



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 178 T2 2004.06.17**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 723 554 B1**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C07K 7/64**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 178.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/11620**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 930 755.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/010535**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.10.1994**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **20.04.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.07.1996**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **24.09.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.06.2004**

(30) Unionspriorität:

<b>138502</b>	<b>14.10.1993</b>	<b>US</b>
<b>320922</b>	<b>11.10.1994</b>	<b>US</b>

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,  
MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

**The Scripps Research Institute, La Jolla, Calif., US**

(72) Erfinder:

**GHADIRI, Reza M., Del Mar, US**

(74) Vertreter:

**Zenz, Helber, Hosbach & Partner GbR, 45128  
Essen**

(54) Bezeichnung: **ROHR BESTEHEND AUS ZYKLISCHEN PEPTIDEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Gebiet der Erfindung:

[0001] Die Erfindung betrifft cyclische Peptide und aus cyclischen Peptiden aufgebaute Molekularrohrstrukturen. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von cyclischen Peptiden mit Aminosäuresequenzen mit einem sich wiederholenden D-L-Chiralitätsmotiv, die zum Aufbauen sich selbstzusammenfügender, d.h. sich selbst organisierender Molekularrohre verwendbar sind.

## Hintergrund:

[0002] Cyclische Peptide bilden eine große Klasse natürlicher und synthetischer Verbindungen. Natürlich vorkommende cyclische Peptide haben zahlreiche biologische Wirkungen, wie beispielsweise Antibiotika, Toxine, Hormone und Ionen-transportregler. Es ist nicht bekannt, daß natürlich vorkommende cyclische Peptide durch eine mRNA-Transkription synthetisiert werden können, d. h. die Aminosäuresequenz natürlich vorkommender cyclischer Peptide ist nicht in dem Genom des das Material erzeugenden Organismus kodiert. Statt dessen ist die Synthese von natürlich vorkommenden cyclischen Peptiden von einer Reihe von nicht-transkriptionellen Enzymen abhängig, die speziell für die Synthese dieser Produkte ausgelegt sind. Viele cyclische Peptide verwenden sowohl Amid- als auch nicht-Amidbindungen und umfassen nicht-natürliche Aminosäuren, d. h. Aminosäuren, die nicht bei der mRNA-Transkription von linearen Proteinen verwendet werden. Sowohl D- als auch L-Enantiomere von Aminosäuren sind häufig in natürlichen und synthetischen Aminosäuren vorhanden. Synthetische Analoge verschiedener natürlich vorkommender cyclischer Peptide wurden mit modifizierter biologischer Wirkung entworfen und synthetisiert.

[0003] Chemisch sind cyclische Peptide in zwei Kategorien unterteilt, d. h. homodete und heterodete Peptide. Homodete Peptide bestehen vollständig aus Aminosäureresten, die untereinander über Amidbindungen verbunden sind. Die vorliegende Anmeldung richtet sich ausschließlich auf cyclische homodete Peptide. Heterodete Peptide umfassen andere Bindungen als Amidbindungen, beispielsweise Disulfidbindungen und Esterbindungen. Depsipeptide sind eine Art von heterodeten Peptiden. Depsipeptide weisen Esterbindungen auf. Valinomycin ist ein cyclisches Depsipeptid mit einem wechselnden chiralen D-D-L-L-Motiv, das Esterbindungen im Ring aufweist. Die vorliegende Anwendung schließt speziell heterodete Peptide aus. Die Chemie sowohl homodeter als auch heterodeter cyclischer Peptide wurde ausführlich von Ovchinnikov et al. (1992), *The Proteins*, Vol. V: 307–642 besprochen.

[0004] Die FR-A-2 360 252 beschreibt bestimmte cyclische Hexapeptide.

[0005] Im *International Journal of Peptide and Proteins Research*, Ausgabe 34, Nr. 5, Mai 1989, Seiten 387–393 ist beschrieben, daß cyclische Oligopeptide Strukturen ausbilden können und einen transmembranen Ionen-transport induzieren können. In *Biochemie*, Ausgabe 71, Nr. 1, Januar 1989, Seiten 71–76 ist beschrieben, daß bestimmte cyclische Oligopeptide transmembrane Ionenporen ausbilden können. In *Helvetica Chimica Acta*, Ausgabe 70, Nr. 7, 8. Juli 1987, Seiten 1012–1016 ist die Vermutung beschrieben, daß bestimmte cyclische Oligopeptide rohrförmige Strukturen ausbilden können. In *Macromolecules*, Ausgabe 7, Nr. 1, Januar 1974, Seiten 52–58 ist die Vermutung beschrieben, daß bestimmte Polypeptidketten helikale Strukturen ausbilden können.

[0006] Es ist bereits von früher bekannt; daß Molekularrohre aus linearen Peptiden gebildet werden. Gramicidin A ist beispielsweise ein lineares Pentadecapeptid mit einem wechselnden chiralen D-L-Motiv. Bei Integration in eine Ziel-Biomembran bildet Gramicidin A eine linksgängige antiparallele Doppelstranghelix mit 5,6–6,4 Aminosäureresten pro Windung. Gramicidin hat einen durchschnittlichen Außendurchmesser von etwa 16 Å und einen durchschnittlichen Innendurchmesser von ungefähr 4,8 Å. Der innere Kanal von Gramicidin dient als ein Weg für einen passiven transmembranen Ionen-transport (siehe: Wallace, B.A. et al. (1988) *Science*, 44: 182–187; und Lang, D. (1988) *Science*, 44: 188–191).

[0007] Molekularrohre können aus anderen Materialien als Aminosäuren gebildet werden. Kohlenstoffrohre sind von Iijima (*Nature* (1991), 354: 56–58) und Ebbesen et al. (*Nature* (1992), 358, 220–222) beschrieben. Diese Kohlenstoffrohre sind aus Graphit zusammengesetzt und haben eine konzentrische, am Ende geschlossene Struktur. Anorganische Rohre finden in der Chemie eine breite Anwendung, z. B. werden mikro- und mesoporöse anorganische Feststoffe, bekannt als Zeolithe, zum Verbessern einer Vielzahl von Reaktionen verwendet. Das Gebiet von Zeolithen wird zusammenfassend von Meier et al., *Atlas of Zeolite Structure Types*, 2. Ausgabe (Butterworths, London, 1988) beschrieben.

[0008] Es wird ein Verfahren zum Zusammenfügen bzw. selbstorganisieren und Zerlegen von Molekularrohren unterschiedlicher Länge und unter Verwendung austauschbarer Untereinheiten benötigt. Es wird eine vielseitige Untereinheit zum Implementieren des oben genannten Verfahrens benötigt, d. h. eine Untereinheit, die auf eine Selbstzusammenfügung bzw. Selbstorganisation und Selbstzerlegung anspricht. Es werden homodete cyclische Peptide benötigt, die als Untereinheiten für sich selbstzusammenfügende bzw. selbstorganisieren-

de und -zerlegende Molekularrohre verwendet werden können.

### Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Die Erfindung umfaßt, wie es in den beigefügten Ansprüchen beansprucht ist, cyclische homodete Peptide, die zum Zusammenfügen und Zerlegen von Molekularrohren verwendbar sind, aus derartigen cyclischen homodeten Peptiden zusammengefügte Molekularrohre und Verfahren zum Zusammenfügen und Zerlegen derartiger Molekularrohre.

[0010] Die mit der Erfindung umfaßten cyclischen homodeten Peptide weisen eine stabile scheibenförmige Konformation auf, welche die Selbstzusammenfügung derartiger Peptide zum Ausbilden von Molekularrohren vereinfacht. Eine stabile scheibenförmige Konformation wird erzielt, indem die cyclischen Peptide mit einem sich wiederholenden D-L-Chiralitätsmotiv gestaltet werden. In Anpassung an dieses sich wiederholende Chiralitätsmotiv ist es notwendig, daß die Aminosäuresequenz der cyclischen Peptide nur eine gerade Anzahl von Aminosäureresten umfaßt. Da Glycin nicht chiral ist, ist es in Anpassung an dieses sich wiederholende Chiralitätsmotiv ferner notwendig, daß die Aminosäuresequenz des cyclischen Peptids kein Glycin enthält oder der Einschluß von Glycin minimiert ist.

