vier Portionen (3 \* 175 mg + Reserveposition) geteilt. Schließlich wurde der letzte Kupplungsschritt durchgeführt:

Aminosäure (mg)			Reaktionszeit
1. Fmoc-Lys(BOC)-OH	217.8	K	6 h
1. Fmoc-Ser(tBu)-OH	179.5	S	6 h
1. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	308.1	R	6 h
1. Fmoc-Gly-OH	138.2	G	6 h
Vereinigung des Harzes			
Fmoc-Abspaltung: 4 * 20 min			

Schließlich wurde der N-Terminus acetyliert. Zuletzt wurden die Seitenkettenschutzgruppen gemäß der Vorschrift für TentaGel-Harz über 4 h abgespalten. Das Harz wurde gründlich mit DIEA, DMF und Ether gewaschen. Die weitere Verwendung der Bibliothek als Zielgesamtheit für die Ermittlung von Seroreaktivitäten ist in den Kapiteln 9 bzw. 10 der vorliegenden Arbeit dargelegt.

## 12.3 Liste der sequenzierten Peptide der Heptapeptidbibliothek „Modellcap2-Lib“

Insgesamt konnten 299 der 300 willkürlich gewählten Beads der Heptapeptidbibliothek Modellcap2-Lib sequenziert werden. Hiervon kommen 206 Peptide genau ein, 37 zwei, 5 drei und eine Sequenz vier mal vor (siehe Kap. 6 bzw. 7). In der nachfolgenden Liste sind alle 249 verschiedenen Sequenzen mit ihrer Häufigkeit in der Stichprobe aufgeführt.

Sequenz	Anzahl
AIAGLFP	1
AIHFYFI	1
AIHIYFP	1
AIHIYTP	1
AILFGFL	1
AILFYQP	1
AILIAQP	1
ALAGYFP	1
ALAIYFI	1
ALHFYTP	1
ALLFGFP	2
ALLGGFP	1
ALLGYQP	1
ALLIYFP	1
APAIYTP	1
APHIYQP	1
APLFYQP	1
AVAFYFL	1
AVAFYFP	1
AVAFYQP	1
AVAIAQP	1
AVAILFP	1
AVHFLQP	1
AVHFYFP	2
AVHFYQP	1
AVHGGFP	2
AVHGLTP	1
AVHGYFP	1
AVHIAFI	1
AVHIAQI	1
AVHIAQP	1
AVHIGQP	1
AVLIAFP	1
AVLIAQI	1

AVLIGQL	1
AVLIYFP	1
FIAFGQP	1
FIAFYFP	2
FIAGYQP	1
FIHFAQP	1
FIHFYTP	1
FIHIYTP	1
FILGATP	1
FILGYQP	1
FILIAQI	1
FILIGFP	1
FILILQI	2
FILIYTP	1
FLHGAFP	1
FLHGYFP	1
FLHGYQP	2
FLHIAQL	1
FLHIYFP	1
FLLFYFP	2
FPAFGTP	1
FPAIGTP	1
FPAIYFP	1
FPHIGFP	1
FPLILTP	2
FVAFGTL	1
FVAFYQL	1
FVAGATP	1
FVAGGFP	1
FVAIAFI	1
FVAIAQP	1
FVAILTP	1
FVAIYQP	1
FVHFAQP	1
FVHFYTI	1

FVHGYTP	1
FVHIGQP	1
FVHIYFP	2
FVHIYQP	3
FVLFLQP	1
FVLFYQI	1
FVLGATL	1
FVLGYQP	1
FVLIAQP	1
FVLIATP	1
FVLIGFP	1
FVLIGQP	2
GIAFLQP	1
GIAFYQL	1
GIAGYTP	1
GIAIYQP	2
GIHFLQP	1
GIHFYQI	1
GIHGYQI	1
GIHIGFL	1
GIHILTP	1
GIHIYQP	2
GILILFP	1
GILIYFP	1
GILIYQP	2
GLLGYQP	1
GLLIGQP	1
GPHFYTP	1
GPHGYQP	2
GPHIYQP	1
GPLFGFL	1
GPLFGTP	1
GVAFLFP	2
GVAFYTP	1
GVAGAQP	1

GVAGLFP	1
GVAGYQI	1
GVAIGFP	1
GVAIQP	3
GVHFGTP	1
GVHFYTI	1
GVHFYTP	1
GVHGATP	1
GVHGGQP	1
GVHGYQP	2
GVHGYTL	1
GVHIGTP	1
GVHILQP	2
GVHIYQP	3
GVHIYTP	1
GVLGAQL	1
GVLGYFP	1
GVLGYTP	2
GVLIAFP	1
GVLIAFP	1
GVLIGTP	1
GVLIIYQI	1
KIAFGTP	1
KIAGYQP	1
KIAIAQI	1
KIAIAQP	1
KIAILTP	1
KIAIYFP	1
KIAIYTP	1
KIHFGQP	1
KIHFLFP	1
KIHFYQP	1
KIHGLFL	1
KIHGYQP	1
KIHIAFI	2
KIHIAFP	1
KIHIAQL	1
KIHILTL	2
KIHILTP	2
KIHIIYQI	1