[0011] Eine stabile scheibenförmige Konformation wird ferner dadurch bevorzugt, daß die Größe des cyclischen Peptids begrenzt wird, daß nämlich die Aminosäuresequenz des cyclischen Peptids insgesamt zwischen 6 und 16 Aminosäurereste umfaßt. Die Stabilität der scheibenförmigen Konformation cyclischer Peptide neigt dazu, aufgrund von Gründen der statistischen Mechanik, bei zunehmender Ringgröße zuzunehmen. Cyclische Peptide mit Ringgrößen von mehr als 16 Resten sind aufgrund der geringen Stabilität ihrer scheibenförmigen Konformation weniger bevorzugt.

[0012] Molekularrohre werden zusammengefügt, indem cyclische Peptide aufeinandergestapelt werden. Die resultierende Struktur definiert einen inneren Kanal. Der Durchmesser des inneren Kanals wird durch die Größe des cyclischen Peptides bestimmt, d. h. die Kanalgröße nimmt mit der Größe des cyclischen Peptides zu. Cyclische Peptide mit lediglich 6 Aminosäureresten weisen einen sehr kleinen Kanal auf, der lediglich für den Durchgang oder den Einschluß von kleinen Ionen geeignet ist; cyclische Peptide mit 16 Aminosäureresten weisen einen sehr großen Kanal auf, der für den Durchgang oder den Einschluß von kleinen Molekülen geeignet ist; cyclische Peptide mit 16 Aminosäureresten weisen einen sehr großen Kanal auf, der für den Durchgang oder den Einschluß von DNA oder RNA geeignet ist.

[0013] Das wechselnde D-L-Chiralitätsmotiv ist dazu gedacht, die scheibenförmige Konformation cyclischer homodeter Peptide zu stabilisieren, indem die Energie der nach außen orientierten Konformation der Aminosäureseitenkettengruppen gesenkt wird. Bei der nach außen orientierten Konformation sind Seitenkettengruppen der Aminosäurereste senkrecht zu der Achse der Scheibe in einer radial nach außen weisenden Richtung orientiert. Bei dieser Konformation orientiert eine Ausrichtung der Aminosäureseitenkettengruppen ferner die Hauptkette-Carboxylgruppen und Hauptkette-Aminowasserstoffe in einer hauptsächlich axialen Richtung. Eine Ausrichtung der Hauptkette-Carboxylgruppen und Hauptkette-Aminowasserstoffe in diese axiale Richtung prädisponiert cyclische Peptide für ein Übereinanderstapeln in einer antiparallelen Weise zum Bilden von  $\beta$ -Faltblatt-Wasserstoffbindungen.

[0014] Die Kinetik des Zusammenfügens und Zerlegens eines cyclischen Peptides zum Ausbilden von Molekularrohren kann durch die Auswahl von Aminosäureseitenkettengruppen gesteuert werden. Cyclische Peptide mit ionisierbaren Aminosäureseitenketten zeigen eine pH-Wert-abhängige Kinetik. Bei geladenen cyclischen Peptiden wurde gefunden, daß sie sich einer Rohr-Zusammenfügung widersetzen; bei neutralen cyclischen Peptiden wurde gefunden, daß sie eine Rohr-Zusammenfügung fördern. Beispielsweise wurde bei cyclischen Peptiden mit Glutaminsäure gefunden, daß sie sich bei einem sauren pH-Wert spontan zu Molekularrohren zusammenfügen, sich jedoch bei einem alkalischen pH-Wert einem Zusammenfügen zu Molekularrohren widersetzen. Bei vor-zusammengeführten Molekularrohren wurde gefunden, daß sie sich spontan zerlegen, wenn der pH-Wert von einem sauren auf einen alkalischen pH-Wert erhöht wird. Eine wohlüberlegte Wahl von Aminosäureseitenketten kann ein Packen oder eine Aggregation von Molekularrohren zum Bilden von rohrförmigen Bündeln fördern.

[0015] Vollständig oder größtenteils aus hydrophoben Aminosäureresten zusammengefügte cyclische Peptide bilden in Lipiddoppelschichten Molekularrohre. Derartige Molekularrohre können sich durch eine Membran erstrecken und einen Ionen- oder Molekülkanal durch eine derartige Membran zur Verfügung stellen. Derartige Molekularrohre können in Abhängigkeit von der Kanalgröße des Rohres zum Laden von Zellen oder Lipidvesikeln mit Ionen oder Molekülen aus dem äußeren Vesikelraum (extra-vesicular space) verwendet werden. Transmembrane Molekularrohre können auch kontrollierbar durchlässig bzw. verschließbar (gated) sein, um die Diffusion von Ionen und Molekülen durch den Kanal zu steuern.

[0016] Molekularrohre können mit ionischen oder molekularen Einschlüssen in dem Kanalraum beladen sein. Wenn derartige Rohre mit einem Arzneimittel beladen sind, können die Rohre als eine Arzneimittel-Zuführung verwendet werden. Ein Freisetzen des Arzneimittels aus den Molekularrohren kann durch Diffusion oder durch

eine Rohrzerlegung stattfinden.

[0017] Molekularrohre können ferner verwendet werden, um durch Zusammenfügung und/oder Diffusion in dem Rohrkanal das kontrollierte Wachstum von anorganischen Clustern, Halbleitern und Drähten auf atomarer Basis zu vereinfachen, um Materialien mit neuen optischen und elektronischen Eigenschaften herzustellen.

#### Kurzbeschreibung der Zeichnungen:

[0018] **Fig. 1** zeigt eine schematische Darstellung eines selbstzusammengefügt Molekularrohre. Es sind Hauptkette-Hauptkette-Wasserstoffbindungswechselwirkungen gezeigt, jedoch sind die Aminosäureseitenketten aus Gründen der Übersichtlichkeit fortgelassen. Der Innendurchmesser des Kanals ist durch die Ringgröße der cyclischen Peptiduntereinheiten bestimmt.

[0019] **Fig. 2** zeigt ein Molekularrohr mit acht cyclischen Peptiden des Typs mit jeweils acht hydrophoben Aminosäuren, beispielsweise die cyclischen Peptide 5 und 6. Das Molekularrohr durchzieht eine Lipiddoppelschicht, um einen Kanal, angedeutet durch Pfeile, durch die Lipiddoppelschicht zu bilden.

[0020] Die **Fig. 3A–3C** vergleichen die Kanalgröße von drei unterschiedlichen, zum Aufbau von transmembranen Molekularrohren verwendbaren cyclischen Peptiden. D und L bezeichnen die Chiralität der Aminosäurereste.  $R_1$  und  $R_2$  sind Seitenketten von hydrophoben Aminosäureresten wie beispielsweise Val, Leu, Ile, Phe und Trp.

[0021] **Fig. 3A** zeigt ein cyclischen Hexapetid mit einem Kanaldurchmesser von ungefähr 7 Å.

[0022] **Fig. 3B** zeigt ein cyclisches Octapetid mit einem Kanaldurchmesser von ungefähr 10 Å.

[0023] **Fig. 3C** zeigt ein cyclisches Dodecapeptid mit einem Kanaldurchmesser von ungefähr 15 Å.

[0024] **Fig. 4** zeigt eine Seitenansicht einer Kappen-Untereinheit (cap subunit), wie beispielsweise das cyclische Peptid 7, und seine Wechselwirkungen mit einer benachbarten cyclischen Peptiduntereinheit und dem umgebenden Medium.

[0025] **Fig. 5** zeigt eine schematische Darstellung eines Molekularrohres mit einem kontrollierbar durchlässigen Kanal.

[0026] **Fig. 6** zeigt eine schematische Darstellung eines bidentalen (oben) und eines tetradentalen kontrollierbar durchlässigen Kanals.

[0027] **Fig. 7** zeigt bevorzugte Liganden zur Verwendung bei dem Aufbau von ionen-kontrollierbar durchlässigen (ion-gated) Membrankanälen und deren erwartete Metallionenselektivität.

[0028] **Fig. 8** zeigt einen bezüglich eines Molekulartransports geschlossenen Membrankanal, vermittelt durch  $[M(Im)_4]^{n+}$ -Komplexbildung.

[0029] **Fig. 9A** zeigt die Struktur des cyclischen Peptides 1, d. h. ein cyclisches Peptid mit acht Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz  $\text{cyclo}[-(\text{Gln-D-Ala-Glu-D-Ala})_2-]$  (Sequenz Nr.: 1).

[0030] **Fig. 9B** zeigt ein Fragment eines Molekularrohres mit vier cyclischen Peptiden vom Typ 1.

[0031] **Fig. 10** zeigt die Struktur des cyclischen Peptides 2, d. h. ein cyclisches Peptid mit acht Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz  $\text{cyclo}[-\text{Gln-D-Ala}]_4-$  (Sequenz Nr.: 2).

[0032] **Fig. 11** zeigt die Struktur des cyclischen Peptides 3, d. h. ein cyclisches Peptid mit acht Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz  $\text{cyclo}[-(\text{Gln-D-Leu})_4-]$  (Sequenz Nr.: 3).

[0033] **Fig. 12** zeigt die Struktur des cyclischen Peptides 4, d. h. eines cyclischen Peptid mit acht Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz  $\text{cyclo}[-(\text{Gln-D-Val})_4-]$  (Sequenz Nr.: 4).

[0034] **Fig. 13** zeigt die Struktur des cyclischen Peptides 5, d. h. ein cyclisches Peptid mit acht Aminosäuren der Aminosäuresequenz  $\text{cyclo}-(\text{Phe-D-Leu})_4-$  (Sequenz Nr.: 5).

[0035] **Fig. 14** zeigt die Struktur des cyclischen Peptides 6, d. h. ein cyclisches Peptid mit acht Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz  $\text{cyclo}[-(\text{Phe-D-Ala})_4-]$  (Sequenz Nr.: 6).

[0036] **Fig. 15** zeigt die Struktur des cyclischen Peptides 7, d. h. ein cyclisches Peptid mit acht Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz  $\text{cyclo}[-(\text{Phe-N(Me)Ala})_4-]$  (Sequenz Nr.: 7). Das cyclische Peptid 7 ist ein terminales cyclisches Peptid, d. h. es kann lediglich auf einer Seite der Scheibe Wasserstoffbrücken ausbilden und beendet damit die Zusammenfügung des Molekularrohres.

[0037] **Fig. 16A** zeigt die Struktur des cyclischen Peptides 8, d. h. ein cyclisches Peptid mit 12 Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz  $\text{cyclo}[-(\text{Gln-D-Ala-Glu-D-Ala})_3-]$  (Sequenz Nr.: 8).

[0038] **Fig. 16B** zeigt ein Fragment eines Molekularrohres mit vier cyclischen Peptiden vom Typ 8.

[0039] **Fig. 17** zeigt die Bindung über Wasserstoffbrücken bei aus cyclischen Peptiden 1 aufgebauten Molekularrohren. Bei einem hohen pH-Wert benachteiligen unerwünschte elektrostatische Wechselwirkungen und eine hohe Wasserlöslichkeit intermolekulare Wechselwirkungen. Bei einem niedrigen pH-Wert begünstigen sowohl spezielle intermolekulare Hauptkette-Hauptkette- und Seitenkette-Seitenkette-Wasserstoffbindungswechselwirkungen als auch die geringe Wasserlöslichkeit der Peptidmonomere die Bildung von Molekularrohrgefügen.

[0040] Die **Fig. 18A–18E** sind mikroskopische Elektronenspektroskopie- und Elektronenbeugungsbilder von cyclischen Peptidrohren.

- [0041] **Fig. 18A** ist ein Bild mit geringer Vergrößerung einer Suspension von an einem Kohlenstoffträgerfilm adsorbierten cyclischen Peptidrohrpartikeln, d. h. Rohraggagaten (Maßstabsbalken = 1 Mikrometer).
- [0042] **Fig. 18B** ist ein Low-Dose-Bild eines gefrorenen hydratisierten einzelnen Partikels cyclischer Peptidrohre. Die Partikelabmessungen betragen ca.  $86 \times 1180$  nm.
- [0043] **Fig. 18C** ist ein vergrößertes Bild des umrandeten Bereiches in **Fig. 18B**, das Längsstreifungen mit einer Auflösung von ungefähr  $10 \text{ \AA}$  zeigt.
- [0044] **Fig. 18D** ist eine Längsstreifungen von  $14,9 \text{ \AA}$  zeigende Bildkontrastverstärkung von **Fig. 18C**, wobei die Längsstreifungen eine Seite-an-Seite-Packung von cyclischen Peptidrohren in dem Partikel darstellen (Maßstabsbalken =  $10 \text{ nm}$ ).
- [0045] **Fig. 18E** zeigt ein Elektronenbeugungsmuster, das an einem einzelnen Partikel cyclischer Peptidrohre aufgenommen wurde und Ordnungen eines meridionalen Abstandes von  $14,92 \text{ \AA}$  und eines axialen Abstandes von  $4,73 \text{ \AA}$  zeigt. Axial erstreckt sich das Bild schwach bis zu der dritten Ordnung ( $1,57 \text{ \AA}$ , Daten nicht gezeigt) und zeigt, daß die Partikel hochgeordnet und kristallin sind.
- [0046] Die **Fig. 19A–19C** zeigen Infrarotspektren des Amid-I-Bereiches (bei einer Auflösung von  $8 \text{ cm}^{-1}$ ).
- [0047] **Fig. 19A** zeigt Infrarotspektren einer monomeren Peptiduntereinheit in  $\text{D}_2\text{O}$  ( $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $\text{pD}=10$ , untersucht bei gedämpfter Totalreflexion (attenuated total reflectance)).
- [0048] **Fig. 19B** zeigt das Infrarotspektrum von Partikeln von zusammengefügten cyclischen Peptidrohren (KBr-Pressling).
- [0049] **Fig. 19C** zeigt das FT-IR-Spektrum des N-H-Streckbereichs von Partikeln von cyclischen Peptidrohren (KBr-Pressling). Die Komponentenpeaks werden durch Entfaltung des Ursprungsspektrums mit der Einzelkomponente, gemischten Lorentz- und Gaußfunktionen unter Verwendung eines iterativen, linearen Kleinst-Quadrat-Algorithmus ("FIT", Galactic Industries Corporation) erhalten.
- [0050] Die **Fig. 20A** und **Fig. 20B** zeigen ein dreidimensionales Modell der selbstzusammengefügten organischen Nanorohre, die sich bei kontrollierter Ansäuerung von cyclo[-(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)<sub>2</sub>-] (Sequenz Nr.: 1) als stabförmige Kristalle ausbilden, wie es in den **Fig. 18A** und **18B** gezeigt ist. Eine Ansicht der Kristallpackung entlang der a-Achse ist in der **Fig. 20A** gezeigt. In der **Fig. 20B** ist eine Ansicht der Kristallpackung entlang der c-Achse (unten) gezeigt. Die Elementarzelle ist durch die durchgezogenen Linien und die lokale zweizählige Achse mit dem Sternchen gekennzeichnet. Die Elementarzelle hat die Maße  $a=9,5 \text{ \AA}$ ,  $b=c=15,1 \text{ \AA}$  und  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta=\gamma=99^\circ$ . Die Achse des Rohres verläuft entlang a (x).
- [0051] Die **Fig. 21A** und **20B** zeigen ein dreidimensionales Modell der selbstzusammengefügten Nanorohre, die durch kontrollierte Ansäuerung von cyclo[-(Gln-D-Ala-Glu D-Ala)<sub>3</sub>-] (Sequenz Nr.: 8) als stabförmige Kristalle gebildet werden, wie es in der **Fig. 23** gezeigt ist. In der **Fig. 21A** ist eine Ansicht der Kristallpackung entlang der a-Achse gezeigt (aus Gründen der Übersichtlichkeit ist jedes Nanorohr lediglich durch das lokale zweizählige Dimer dargestellt). In **Fig. 21B** ist eine Ansicht der Kristallpackung entlang der c-Achse gezeigt. Die Elementarzelle ist durch die gestrichelten Linien und die lokale zweizählige Achse mit dem Sternchen gekennzeichnet. Die Elementarzelle hat die Maße  $a=9,6 \text{ \AA}$ ,  $b=c=25,66 \text{ \AA}$  und  $\alpha=120^\circ$ ,  $\beta=\gamma=99^\circ$ . Die Positionen der Seitenketten sind in diesem Modell willkürlich. Die Achse des Rohres verläuft entlang a (x).
- [0052] Die **Fig. 22** zeigt eine schematische Darstellung der bei dem Aufbau von selbstzusammengefügten Nanorohre gemäß **Fig. 21** verwendeten Strategie. Bei geeigneten Bedingungen stapeln sich entsprechend aufgebaute cyclische Peptiduntereinheiten und bilden über Wasserstoffbrücken gebundene rohrförmige Strukturen (aus Gründen der Übersichtlichkeit ist lediglich die Hauptkettenstruktur dargestellt). Die Ringgröße der Untereinheit stellt den Innendurchmesser des rohrförmigen Gefüges ein. Die chemische Struktur der Untereinheit ist oben rechts gezeigt (D oder L bezieht sich auf die Aminosäurechiralität).
- [0053] Die **Fig. 23A–23B** zeigt links eine Elektronenmikroskopaufnahme mit geringer Vergrößerung von auf einem Kohlenstoffträgerfilm adsorbierten Nanorohrsuspensionen gemäß **Fig. 21** (Maßstabsbalken =  $1 \text{ \mu m}$ ) und rechts ein Low-Dose-Bild eines gefrorenen hydratisierten einzelnen Nanorohrpartikels. Um ungefähr  $25 \text{ \AA}$  voneinander beabstandete Längsstreifungen sind auf die Seite-an-Seite-Packung von Nanoröhren zurückzuführen.
- [0054] Die **Fig. 24A** und **24B** zeigen Infrarotspektren einer aus cyclo[-(Trp-D-Leu)<sub>3</sub>-Gln-D-Leu-] (Sequenz Nr.: 9) gebildeten Membrankanalstruktur. **Fig. A** zeigt ein Infrarotspektrum des Amid-I-Bereiches der Membrankanalstruktur mit einer Auflösung von  $8 \text{ cm}^{-1}$ . **Fig. B** zeigt ein Infrarotspektrum des N-H-Streckbereichs der Membrankanalstruktur mit einer Auflösung von  $8 \text{ cm}^{-1}$ . IR-Proben wurden durch die Hinzufügung von einer DM-SO-Lösung des Peptids zu gereinigten Liposomen (20 bis 50 Phospholipide pro Peptiduntereinheit), gefolgt von einer Gelfiltration auf einer Sephadex G-25-Säule hergestellt (für das zum Herstellen der Liposomen verwendete Verfahren siehe Legende von **Fig. 3**). Die Liposomen wurden anschließend auf eine  $\text{CaF}_2$ -Scheibe aufgebracht und 30 Minuten im Vakuum getrocknet. Charakteristische Absorptionen aufgrund des Peptidkanalgefüges sind in der Figur gekennzeichnet.
- [0055] **Fig. 25** zeigt den der Zugabe der in **Fig. 24** gezeigten kanalbildenden Verbindungen folgenden Protonenausfluß. Der Protonenausfluß wird in Form der fraktalen Änderung der Fluoreszenz-Intensität von in einem Vesikel eingeschlossenem 5(6)-Carboxyfluorescein als eine Funktion der Zeit ausgedrückt (die Abtastzeit lag