KIHIIYQP	1
KIHIIYTP	1
KILFLTP	1
KILGAQL	1
KILGYFP	1
KILIGQL	1
KILIGQP	2
KILIIYQI	1
KILIIYTL	1
KLAI AQI	1
KLAI AQP	1
KLAIYFL	1
KLAIYFP	1
KLAIYQP	2
KLAIYTP	1
KLHFGTP	1
KLHFYFP	1
KLHGAFP	1
KLHGGQP	1
KLHGLFP	1
KLHGYQP	1
KLHIGQP	1
KLHILQP	1
KLHIIYQI	1
KLHIIYQL	2
KLHIIYQP	2
KLHIIYTL	1
KLLGAQI	1
KLLGLTP	1
KLLGYQP	1
KLLIATP	1
KLLIGFP	2
KLLIIYQP	1
KPAGYQP	1
KPAGYTP	1
KPAILQI	1
KPHFGFP	2
KPHFLFP	1
KPHFYQP	1
KPHIAFP	1

KPHILQP	1
KPHIIYQI	2
KPHIIYTI	1
KPLFLFI	1
KPLGYFP	1
KPLIGQI	1
KPLILQI	1
KPLIIYQP	1
KPLIIYTP	1
KVAFAQP	1
KVAFGFI	1
KVAFGTP	1
KVAFLTP	2
KVAFYQP	2
KVAFYTL	1
KVAGLFL	1
KVAGLQI	1
KVAGYQP	1
KVAGYTI	1
KVAGYTP	1
KVAIAQI	1
KVAIATP	1
KVAIGFP	1
KVHFAQP	1
KVHFGFP	1
KVHFYFP	1
KVHFYQP	1
KVHFYTI	1
KVHFYTL	1
KVHGAFI	1
KVHGGFP	1
KVHGGQP	2
KVHGLQP	1
KVHGYFI	1
KVHGYQP	2
KVHGYTP	1
KVHIAFP	2
KVHIAQL	2
KVHIAQP	1
KVHIAFP	1

KVHIGFL	1
KVHIGFP	3
KVHIGQI	2
KVHIGQL	1
KVHILFI	1
KVHIYFL	1
KVHIYQI	2
KVHIYQL	1
KVHIYQP	4
KVHIYTI	1
KVHIYTP	2
KVLFAQP	1
KVLFGFP	1
KVLFGQP	1
KVLFGTP	1
KVLFYFP	1
KVLFYQP	1
KVLFYTP	1
KVLGAFI	1
KVLGYQP	1
KVLIAQP	1
KVLIATL	1
KVLIGFI	1
KVLIYQI	1
KVLIYQP	3
Summe:	299

## 12.4 Verwendete Abkürzungen

Entsprechend den Vorschlägen der IUPAC für biochemische Nomenklatur wurden folgende Drei- und Einbuchstabenabkürzungen für die Aminosäuren und Peptide verwendet<sup>[151],[152],[153]</sup>.

Ala	A	L-Alanin
Arg	R	L-Arginin
Asn	N	L-Asparagin
Asp	D	L-Asparaginsäure
Cys	C	L-Cystein
Gln	Q	L-Glutamin
Glu	E	L-Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	L-Histidin
Ile	I	L-Isoleucin
Leu	L	L-Leucin
Lys	K	L-Lysin
Met	M	L-Methionin
Phe	F	L-Phenylalanin
Pro	P	L-Prolin
Ser	S	L-Serin
Thr	T	L-Threonin
Trp	W	L-Tryptophan
Tyr	Y	L-Tyrosin
Val	V	L-Valin
Aab		4-Acetamidobenzoyl
Abb.		Abbildung
abs.		absolut
Ac		Acetyl
ACN		Acetonitril
AEC		3-Amino-9-ethylcarbazol
AIDS		Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMCA		7-Amino-4-Methyl-3-Coumarinylessigsäure

AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
$\beta$ Ala	beta-Alanin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BOC	Tertiärbutyloxycarbonyl
BSA	Bovine Serum Albumin
Bz	Benzoyl
Bzl	Benzyl
c	Konzentration
CCD	charge coupled device
CD	Cluster of differentiation
CNBr	Cyanogenbromid
CTL	cytotoxischer T-Lymphocyt
Cy	Carbocyanin
d	Dublett
D	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzoessäure
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DE	Delayed Extraction
DHB	2,5-Dihydroxybenzoessäure
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DVB	Divinylbenzol
EDT	Ethan-1,2-dithiol
EEDQ	2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eq	[Mol]-Äquivalent