bei Intervallen von 0,3 Sekunden). Bei jedem Experiment wurden equimolare Mengen kanalbildender Verbindungen verwendet, um direkte Vergleiche der kanalvermittelten Protonentransportaktivität zu ermöglichen. Die Menge zugegebener kanalbildender Verbindungen reichte bei jedem Experiment von 2 bis 20 nmol, entsprechend ungefähr 150 Kanäle pro Liposom bei den geringsten Konzentrationen, bis 1100 Kanäle pro Liposom bei der größten Menge zugegebener Verbindungen.

[0056] **Fig. 26** zeigt eine kontinuierliche  $K^+$ -Einzelkanalleitfähigkeitsmessung von 140 Sekunden bei 50 mV der in **Fig. 24** gezeigten kanalbildenden Verbindungen. Geöffnet-Geschlossen-Übergänge zeigen Durchlaßmechanismen (gating mechanisms), die eine strukturelle Flexibilität oder schnelles Zusammenfügen/Zerlegen der rohrförmigen Membrankanalstrukturen wiedergeben können. Bei dem geöffneten Zustand können kurze und lange Kanalhalbwertszeiten bei Werten von  $t_{(kurz)}=0,71 \pm 0,03$  ms und  $t_{(lang)}=37,14 \pm 8,99$  ms (Gesamtzahl von Ereignissen = 510) mit einer Gesamt-Geöffnet-Wahrscheinlichkeit  $P(O)$  von 0,29 erkannt werden. Bei der Subphase betrug die Peptidkonzentration  $1,0 \times 10^{-7}$  M. Wie es für alle derartigen selbstzusammenfügenden kanalbildenden Spezies erwartet wird, zeigen Halbwertszeiten offener Kanäle eine signifikante Abhängigkeit von der Peptidkonzentration. Eine Erhöhung der zugefügten Peptidkonzentration in der Subphase auf  $2,0 \times 10^{-5}$  M bedingt Halbwertszeiten offener Kanäle von >30 Sekunden.

[0057] **Fig. 27B** zeigt eine schematische, die antiparallele Ringstapelung, das Vorhandensein von ausgedehnten Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen zwischen den Untereinheiten und Seitenketten-Lipidwechselwirkungen hervorhebende Darstellung der in einer Lipiddoppelschichtmembran eingebetteten selbstzusammengefügtten rohrförmigen transmembranen Kanalstruktur (aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die meisten Seitenketten fortgelassen). Bei **Fig. 27A** ist die chemische Struktur der Peptiduntereinheit, d. h. cyclo-[Gln-(D-Leu-Trp)<sub>4</sub>-D-Leu-] (Sequenz Nr.: 9), von oben gezeigt (D- oder L- beziehen sich auf die Aminosäurechiralität).

[0058] **Fig. 28** zeigt hinsichtlich der in den **Fig. 27A–27B** gezeigten Kanalstruktur eine schematische Darstellung eines kanalvermittelten Glucosetransportes und die enzymgekoppelte, zum Überwachen der Transportaktivität verwendete Untersuchung. Eine Ausbildung einer (von) transmembranen Porenstruktur(en) initiiert den Glucoseausfluß aus dem Liposom, was durch Messen der Geschwindigkeit der NADPH-Erzeugung direkt gemessen werden kann. Die verwendeten Enzyme und Cofaktoren sind hydrophil und können somit die Lipidmembran passieren und sind zum Durchdringen der Kanalstruktur zu groß. Daher kann lediglich die freigesetzte Glucose an der enzymatischen Reaktion teilnehmen.

[0059] **Fig. 29** zeigt den der Zugabe von verschiedenen Mengen der kanalbildenden Peptide gemäß der **Fig. 27A–27B** folgenden Glucoseausfluß, wobei nicht ausgefüllte Kreise  $15,0 \times 10^{-6}$  M darstellen; ausgefüllte Kreise  $11,0 \times 10^{-6}$  M, nicht ausgefüllte Dreiecke  $7,5 \times 10^{-6}$  M; ausgefüllte Dreiecke  $5,6 \times 10^{-6}$  M und nicht ausgefüllte Rhomben  $3,8 \times 10^{-6}$  M darstellen. Der Ausfluß ist in Form der Menge freigesetzter Glucose als eine Funktion der Zeit ausgedrückt (gemessen in Intervallen von 90 Sekunden). Die bei dieser Untersuchung verwendeten großen unilaminaren Vesikel enthielten 200 mM D-Glucose. Sämtliche Kurven sind hintergrundkorrigiert, um alle Beiträge der nicht-spezifischen Glucoseausströmung aus den Liposomen zu entfernen.