ESI	Elektronensprayionisation
EtOH	Ethanol
f	das Präfix Femto-
F <sub>c</sub>	Fragment constant
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
For	Formyl
gp120	Glycoprotein (120 kD)
h	Stunde(n)
HAART	highly active antiretroviral therapy
HATU	2-(1H-7-Aza-benzotriazo-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H+L	Heavy and light (schwere und leichte Ketten von Antikörpern)
HLA	Human Leucocyte Antigen
HMB	Hydroxymethylbenzoyl
HOAt	1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High (Performance) Pressure Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
J	Symbol für die Kopplung zweier NMR-aktiver Kerne
KCN	Kaliumcyanid
konz.	konzentriert

LANL	Los Alamos National Laboratory
m	Milli bzw. Multipllett
M	Molmasse bzw. das Präfix Mega-
mAb	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MeOH	Methanol
min	Minuten
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MS	Massenspektroskopie
MSNT	1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol
Naph	2-Naphtoyl
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NHS	Normal-Humanserum
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NNRTI	nicht-nucleosidischer Inhibitor der Reversen Transkriptase
o	ortho
OBOP	“One Bead One Peptide”-Konzept
OPD	o-Phenylendiamin
p	das Präfix Pico-
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Principal Component Analysis
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
PND	principal neutralizing determinant
POE	Polyoxyethylen
ppm	Parts per Million
Prop	Propionyl
PS	Polystyrol
PSD	Post Source Decay

PyAOP	7-Aza-benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino- Phosphoniumhexafluorophosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino- Phosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett
RNA	Ribonucleic Acid
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
tBu	Tertiärbutyl
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl- Uroniumtetrafluoroborat
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFAc	Trifluoracetyl
TFE	Trifluorethanol
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
Trt	Triphenylmethyl
UNAIDS	The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
UV	ultraviolett
4C1N	4-Chloro-1-Naphtol
V3	dritte variable Region
WSC	1-Ethyl-3-(3'-Dimethylaminopropyl)carbodiimid

2-Cl-Z	ortho-Chlor-Carbobenzoxy
$\delta$	chemische Verschiebung
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	Mikro

## 12.5 Verwendete Geräte und Materialien

### Liste der verwendeten Geräte

Chromatographiesäule	Knauer Eurospher RP 18
DC-Platten	Macherey & Nagel Polygram Sil G/UV254
ESI-Massenspektrometer	Fisons VG Platform II
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse TE 300 mit Epifluoreszenzzusatzgerät TE-FM
Glasgeräte	hergestellt in der Glasbläserei des Instituts für Organische Chemie der Universität Frankfurt
Gefriertrocknungsanlage	Christ Alpha 2-4 mit einer Vacubrand RC-4- Pumpe
HPLC	Merck-Hitachi L-6200 mit Diodenarray-Detektor L-3000
IR-Spektrometer	Jasco FT/IR-420
MALDI-Massenspektrometer	Applied Biosystems Voyager DE Pro mit TOF- Detektor
NMR-Spektrometer	Bruker AM250 Bruker AMX400
Pipetten	Brand Transferpette
Polarimeter	Perkin-Elmer Polarimeter 241
Reinstwasseraufbereitung	Seral Seralpur PRO 90 CN
Schmelzpunktbestimmung	Büchi „Apparatur nach Dr. Tottoli“
UV-Lampe	Heraeus Fluotest 6W 254 nm
UV-Spektrometer	Perkin-Elmer Lambda 16
Zentrifuge	Heraeus Biofuge 13

### Eingesetzte Software

<i>Biblio</i>	Codierung/Decodierung kombinatorischer Peptidbibliotheken; D. Blechschmidt, Version 2.11, Build 31
---------------	--

GRAMS/386	MALDI-Massenspektroskopie; Galactic Corp., Version 3.02
Lucia	Fluoreszenzmikroskopie; Laboratory Imaging Ltd., Version 4.11
Mathematica	Principal Component Analysis; Wolfram Research Inc., Version 4.0
<i>Smart</i>	Neuronale Netze; J. Meiler, Version 1.0

### **Chemikalien**

BSA	Sigma, Fraktion V
deuterierte Lösemittel	Deutero
DIC	Merck, zur Synthese
DIEA	Fluka
diverse anorg. Salze	Fluka „Biochemika“
diverse org. Farbstoffe	Sigma
DMF	Merck, zur Analyse
EDT	Fluka
Aminosäurederivate, Fmoc-geschützt	Calbiochem-Novabiochem
Harze zur Peptidsynthese	Calbiochem-Novabiochem
HOBt	Calbiochem-Novabiochem
Klebstoff	Henkel, „Pattex Kraft-Mix“
NHS	Coulter „NHS“
Phenol	Fluka „Biochemika“
R-Phycoerythrin-Streptavidin- Konjugat	Sigma
Piperidin	Merck, zur Synthese
TEA	Fluka
TentaGel-Harz	Rapp Polymere
TFA	Acros Chemicals
TFE	Merck, zur Synthese
TFMSA	Fluka