#### Detaillierte Beschreibung

##### Selbstzusammengefügttes Nanorohr mit einer Pore von 7 bis 8 Å:

[0060] Es wird die Gestaltung, die Synthese und die Charakterisierung eines Molekularrohres, d. h. eines cyclischen Peptidrohres oder "organischen Nanorohres" beschrieben. Eine zweckmäßig gestaltete Peptidringstruktur mit 24 Ringgliedern kann aufgebaut werden und es kann gezeigt werden, daß diese eine protonengesteuerte Selbstzusammenfügung eingeht, um hunderte von Nanometern lange rohrförmige Strukturen mit einem inneren van-der-Waals-Durchmesser von 7 bis 8 Å zu bilden. Die Ausbildung von rohrförmigen Strukturen wird mit der Elektronenmikroskopie (EM), Elektronenbeugungsuntersuchungen und Fourier-Transformation Infrarotspektroskopie (FT-IR) festgestellt. Ein mit den experimentellen Beobachtungen übereinstimmendes dreidimensionales Modell des Molekularrohres ist ebenso gezeigt. Im Gegensatz zu den unlängst identifizierten geschlossenen konzentrischen Graphitrohren sind cyclische Peptidrohre aufgrund der cyclischen Natur ihrer Komponenten offene Strukturen und weisen eine einheitliche Form und einen einheitlichen Innendurchmesser auf, siehe beispielsweise Tsang, S.C. et al. (1993), Nature 362, 520–522 und Ajayan, P. M. et al. (1993), Nature 362, 522–525 (1993). Der hier beschriebene Prozess der protonengesteuerten Selbstzusammenfügung ist ein hoch konvergenter Vorgang, bei dem zahlreiche ringförmige Peptiduntereinheiten zum Ausbilden von Molekularrohrstrukturen über ein weitläufiges Netzwerk von Wasserstoffbindungen wechselwirken. Beispiel 1 weist ein cyclisches Peptid mit 8 Resten mit der folgenden Sequenz auf: cyclo-[D-Ala-Glu-D-Ala-Gln]<sub>2</sub>-] (Sequenz Nr.: 1). Bei dem Gestalten der Untereinheit zeigt sich, daß cyclische Peptide mit einer geraden Anzahl von sich wiederholenden D- und L-Aminosäuren eine ringförmige ebene Konformation mit geringer Energie annehmen können, bei welcher alle Hauptketten-Amidfunktionalitäten ungefähr senkrecht zu der Ebene der Struktur liegen. Bei dieser Konformation können Untereinheiten in einer

antiparallelen Weise gestapelt sein und an einer intermolekularen Hauptkette-Hauptkette-Wasserstoffbrückenbindung teilhaben, um eine durchgehende  $\beta$ -Faltblattstruktur zu schaffen. Darüber hinaus müssen Peptidseitenketten aufgrund der abwechselnden D- und L-Aminosäuresequenz an der Außenseite des Gefüges liegen, wodurch die erwünschte hohle rohrförmige Kernstruktur erzeugt wird. Bei dem vorliegenden Beispiel wird der Ionisationszustand der Glutaminsäure-Seitenkettenfunktionalität als der Steuermechanismus für die Initiierung der in wässrigen Lösungen durchgeführten Selbstzusammenfügung und Selbstzerlegung genutzt. Bei einem alkalischen pH-Wert verhindern die starken abstoßenden intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Carboxylat-Seitenketten eine Ringstapelung und begünstigen gleichzeitig die Auflösung der Peptiduntereinheit in wässrigen Medien. Bei einer Protonierung der Carboxylatanteile verschwinden jedoch nicht nur die ungünstigen intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen, sondern es werden eine Mehrzahl von anziehenden Seitenkette-Seitenkette-Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen wirksam. Ferner zeigt die Peptiduntereinheit bei einem sauren pH-Wert eine geringere Löslichkeit in wässrigen Medien. Dies trägt ferner zu einem geordneten Phasenübergang zu selbstzusammengefügten Partikeln cyclischer Peptidrohre bei. Da Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen die Haupttriebkraft bei dem Zusammenfügungsprozess sind und in Anbetracht dessen, daß die Peptiduntereinheiten lediglich in der gestapelten Konfiguration die höchstmögliche Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungsstellen ausbilden, wird somit geschlußfolgert, daß die Protonierung der Carboxylatanteile das System stark zugunsten der Selbstzusammenfügung beeinflusst.

[0061] Es wird eine kontrollierte Ansäuerung von alkalischen Peptidlösungen zum Steuern einer spontanen Selbstzusammenfügung von Peptiduntereinheiten zu stabförmigen Kristallen beschrieben, wie sie in den **Fig. 18A** und **Fig. 18B** gezeigt sind. Eine Transmissionselektronenmikroskopie zeigt, daß jeder Partikel in einem Bündel von hunderten dicht gepackter cyclischer Peptidrohre organisiert ist. Low-Dose-Kryo-Mikroskopie der Partikel zeigt, wie erwartet, Längsstreifungen mit einem Abstand von 14,9 Å entlang der Längsachse des Kristalls für den Mittelpunkt-Mittelpunkt-Abstand bei dicht gepackten cyclischen Peptidrohren, wie dies in den **Fig. 18C** und **18D** gezeigt ist. Wie es in **Fig. 18E** gezeigt ist, zeigen Elektronenbeugungsmuster eine axiale Periodizität von 4,73 Å, was zeigt, daß jedes cyclische Peptidrohr aus gestapelten Ringen mit Abständen zwischen den Untereinheiten aufgebaut ist, wobei die Abstände einer idealen antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur entsprechenden, was in **Fig. 9B** gezeigt ist, siehe beispielsweise Salemme, F. R. (1983) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 42, 52–133 und Stickle, D. F. et al. (1992), *J. Mol. Biol.* 226, 1143–1159. In Anbetracht der feinen Stabform der Kristalle – durchschnittlich 10 bis 30 Mikrometer lang bei einer Breite von 100 bis 500 Nanometer – ist es berechtigt, anzunehmen, daß Kristalle auf dem tragenden EM-Kohlenstofffilm entlang der Längsachse und entweder auf der ab- oder ac-Fläche liegen würden. Jedoch zeigen sämtliche mikroskopischen Aufnahmen und Beugungsmuster ähnliche Beugungsintensitäten und nahezu identische Gitter. Dies legt nahe, daß die a- und b-Achsen innerhalb des experimentellen Fehlers gleich groß sind. Angesichts der hochsymmetrischen Natur des Octapeptids scheint es vernünftig, daß die Ähnlichkeit der Ansichten die Symmetrie des Moleküls wiedergibt. Elektronenbeugungsmuster zeigten eine Elementarzelle mit einem meridionalen Abstand von  $14,92 \pm 0,08$  Å und einen axialen Abstand von  $4,73 \pm 0,02$  Å bei einem Winkel von  $99,2 \pm 0,5^\circ$ . Die Beugungsmuster zeigten keine Symmetrie außer dem Symmetriezentrum gemäß dem Friedel-Gesetz. Die Muster dehnten sich über 1,5 Å und gelegentlich über 1,2 Å, was anzeigt, daß die Kristalle hochgradig geordnet sind. In Anbetracht der oben genannten Beobachtungen folgt, daß das Gitter trigonal mit  $a=4,73$  Å,  $b=c=15,1$  Å,  $\alpha=90^\circ$  und  $\beta=\gamma=99^\circ$  ist. Obgleich viele Konformere bei Verwendung von sinnvollen Peptidhauptkettenwinkeln  $\phi$ ,  $\psi$  möglich sind, entspricht lediglich eines dem durch die Elementarzelle definierten Kasten, nämlich die scheibenförmige ebene Konformation, bei der sich sämtliche Seitenketten nach außen in die Ebene der Scheibe erstrecken. Andere Konformationen bilden Falten und die unregelmäßige Lage der Seitenketten und die Hauptkettenkonformation verhindern aufgrund hindernder van-der-Waals-Kontakte die Packung von Peptiduntereinheiten innerhalb von 4,7 Å. Die einzige Möglichkeit, zwei Peptide innerhalb von 4,7 Å zu packen ist die, daß die Carbonylfunktionalitäten der Hauptkette intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu den Stickstoff-Amidteilen der gegenüberliegenden Kette bilden und daß die Seitenketten in der Ebene der Peptidhauptkette angeordnet werden, um ungünstige sterische Seitenkette-Seitenkette-Wechselwirkungen zu vermeiden. Aufgrund der Verwendung von abwechselnden D- und L-Aminosäureresten bilden sich ferner die am meisten bevorzugten intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, wenn die Scheiben in einer antiparallelen Weise übereinander gestapelt werden, was eine lokale zweizählige Symmetrie begründet, wie dies in **Fig. 20** gezeigt ist. Das auf diesem Wege unter Verwendung des Programmes XtalView, beschrieben von McRee, D. E. (1992) *J. Mol. Graphics* 10, 44–46, gebildete Modell weist Elementarzellen auf, die auf den ersten Blick doppelt so groß –  $9,5 \times 15,1 \times 15,1$  – erscheinen mögen, was einen Abstand von 9,4 Å bei dem Beugungsmuster erfordern würde. Wenn Beugungsmuster jedoch berechnet werden, scheidet jedes andere Level von h aufgrund der Pseudo-Symmetrie des Dimers aus. D. h. das der umgeklappte Ring dem nicht umgeklappten Ring nahezu entspricht. Es wurden verschiedene andere Packungen ausprobiert, jedoch konnte keine erfolgreich ein dreidimensionales Gitter ohne räumliche Überlappungen ausbilden und mit dem durch die Elektronenbeugungsmuster angegebenen Abstand übereinstimmen. Es wurden ferner Zellen in Betracht gezogen, bei denen die lokale