Thioanisol	Fluka
Thioessigsäure	Fluka

### **Antikörper**

Anti-Myc-Tag, Klon 9E10, monoklonaler IgG <sub>1</sub> ex mouse	Biozol
Alexa488-markierter anti-humaner IgG (H+L) ex goat	MoBiTec
AMCA-markierter anti-humaner IgG (H+L) ex goat	Dianova
AP-markierter anti-humaner IgG (H+L) ex goat	Dianova
Biotin-markierter anti-humaner IgG (H+L) ex goat	Sigma
Cy2-markierter anti-humaner IgG (H+L) ex goat	Dianova
FITC-markierter anti-humaner IgG (H+L) ex goat	Dianova
FITC-markierter anti-Maus IgG (H+L) ex goat	Dianova
TexasRed-markierter anti-humaner IgG (H+L) ex goat	Dianova

humaner mAb 91-5/p24	Prof. S. Zolla-Pazner, New York
humaner mAb 447	Prof. S. Zolla-Pazner, New York
humaner mAb 1108	Prof. S. Zolla-Pazner, New York
humaner mAb 1324E	Prof. S. Zolla-Pazner, New York

**Verwendete Humane HIV-positive Seren, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main**

HIV-1 A:	BL97001
	BL97005
	TZ97002
	TZ97003
	TZ98015
HIV-1 B:	1636
	1639
	1640
	1641
	1651
	GE96002
	GE97012
	GE98002
	RU98010
HIV-1 C:	BR97001
	CN98005
	IN98007
	ZA97001
	ZA97004

HIV-1 E: TH92003  
TH92005  
TH92006  
TH92007  
TH92009

Die HIV-positiven Seren von deutschen Patienten (alle HIV-1-B-Seren mit Ausnahme von RU98010) wurden von der Abteilung Infektionsbiologie des Georg-Speyer-Hauses, alle anderen Seren von UNAIDS (Referenzzentrum Georg-Speyer-Haus) zur Verfügung gestellt.

Länderkennungen der Seren:

BL	Weißrussland
BR	Brasilien
CN	VR China
GE	Deutschland
IN	Indien
RU	Russland
TH	Thailand
TZ	Tansania
ZA	Südafrika

## 12.6 Literaturverzeichnis

- [1] M.S. Gottlieb, R. Schroff, H. Schanker, *New Engl. J. Med.*, **305**, 1425-1431 (1981)
- [2] D.D. Richman, *Nature*, **410**, 995-1001 (2001)
- [3] G.R. Kaufmann, D.A. Cooper, *Curr. Opin. Microbiol.*, **3** (5), 508-514 (2000)
- [4] S. Vella, L. Palmisano, *Antiviral Res.*, **45** (1), 1-7 (2000)
- [5] D.C. Chang, P.S. Kim, *Cell*, **93**, 681-684 (1998)
- [6] M.P. D'Souza, J.S. Cairns, S.F. Plaeger, *JAMA*, **284**, (2), 215-222 (2000)
- [7] J. d'Angelo, J.F. Mouscadet, D. Desmaele, F. Zouhiri, H. Leh, *Pathol. Biol. (Paris)*, **49** (3), 237-246 (2001)
- [8] T.-W. Chun, A.S. Fauci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10958-10961 (1999)
- [9] D. Finzi, J. Blankson, J.D. Siliciano, J.B. Margolick et al., *Nat. Med.* **5**, 512-517 (1999)
- [10] M.I. Bukrinsky, T.L. Stanwick, M.P. Dempsey, M. Stevenson, *Science*, **254**, 423-427 (1991)
- [11] T.-W. Chun, D. Engel, S.B. Mizell, C.W. Hallahan et al., *Nat. Med.* **5**, 651-655 (1999)
- [12] K.A. Smith, *AIDS*, **15** (Suppl. 2), S28-35 (2001)
- [13] T.-W. Chun, D. Engel, S.B. Mizell, L.A. Ehler, A.S. Fauci, *J. Exp. Med.* **188**, 83-91 (1998)
- [14] G.J. Nabel, *Nature*, **410**, 1002-1007 (2001)
- [15] U. Dittmer, D.M. Brooks, K.J. Hasenkrug, *Nat. Med.*, **5**, 189-193 (1999)
- [16] R.C. Gallo, A. Garzino-Demo, A.L. DeVico, *J. Clin. Immunol.*, **19**, 293-299 (1999)
- [17] A. Garzino-Demo, A.L. DeVico, F. Cocchi, R.C. Gallo, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **14**, (Suppl. 2), S177-S184 (1998)
- [18] M. Samson, F. Libert, B.J. Doranz, J. Rucker et al., *Nature*, **382**, 722-725 (1996)
- [19] M. Dean, M. Carrington, C. Winkler, G.A. Huttley et al., *Science*, **273**, 1856-1862 (1996)
- [20] J. Cohen, *Science*, **291**, 1686-1688 (2001)
- [21] D.H. Barouch, S. Santra, J.E. Schmitz, M.J. Kuroda et al., *Science*, **290**, 486-492 (2000)
- [22] R.R. Amara, F. Villinger, J.D. Altman, S.L. Lydy et al., *Science*, **292**, 69-74 (2001)
- [23] J.K. Rose, P.A. Marx, A. Luckay, D.F. Nixon et al., *Cell*, **106**, 539-549 (2001)
- [24] R.A. LaCasse, K.E. Follis, M. Trahey, J.D. Scarborough, D.R. Littman, J.H. Nunberg, *Science*, **283**, 357-362 (1999)