Zweizähligkeit des Dimers kristallographisch ist, jedoch konnte dann entweder das Gitter nicht modelliert werden, oder das Beugungsmuster mußte eine Spiegelebene aufweisen, welche natürlich nicht beobachtet wird. Eine weitere Möglichkeit ist es, in Betracht zu ziehen, daß das beobachtete Beugungsmuster eine Diagonale des Gitters anstelle einer Hauptachse zeigt. Dies kann einfach ausgeschlossen werden, da dies eine wesentlich kleinere Elementarzelle erfordert. Es sollte darauf hingewiesen werden, daß das Volumen der Elementarzelle bei unserem vorgeschlagenen Modell gerade groß genug ist, das Octapeptid zu beinhalten, und sämtliche kleineren Elementarzellen können die vollständige Masse des Octapeptides physikalisch nicht aufnehmen. Daher muß das beobachtete Elektronenbeugungsmuster auf die Hauptachse zurückzuführen sein. Schließlich wurde das Kristallmodell unter Verwendung von XPLOR, einem von Brunger, A. T. et al. (1987) *Science* 235, 485 (Moleküldynamikberechnungen an dem dreidimensionalen Kristallgitter) beschriebenen Programm auf Fehlstellen geprüft. Es wurden keine Fehlstellen gefunden und die Gesamtenergie des Modells war gering. Am wichtigsten ist, daß bei Verwendung des dreidimensionalen Modells zum Berechnen von Strukturparametern die erhaltenen Muster beim Vergleich mit den Elektronenbeugungsmustern sehr günstig waren, womit die Effektivität des vorgeschlagenen Modells stark gestützt wurde.

[0062] Eine Beteiligung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerken bei der Zusammenfügung eines Rohres ergibt sich auch aus FT-IR-Spektroskopieanalysen<sup>19</sup>, **Fig. 19A–19C**. In alkalischen Lösungen zeigt die monomere Peptiduntereinheit in Übereinstimmung mit der cyclischen Struktur der Hauptkette eine Amid-I-Bande bei  $1632\text{ cm}^{-1}$ . Darüber hinaus sind die Banden bei  $1568$  und  $1670\text{ cm}^{-1}$  typische Carbonyl-Streckfrequenzen von Glutamat- bzw. Glutaminseitenkettenfunktionalitäten in Lösung. Jedoch zeigen cyclische Peptidrohre bei der Selbstzusammenfügung charakteristische Merkmale einer über Wasserstoffbrückenbindungen gebundenen  $\beta$ -Faltblattstruktur. Nicht nur das Auftreten von Amid-I-Banden bei  $1628$  und  $1688\text{ cm}^{-1}$  und der Amid-II-Bande bei  $1540\text{ cm}^{-1}$  steht im Einklang mit der erwarteten Hauptkettenstruktur, sondern auch die beobachtete NH-Streckfrequenz bei  $3277\text{ cm}^{-1}$  unterstützt die Bildung eines dichten Netzwerkes von Hauptkette-Hauptkette-Wasserstoffbrückenbindungen stark. Angesichts der starken Hauptkette-Hauptkette-Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten, ermittelt durch die oben genannten Analysen der Elektronenbeugungsmuster, ist es möglich, Krimms Korrelation zum Abschätzen des intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungsabstandes aus der beobachteten Frequenz der N-H-Streckschwingung zu verwenden, siehe beispielsweise Krimm, S. et al., in *Advances in Protein Chemistry* (Editoren Anfinsen, C. B., Edsall, J. T. und Richards, F. M.) 181–364 (Academic Press, Orlando, 1986). Die beobachtete Frequenz der NH-Streckschwingung korreliert ungefähr mit einem durchschnittlichen N-O-Abstand zwischen den Untereinheiten von  $2,85\text{ \AA}$  oder einem Abstand zwischen den Untereinheiten von  $4,71\text{ \AA}$ . Dieser Wert weist eine gute Übereinstimmung mit dem aus Elektronenbeugungsmustern erhaltenen Wert von  $4,73\text{ \AA}$  auf. Es ist bemerkenswert, daß das IR-Spektrum der cyclischen Peptidrohre ferner den für Gramicidin A – einem natürlich vorkommenden linearen Peptid aus hydrophoben Aminosäuren mit abwechselnder D- und L-Konfiguration, von dem bekannt ist, daß es dimere  $\beta$ -helikale transmembrane Ionenkanalstrukturen ausbildet – berichteten sehr ähnlich ist, siehe beispielsweise Wallace, B. A. et al. (1988), *Science* 241, 182–187 und Langs, D. A. (1988), *Science* 241, 188–191. Gramicidin A weist in Übereinstimmung mit Naik, V. M. et al. (1986), *Biophys. J.* 49, 1147–1154 Amid-I-Banden bei  $1630$ ,  $1685\text{ cm}^{-1}$ , eine Amid-II-Bande bei  $1539\text{ cm}^{-1}$  und eine NH-Streckfrequenz bei  $3285\text{ cm}^{-1}$  auf.

[0063] Zusammenfassend gesagt wird ein Beispiel einer neuen Klasse von synthetischen rohrförmigen Materialien beschrieben. Die beschriebene allgemeine Strategie soll die Gestaltung und die Synthese einer großen Auswahl von rohrförmigen Strukturen mit speziellen Innendurchmessern und Oberflächencharakteristika ermöglichen. Die Verfügbarkeit einer derartigen einfachen Strategie für die Gestaltung von offenen rohrförmigen Strukturen sollte sich zweifelsfrei für einen weiten Bereich von Anwendern eignen, siehe beispielsweise Whitesides, G. M. et al. (1991), *Science* 254, 1312–1319 und Ozin, G. A. (1992) *Adv. Mater.* 4, 612–649. Derartige rohrförmige Materialien können gestaltet werden, um biologische Kanäle und biologische Porenstrukturen nachzuahmen, können zum Untersuchen physikalischer und chemikalischer Eigenschaften von eingeschlossenen Molekülen verwendet werden, zum Steuern des Wachstums und der Eigenschaft von anorganischen und metallischen Clustern oder zum Gestalten neuer optischer und elektronischer Einrichtungen.

#### Verwendung eines Nanorohres als Träger:

[0064] Die in Beispiel 1 beschriebenen cyclischen Peptidrohre können in der Gegenwart von Wasserstoffperoxid zusammengefügt werden. Nach der Zusammenfügung des Rohres und der Partikelbildung wird die Mischung zentrifugiert, um die Partikel zu pelletisieren. Die pelletisierten Partikel werden bei einem weiteren Zentrifugierungsschritt gewaschen und anschließend mit den Reagenzien eines zum Testen auf das Vorhandensein von Wasserstoffperoxid gestalteten Biolumineszenz-Assays kombiniert. Es wird beobachtet, daß die Biolumineszenz auf die pelletierten Fraktion beschränkt ist. Dies zeigt, daß die cyclischen Peptidrohre Wasserstoffperoxid in ihrem Kanalbereich einschließen können, daß aber das Wasserstoffperoxid langsam durch Diffusion aus einem derartigen Kanalbereich in die umgebenden Medien ausfließt.