- [25] E. Cabezas, M. Wang, P.W.H.I. Parren, R.L. Stanfield, A.C. Satterthwait, *Biochemistry*, **39**, 14377-14391 (2000)
- [26] E.O. Saphire, P.W.H.I. Parren, R. Pantophlet, M.B. Zwick et al., *Science*, **293**, 1155-1159 (2001)
- [27] L.E. Henderson, L. Arthur, *National Institute of Health, Bethesda, USA*, 2001
- [28] J. Goudsmit, C. Debouk, R.M. Melen, L. Smit, M. Bakker, D.M. Asher, A.V. Wolff, C.J. Gibbs, D.C. Gajdusek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4478-4482 (1988)
- [29] K. Jahaverian, A.J. Langlois, C. McDanal, K.L. Ross, C.L. Jellis, A.T. Profy, J.R. Rusche, D.P. Bologneri, S.D. Putney, F.J. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6768-6772 (1989)
- [30] J.R. Rusche, K. Jahaverian, C. McDanal, J. Petro, D.L. Lynn, R. Grimalia, A. Langlois, R.C. Gallo, L.O. Arthur, P.J. Fischinger, D. P. Bologneri, S.D. Putney, T.J. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3198-3202 (1988)
- [31] E.W. Carrow, L.K. Vujcic, W.L. Glass, K.B. Seamon et al., *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, **7**, 831-838 (1991)
- [32] G. Zwart, H. Langedijk, L. van der Hoek, J.-J. de Jong et al., *Virology*, **181**, 481-489 (1991)
- [33] W.A. O'Brien, Y. Koyanagi, A. Namazie, J.-Q. Zhao et al., *Nature*, **348**, 69-73 (1990)
- [34] T. Shioda, J.A. Levy, C. Cheng-Mayer, *Nature*, **349**, 167-169 (1991)
- [35] J.R. Trujillo, W.K. Wang, T.H. Lee, M. Essex, *Virology*, **217**, 613-617 (1996)
- [36] P. Westervelt, D.B. Trowbridge, G. Epstein, B.M. Blumberg et al., *J. Virol.*, **66**, 2577-2582 (1992)
- [37] P.D. Bieniasz, R.A. Fridell, I. Aramori, S.S.G. Ferguson et al., *EMBO J.*, **16**, 2599-2609 (1997)
- [38] F. Cocchi, A.L. DeVico, A. Garzino-Demo, A. Cara et al., *Nat. Med.*, **2**, 1244-1247 (1996)
- [39] T.L. Hoffmann, E.B. Stephens, O. Narayan, R.W. Doms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11360-11365 (1998)
- [40] R.F. Speck, K. Wherly, E.J. Platt, R.E. Atchison et al., *J. Virol.*, **71**, 7136-7139 (1997)
- [41] A. Trkola, T. Dragic, J. Arthos, W.C. Olson et al., *Nature*, **384**, 184-187 (1996)
- [42] L. Wu, N.P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe et al., *Nature*, **384**, 179-183 (1996)
- [43] R. Wyatt, P.D. Kwong, E. Desjardings, R.W. Sweet et al., *Nature*, **393**, 705-711 (1998)
- [44] E.N. Emini, W.A. Schleif, J. Lewis, J.P. Davide et al., *J. Virol.*, **64**, 3674-3678 (1990)