## Selbstzusammengefügtes Nanorohr mit einer Pore von 13 Å:

[0065] Die Porengröße von selbstzusammengefügten organischen Nanoröhren kann mittels der Ringgröße der verwendeten Peptiduntereinheit einfach eingestellt werden. Der Innendurchmesser der Nanorohrgefüge kann genau gesteuert werden, indem einfach die Ringgröße der verwendeten Peptiduntereinheit eingestellt wird. Es wurde eine cyclische Peptidstruktur mit 12 Resten, d. h. die cyclische Peptiduntereinheit mit 36 Ringgliedern  $\text{cyclo}[-(\text{Gln-D-Ala-Glu-D-Ala})_3-]$  (Sequenz Nr.: 8), gestaltet und es wurde gezeigt, daß diese einen protoneninduzierten Selbstzusammenfügungsprozess eingeht, um hoch geordnete rohrförmige Nanoobjekte mit einem gleichförmigen inneren van-der-Waals-Durchmesser von 13 Å zu erzeugen. Diese Nanoröhre wurden durch IR-Spektroskopie, Low-Dose-Elektronenmikroskopie und die Analyse von Elektronenbeugungsmustern charakterisiert. Es wird angenommen, daß die Fähigkeit, rohrförmige Nanostrukturen mit spezieller Größe gestalten zu können, wichtige Anwendungen bei Katalysen, der Einschlußchemie und der molekularen Elektronik finden wird. Die Ausbildung von rohrförmigen Strukturen wird durch die hochauflösende Abbildung unter Verwendung der Kryo-Elektronenmikroskopie, der Elektronenbeugung, der Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie und dem Molecular Modeling unterstützt.

[0066] Gemäß den beschriebenen Gestaltungsprinzipien können cyclische Peptidstrukturen, die aus einer geraden Anzahl von sich wiederholenden bzw. wechselnden D- und L-Aminosäureresten aufgebaut sind, eine ebene ringförmige Konformation annehmen, bei welcher sämtliche Hauptkette-Amidfunktionalitäten ungefähr senkrecht zu der Ebene der Ringstruktur liegen. Bei dieser Konformation können die Peptiduntereinheiten unter bevorzugten Bedingungen zum Bereitstellen einer durchgehenden, mit Wasserstoffbrückenbindungen verbundenen hohlen rohrförmigen Struktur gestapelt werden (**Fig. 22**). Der Innendurchmesser des Nanorohrgefüges kann im Prinzip nach Maß gestaltet werden, indem die Ringgröße der verwendeten Peptiduntereinheiten eingestellt wird. Bei dieser Untersuchung wird die peptidbasierte Nanorohrstruktur mit dem größten bis jetzt unter Verwendung der folgenden Ringpeptiduntereinheit mit 36 Ringgliedern  $\text{cyclo}[(\text{Gln-D-Ala-Glu-D-Ala})_3-]$  aufgebauten Porendurchmesser beschrieben. Die bei dieser Untersuchung verwendeten Gestaltungsprinzipien und die Selbstzusammenfügungsstrategie sind der zuvor beschriebenen ähnlich<sup>1</sup>. Die erforderliche Peptiduntereinheit wurde gemäß dem Verfahren von P. Rovero et al. (Tetrahedron Lett., (1991), Ausgabe 32, Seiten 2639–2642) auf einem Feststoffträger synthetisiert und durch Massenspektroskopie und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Eine kontrollierte Ansäuerung von alkalischen Lösungen der Peptiduntereinheit lieferte beim Stehenlassen stabförmiges kristallines Material, wie es oben angegeben ist. Die Transmissionselektronenmikroskopie zeigte, daß jeder Partikel ein organisiertes Bündel von dicht gepackten Nanoröhren ist (**Fig. 23A–23B**). Low-Dose-Kryo-Mikroskopie gemäß dem Verfahren von M. Adrian et al. (Nature (1984), Ausgabe 308, Seiten 32–36) und R.A. Milligan et al. (Ultramicroscopy (1984), Ausgabe 13, Seiten 1–10) zeigte Längsstreifungen mit einem Abstand von ungefähr 25 Å, wie es für den Mittelpunkt-Mittelpunkt-Abstand bei dicht gepackten Nanoröhren erwartet wird (**Fig. 23A–23B**). Elektronenbeugungsmuster zeigen axiale Abstände von 4,80 Å, was mit der Peptidstapelung und der Bildung eines dichten Netzwerkes von mit Wasserstoffbrückenbindungen verbundenen Strukturen vom Typ  $\beta$ -Faltblatt übereinstimmt. Der Meridionalabstand bei den Elektronenbeugungsmustern zeigt einen Abstand von  $12,67 \pm 0,06$  Å und  $21,94 \pm 0,05$  Å, was charakteristisch für eine hexagonale raumzentrierte Packung von Nanoröhren ist. Ein aus der dichten Packung von Zylindern mit einem Radius  $r$  resultierendes hexagonales Gitter zeigt die beiden charakteristischen Hauptebenen des Gitters mit einem Radius  $r$  und  $r$ , entsprechend den hier beobachteten ( $r=12,67$  Å und  $r=21,94$  Å). Die Periodizität bei dieser Packung erzeugt Beugungspunkte bei  $1/r$ ,  $2/r$  und so weiter, und bei  $1/r$  und  $2/r$  und so weiter. Die beobachteten Elektronenbeugungsmuster auf den Meridionalachsen erstrecken sich bis zu Reflexionen dritter Ordnung (4,1 Å), was den geordneten und kristallinen Zustand der Nanorohrpartikel andeutet. Die Beugungsmuster zeigten ferner eine Elementarzelle mit einem Winkel von 99° und keiner anderen Symmetrie als dem Symmetriezentrum nach Fiedels Gesetz.

[0067] Ein dreidimensionales Modell der Nanorohrstruktur wurde unter Verwendung der aus den Elektronenbeugungsmustern erhaltenen Parametern gebildet – Elementarzelle mit  $a=9,6$  Å ( $2 \times 4,80$  Å bei dem antiparallelen Dimer),  $b=c=25,66$  Å ( $2 \times 12,67 + \text{Cos}9$ ),  $\alpha=120^\circ$  und  $\beta=\gamma=99^\circ$ . Das Modell zeigte Strukturfaktoren, die den bei der Elektronenbeugung beobachteten Mustern ähnlich sind, womit das vorgeschlagene dreidimensionale Modell unterstützt wird. Eine Beteiligung eines intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes bei der Rohrzusammenfügung wird auch durch eine FT-IR-Spektroskopieanalyse gemäß dem Verfahren von S. Krimm et al. (Advances in Protein Chemistry; Anfinsen, C. B., Edsall, J. T.; Richards, F. M. Eds.; Academic Press: Orlando, 1986, Seiten 181–364) gestützt. Nanoröhre zeigen charakteristische IR-Merkmale einer  $\beta$ -Faltblattstruktur, was nicht nur durch die Amid-I-Banden bei  $1626 \text{ cm}^{-1}$  und  $1674 \text{ cm}^{-1}$  und einer Amid-II-Bande bei  $1526 \text{ cm}^{-1}$  angedeutet wird, sondern auch durch die beobachtete NH-Streckfrequenz bei  $3291 \text{ cm}^{-1}$ , was die Ausbildung eines dichten Netzwerkes von Wasserstoffbrückenbindungen stützt. Das IR-Spektrum ist dem anderer Nanoröhre sehr ähnlich und ähnelt stark dem von kristallinem Gramicidin A, von dem bekannt ist, daß es dimere  $\beta$ -helikale Strukturen ausbildet. Gramicidin A weist Amid-I-Banden bei  $1630$ ,  $1685 \text{ cm}^{-1}$ , eine Amid-II-Bande bei  $1539 \text{ cm}^{-1}$  und eine NH-Streckfrequenz bei  $3285 \text{ cm}^{-1}$  auf (V. M. Naik et al. in Biophys. J.

(1986), Ausgabe 49, Seiten 1147–1154). Die beobachtete Frequenz der NH-Streckschwingung korreliert mit einem durchschnittlichen Abstand zwischen den Untereinheiten von 4,76 Å, was in guter Übereinstimmung mit dem Wert von 4,80 Å ist, der unabhängig aus den Elektronbeugungsmustern erhalten wurde.

#### Künstliche transmembrane Ionenkanäle aus selbstzusammenfügenden Peptidnanoröhren:

[0068] Künstliche Membranionenkanäle können unter Verwendung einer selbstzusammengefügt zylindrischen  $\beta$ -Faltblatt-Peptidarchitektur aufgebaut werden. Der beschriebene Aufbau zeigt eine effiziente kanalvermittelte Ionentransportaktivität mit Geschwindigkeiten von mehr als  $10^7$  Ionen/Sekunde<sup>-1</sup>, was den Geschwindigkeiten von vielen natürlich vorkommenden Gegenstücken gleichkommt. von derartigen Molekularanordnungen wird angenommen, daß sie eine potentielle Anwendung bei der Gestaltung von neuen cytotoxischen Reagenzien, Membrantransportmitteln und Arzneimittel-Zuführungssystemen haben.