- [45] M.K. Girard, A. Pinter, F. Barré-Sinoussi, P. Nara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 542-546 (1991)
- [46] E.N. Emini, J.H. Nunberg, A.J. Conley, Y. Eda, *Nature*, **355**, 728-730 (1992)
- [47] T.B. Igarashi, A. Azadegan, N. Haigwood, D. Dimitrov et al., *Nat. Med.*, **5**, 211-216 (1999)
- [48] R.I. Shibata, N. Haigwood, A. Buckler-White, R. Ogert, *Nat. Med.*, **5**, 204-210 (1999)
- [49] N.L. Letvin, S. Robinson, D. Rohne, M.K. Axthelm, J.F. Fanton et al., *J. Virol.*, **75**, 4165-4175 (2001)
- [50] C. Kuiken, B. Foley, B. Hahn, P. Marx et al. (Hrsg.), *Human Retroviruses and AIDS 1999*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, 1999
- [51] M. Hoelscher, S. Hanker, F. Barin, R. Cheingsong-Popov et al., *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, **14**, 139-149 (1998)
- [52] A.B. Baillou, F. Denis, S. M'Boup, R. Chout et al., *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, **9**, 1209-1215 (1993)
- [53] F. Barin, Y. Lahabi, L. Buzelay, B. Lejeune et al., *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, **12**, 1279-1289 (1998)
- [54] L.C. Kostrikis, H. Ngai, J.P. Moore, D.D. Ho, *J. Virol.*, **70**, 445-458 (1996)
- [55] J.P. Moore, J. Leu, L. Qin, B. Korber, D.D. Ho, *J. Virol.*, **70**, 427-444 (1996)
- [56] J.F. Weber, S. Beddows, P. Kaleebu, A. Björndal, *J. Virol.*, **70**, 7827-7832 (1996)
- [57] J.Z. Takehisa, E. Ido, Y. Yamaguchi-Kabata, I. Mboudjeka et al., *J. Virol.*, **73**, 6810-6820 (1999)
- [58] A.T. Ramos, M. Schechter, M.A. Rayfield, D.J. Hu et al., *Emerg. Inf. Dis.*, **5**, 65-74 (1999)
- [59] A.W. Artenstein, J.R. Mascola, J.K. Carr, P.A. Hegerich et al., *J. Inf. Dis.*, **171**, 805-810 (1995)
- [60] M.C. Salminen, D.L. Robertson, P. Hegerich, D. Gotte et al., *J. Virol.*, **71**, 2647-2655 (1997)
- [61] S. Zolla-Pazner, M.K. Gorny, P.N. Nyambi, T.C. vanCott, A. Nádas, *J. Virol.*, **73**, 4042-4051 (1999)
- [62] P.N. Nyambi, A. Nádas, S. Burda, C. Williams et al., *J. Virol.*, **74**, 10670-10680 (2000)
- [63] E. Fischer, *Ber. Dt. Chem. Ges.*, **39**, 530-610 (1906)
- [64] R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154 (1963)
- [65] R.B. Merrifield, *Angew. Chem.*, **97**, 801-812 (1985)
- [66] G.R. Petit, *Synthetic Peptides*, van Nostrand, Reinhold Comp., New York 1970-1971

- [67] M. Mutter, E. Bayer, *Nature*, **237**, 512 (1972)
- [68] F. Zaragoza-Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Phase*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000
- [69] R. Quarrel, T.D.W. Claridge, G.W. Weaver, G. Lowe, *Mol. Div.*, **1**, 223-232 (1995)
- [70] E. Bayer, *Angew. Chem.*, **103**, 117-133 (1991)
- [71] M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag Berlin New York, 1984
- [72] K.-H. Altmann, M. Mutter, *Chem. i.u.Z.*, **6**, 274-286 (1993)
- [73] L.A. Carpino, G.Y. Han, *J. Org. Chem.*, **37** (22), 3404-3409 (1972)
- [74] A.G. Beck-Sickinger, G. Schnorrenberg, J. Metzger, G. Jung, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **38**, 25-31 (1991)
- [75] P. Sieber, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1637-1640 (1987)
- [76] D.A. Pearson, M. Blandette, M.L. Baker, C.A. Guindon, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 2739-2742 (1989)
- [77] B.F. Lundt, N.L. Johansen, A. Volund, J. Markussen, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **12**, 258-268 (1978)
- [78] D.S. King, C.G. Fields, G.B. Fields, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **36**, 255-266 (1990)
- [79] H. Yajima, J. Kanaki, M. Kitajima, S. Funakoshi, *Chem. Pharm Bull.*, **28**, 1214-1218 (1980)
- [80] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitisis, G. Papaphotidu, P. Satiriu, Y. Wenquing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3943-3946 (1989)
- [81] K. Barlos, D. Gatos, S. Kapolos, G. Papaphotidu, W. Schäfer, Y. Wenquing, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3947-3950 (1989)
- [82] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **37**, 513-520 (1991)
- [83] M. Nomizu, Y. Inagaki, T. Yamashita, A. Ohkulo, A. Otaka, N. Fuji, P.P. Roller, H. Yaijama, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **37**, 145-152 (1991)
- [84] G.B. Fields, R.L. Noble, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **35**, 161-214 (1990)
- [85] A.R. Mitchell, S.B.H. Kent, M. Engelhard, R.B. Merrifield, *J. Org. Chem.*, **43**, 2845-2852 (1978)
- [86] E. Fischer, *Ber. Dt. Chem. Ges.*, **36**, 2094-2106 (1903)
- [87] T. Curtius, *Ber. Dt. Chem. Ges.*, **35**, 3226-3228 (1902)
- [88] E. Wünsch, G. Wendleberger, *Chem. Ber.*, **100**, 160-172 (1967)

- 
- [89] J. Meienhofer, *The Peptides*, **1**, 263-314, (Eds.: E. Gross, J. Meienhofer) Academic Press, New York 1979
- [90] M Bodanszky, *The Peptides*, **1**, 105-196, (Eds.: E. Gross, J. Meienhofer) Academic Press, New York 1979
- [91] J.C. Sheehan, G.P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1067 (1955)
- [92] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **103**, 788-798 (1970)
- [93] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **103**, 2024-2033 (1970)
- [94] L.A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397-4398 (1993)
- [95] L.A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.*, **35**, 2279-2282 (1994)
- [96] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D.G. Mason, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1927-1930 (1989)
- [97] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 205-208 (1990)
- [98] R.C. de L. Milton, S.C.F. Milton, P.A. Adams, *J. Am Chem. Soc.*, **112**, 6039-6046 (1990)
- [99] W.J. van Woerkom, J.W. van Nispen, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **38**, 103-113 (1991)
- [100] M. Beyermann, M. Bienert, *THL*, **33** (26), 3745-3748 (1992)
- [101] J. Bedford, C. Hyde, T. Johnson, W. Jun et al., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **40**, 300-307 (1992)
- [102] V. Krchňák, Z. Flegelová, J. Vágner, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **42**, 450-454 (1993)
- [103] M. Dettin, S. Pegoraro, P. Rovero, S. Bicoato et al., *J. Pept. Res.*, **49**, 103-111 (1997)
- [104] C. Dhalluin, C. Boutillon, A. Tartar, G. Lippens, *J. Am Chem. Soc.*, **119**, 10494-10500 (1997)
- [105] R. Warrass, J.-M. Wieruszkeski, C. Boutillon, G. Lippens, *J. Am Chem. Soc.*, **122**, 1789-1795 (2000)
- [106] E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook, *Anal. Biochem.*, **34**, 595 (1970)
- [107] V.K. Sarin, S.B.H. Kent, J.P. Tam, R.B. Merrifield, *Anal. Biochem.*, **117**, 147-152 (1981)
- [108] V. Krchňák, J. Vágner, P. Šafár, M. Lebl, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **53**, 2542 (1988)
- [109] G. Jung, A.G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.*, **104**, 375-391 (1992)
- [110] M.R. Pavia, T.K. Sawyer, W.H. Moos, *Org. & Med. Chem. Lett.*, **3**, 387 (1993)
- [111] M.A. Gallop, R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P.A. Fodor, E.M. Gordon, *J. Med. Chem.*, **37**, 1233-1251 (1994)
- [112] J.K. Scott, G.P. Smith, *Science*, **249**, 386 (1990)
-

- [113] G. Jung (Ed.), *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, VCH Weinheim, 1996
- [114] S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, D. Solas, *Science*, **251**, 767-773 (1991)
- [115] S.P.A. Fodor, R.R. Rava, X.C. Huang, A.C. Pease, C.P. Holmes, C.L. Adams, *Nature*, **364**, 555-556 (1993)
- [116] K.K. Wilgenbus, P. Lichter, *J. Mol. Med.*, **77**, 761-768 (1999)
- [117] C.N. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem.*, **111**, 3039-3043 (1999)
- [118] Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, F. Dibó, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **37**, 487-493 (1991)
- [119] K.S. Lam, S. S. Salmon, E.M. Hersh, V.J. Hruby et al., *Nature*, **354**, 82-84 (1991)
- [120] R.A. Houghten, C. Pinilla, S.E. Blondelle, J.R. Appel, C.T. Dooley et al., *Nature*, **354**, 84-86 (1991)
- [121] M.C. Needels, D.G. Jones, E.H. Tate, G.L. Heinkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10700-10704 (1993)
- [122] V. Nikolaiev, A. Stierandova, V. Krchňák, B. Seligmann et al., *Peptide Res.*, **6**, 161-170 (1993)
- [123] M.H.J. Ohlmeyer, R.N. Swanson, L.W. Dillard, J.C. Reader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10922-10926 (1993)
- [124] R.S. Youngquist, G.R. Fuentes, M.P. Lacey, T. Keough, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3900-3906 (1995)
- [125] F. Lottspeich, R. Kellner, H.E. Meyer, *Microcharacterization of Proteins*, VCH Weinheim, 1994
- [126] C. Albrecht, Dissertation, Universität Frankfurt am Main, 1998
- [127] D. Blechschmidt, Dissertation, Universität Frankfurt am Main, 1999
- [128] C. Hoffmann, D. Blechschmidt, R. Krüger, M. Karas, C. Griesinger, *J. Comb. Chem.*, für die Veröffentlichung akzeptiert; ebenfalls Kap. 6 bzw. 7 der vorliegenden Arbeit
- [129] J.-C. Plantier, S. Le Pogam F. Poission, L. Buzelay et al., *J. Virol.*, **72**, 677-683 (1998)
- [130] D.M. Kemeny, *ELISA, Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor*, G. Fischer Verlag Stuttgart, New York, 1994
- [131] K.K. Unger, E. Weber, *Handbuch der HPLC*, GIT Verlag Darmstadt, 1995
- [132] E. Bayer, K. Albert, H. Willisch, W. Rapp, B. Hemmasi, *Macromolecules*, **23**, 1937-1940 (1990)
- [133] J.W. Metzger, *Angew. Chem.*, **106**, 763-765 (1994)

- [134] Y.-J. Hu, Y. Wei, Y. Zhou, P.T.R. Rajagopalan, D. Pei, *Biochemistry*, **38**, 643-650 (1999)
- [135] B.A. Bunin, *The Combinatorial Index*, Academic Press San Diego, 1998
- [136] M: Bessodes, D. Komiotis. K. Antonakis, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 579-580 (1986)
- [137] F.M.F. Chen, N.L. Benoiton, *Synthesis*, **1979**, 709-710 (1979)
- [138] B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1651-1652 (1968)
- [139] C.W. Tornøe, H. Sengeløv, M. Meldal, *J. Pept. Sci.*, **6**, 314-320 (1999)
- [140] E. Bayer, W. Rapp, *Chemistry of Peptides and Proteins*, **3**, De Gruyter, Berlin, 1986
- [141] R. Wyatt, L.W. Stanton, K.B. Marcu, R.C. Gallo et al, *Nature*, **303**, 725-728 (1983)
- [142] D.K. Watson, M.C. Psallidopoulos, K.P. Samuel, R. Dalla-Favera, T.S. Papas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3642-3645 (1983)
- [143] J.A. Ostrem, F. Al-Obeidi, P. Safar, A. Safarova et al., *Biochemistry*, **37**, 1053-1059 (1998)
- [144] D.S. Thorpe, H. Yeoman, A.W.E. Chan, V. Krchňák et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 537-541 (2000)
- [145] S. West, J. Schröder, W. Kunz, *Anal. Biochem.*, **190**, 254-258 (1990)
- [146] C.A. Janeway, P. Travers, *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin , 1997
- [147] W. Härtig, G. Brückner, K. Brauer, G. Seeger, V. Bigl, *J. Neurosci. Meth.*, **67**, 89-95 (1996)
- [148] N. Panchuk-Voloshina, R.P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M.K. Bhalgat et al., **47**, 1179-1189 (1999)
- [149] I.C. Waizenegger, S. Hauf, A. Meinke, J.-M. Peters, *Cell*, **103**, 399-410 (2000)
- [150] U. Dietrich, *persönliche Mitteilung* (2000)
- [151] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Abbreviations and Symbols for Description of the Conformation of Polypeptide Chains, Tentative Rules (1969), *Biochemistry*, **9**, 3471-3479 (1970)
- [152] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides, Recommendations (1971), *J. Biol. Chem.*, **247**, 977-983 (1972)
- [153] IUPAC-IUB Joint Commission for Biochemical Nomenclature, Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides, Recommendations (1983), *Eur. J. Biochem*, **138**, 9-37 (1984)

## Lebenslauf

Christian Hoffmann

\* 23.11.1973 in Frankfurt am Main

ledig

1980 - 1984	Grundschule Liederbach am Taunus
1984 - 1990	Leibniz-Gymnasium FFM-Höchst
1990 - 1993	Friedrich-Dessauer-Gymnasium FFM-Höchst
1993	Abitur, Gesamtnote: 2.1
1993 - 1998	Studium der Chemie (Diplom) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Nebenfach: Pharmakologie
1995	Diplom-Vorexamen; Gesamtnote „Sehr Gut“
08/1997 - 03/1998	Diplom-Hauptexamen / Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Griesinger: „Synthese und NMR-spektroskopische Untersuchung von Peptiden der V3-Schleife des Hüllproteins gp120 aus HIV-1“; Gesamtnote „Sehr Gut“
04/1998 - 11/2001	Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Griesinger: „Ein kombinatorisches Verfahren zur Charakterisierung verschiedener Subtypen von HIV-1 anhand ihrer Seroreaktivität“

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H. Bock, Prof. Dr. B. Brutschy, Prof. Dr. F.J. Comes, Prof. Dr. E. Egert, Prof. Dr. J.W. Engels, Prof. Dr. Á. Furka, Prof. Dr. K.-H. Gericke, Prof. Dr. S. Glaser, Prof. Dr. M. Göbel, Prof. Dr. C. Griesinger, Prof. Dr. W. Grill, Prof. Dr. K. Hensen, Prof. Dr. M. Karas, Prof. Dr. G. Kohlmaier, Prof. Dr. B. Kolbesen, Prof. Dr. G. Lambrecht, Prof. Dr. W. Martiensen, Prof. Dr. R.B. Merrifield, Prof. Dr. J. Mulzer, Prof. Dr. E. Mutschler, Prof. Dr. G. Quinkert, Prof. Dr. M. Reggelin, Prof. Dr. D. Rehm, Prof. Dr. E.A. Reinsch, Prof. Dr. G. Schmalzing, Prof. Dr. R. Schlögl, Prof. Dr. F. Schüth, Prof. Dr. H. Schwalbe, Prof. Dr. N. Sewald, Prof. Dr. H. Ströbele, Prof. Dr. M. Trömel, Prof. Dr. S. Zolla-Pazner.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Frankfurt am Main, .....

.....

(Christian Hoffmann)