[0069] Gemäß den hier beschriebenen Gestaltungsprinzipien können cyclische Peptidstrukturen, die aus einer geraden Anzahl von sich wiederholenden D- und L-Aminosäureresten aufgebaut sind, eine ebene Ringkonformation annehmen und sich unter bevorzugten Bedingungen stapeln, um eine durchgehende hohle über Wasserstoffbrückenbindungen gebundene rohrförmige Struktur zu liefern. Daher wäre ein Gefüge aus acht bis zehn Untereinheiten, jeweils getrennt durch den erwarteten Abstand zwischen den Untereinheiten von 4,7 bis 5,0 Å und mit entsprechenden hydrophoben Oberflächenresten ausgestattet, lang genug, sich durch die Dicke von durchschnittlichen biologischen Lipidmembranen zu erstrecken (**Fig. 2**). Das cyclische Peptid mit acht Resten cyclo[-(Trp-D-Leu)<sub>3</sub>-Gln-D-Leu-] (Sequenz Nr.: 9) wurde für den vorliegenden Fall gestaltet. Es besteht, mit Ausnahme von einem L-Glutamin-Rest, der hauptsächlich zur Vereinfachung der Peptidsynthese eingeführt wurde, aus sich wiederholenden L-Tryptophan- und D-Leucin-Seitenkettenteilen. Es ist gezeigt, daß sich die Kanalstrukturen mit einer wasserhaltigen Pore mit einem Durchmesser von ungefähr 7,5 Å bei Aufnahme einer ausreichenden Konzentration des Peptidmonomers in die Lipiddoppelschichten spontan ausbilden würden. Die Triebkraft für die Selbstzusammenfügung der Kanalstruktur wird primär durch den Enthalpiebeitrag einer großen Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen zur Verfügung gestellt, die in dem Medium der Lipiddoppelschichten mit geringer Dielektrizitätskonstante bevorzugt sind, und durch die Zunahme der aus den Seitekette-Lipid-Wechselwirkungen hervorgehenden Entropie der Lipidkette (siehe D.M. Engelman et al. in *Cell* (1981), Ausgabe 23, Seiten 411–422; L.C. Allen in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1975), Ausgabe 72, Seiten 4701–4705 und D.M. Engelman in *Annu. Rev. Biophys. Chem.* (1986), Ausgabe 15, Seiten 321–353). Kurz gesagt, es ist gezeigt, daß das gestaltete ebene ringförmige cyclische Peptid nicht nur strukturell für eine intermolekulare Wechselwirkung prädisponiert ist, sondern auch energetisch für ein Selbstzusammenfügen in der Lipiddoppelschicht-Umgebung zum Ausbilden der gewünschten transmembranen Kanalstruktur bevorzugt ist. Die folgenden, eine Vielzahl von spektroskopischen Techniken, Modellsystemen für Lipidvesikel und Einzelion-Kanalaufzeichnungen verwendenden Studien stützen die Gültigkeit der weiter oben aufgestellten Hypothese.

[0070] Eine Zugabe der Peptiduntereinheit zu wässrigen Lipidsuspensionen bewirkt eine rasche Verteilung der Untereinheit in die Lipiddoppelschichten und seine spontane Selbstzusammenfügung zu ionentransportfähigen Membrankanalstrukturen. Eine Aufnahme der Peptiduntereinheit in Lipiddoppelschichten unter Verwendung großer unilaminarer Vesikel wurde mit Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen. Eine Bildung der mit Wasserstoffbrückenbindungen gebundenen transmembranen Kanalstruktur in Phosphatidylcholin-Liposomen wurde durch FT-IR-Spektroskopie gestützt (**Fig. 24**). Die beobachtete Amid-I-Bande bei 1624 cm<sup>-1</sup> ist den in anderen hier beschriebenen Nanorohrstrukturen gefundenen Carbonyl-Streckfrequenzen nicht nur ähnlich, sondern stimmt auch mit dem Infrarotspektrum von Gramicidin A in ähnlichen Lipiddoppelschichten überein (E. Navedryk et al. in *Biophys. J.* (1982), Ausgabe 38, Seiten 243–249). Darüber hinaus stützt die bei 3272 cm<sup>-1</sup> beobachtete N-H-Streckfrequenz stark die Ausbildung eines dichten Netzwerkes von Wasserstoffbrückenbindungen mit einem durchschnittlichen Abstand von 4,7 Å zwischen den Untereinheiten.

[0071] Eine Ausbildung von transmembranen Kanälen wurde ferner anhand ihrer hocheffizienten Protonentransportaktivität vermutet. Es wurden Vesikel mit einem pH-Wert von 6,5 im Inneren und 5,5 in der äußeren Gesamtlösung hergestellt. Bei der Bildung der vermeintlichen transmembranen Kanalstruktur wurde der Zusammenbruch des aufgezwungenen pH-Gradienten in diesen Vesikeln durch eine Überwachung der Fluoreszenzintensität eines eingeschlossenen pH-sensitiven Farbstoffes untersucht (V.E. Carmichael et al., in *J. Am. Chem. Soc.* (1989), Ausgabe 111, Seiten 767–769). Wie es in der **Fig. 25** gezeigt ist, bewirkt eine Zugabe des Peptides zu derartigen Vesikelsuspensionen einen raschen Zusammenbruch des pH-Gradienten. Unilaminare Vesikel wurden mit der Umkehrphasen-Verdampfung (reverse-phase evaporation) unter Verwendung von DPPC, OPPC und Cholesterol in einem Verhältnis von 1:1:2 in einer Lösung mit 5(6)-Carboxyfluorescein (20 mM in einem Phosphat/Salz-Puffer: 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=6,5) gemäß dem Verfahren von F. Szoka et al. in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978), Ausgabe 75, Seiten 4194–4198 hergestellt. Die Liposomen wurden anschließend durch mehrfache Extrusion durch Nucleopore®-Polycarbonatmembranen der Größe nach aufgeteilt (10 Mal, 50 Psi, Verwendung von 0,8 und 2×0,4 Mikrometer Fil-

ter-Stocks) und das freigesetzte 5(6)-Carboxyfluorescein wurde mit Größenausschlusschromatografie (Sephadex G-25-Säule 1×30 cm) unter Verwendung des gleichen Phosphat/Salz-Puffers gemäß dem Verfahren von F. Olson et al. in *Biochim. Biophys. Acta* (1979), Ausgabe 557, Seiten 9–23 entfernt. Die auf diesem Wege gebildeten Vesikel wiesen einen Durchmesser von ungefähr 150 Nanometern auf, wie es mit Elektronenmikroskopie ermittelt wurde (R.R.C. New, Editor, *Liposomes*, Oxford University Press, 1990). Bei jedem Versuch wurden 70 ml der Vesikel-Vorratslösung ( $3,5 \times 10^{-3}$  M an Phospholipiden) zu einem Puffer mit einem pH-Wert von 5,5 (1,3 ml, 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,4 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gegeben und in eine Quarzküvette von 1 cm in einem wärmeisolierten Rührprobenhalter des Fluoreszenzinstrumentes angeordnet und bei mäßigem Rühren 15 Minuten bei 25°C equilibriert. Durch einen Einspritzkanal wurden 25 ml der kanalbildenden Komponenten in DMSO in die Küvette gegeben, während die Fluoreszenz bei 520 nm (Anregung bei 470 nm) ständig überwacht wurde. Die erhaltenen Daten wurden anschließend zum Vergleich in die anteilige Änderung der Fluoreszenz (fractional change in fluorescence) normalisiert ( $(I_0 - I_1)/(I_0 - I_\infty)$ ) (V.E. Carmichael et al., in *J. Am. Chem. Soc.* (1989), Ausgabe 111, Seiten 767–769). Gemäß diesen Versuchen ist die scheinbare Ionentransportaktivität von cyclo[-Trp-D-Leu]<sub>3</sub>-Gln-D-Leu] ähnlich der, wenn nicht höher, von Gramicidin A und Amphotericin B (Fig. 25). Die verwendeten Lipiddoppelschichten wurden auf der Spitze von Patch-Pipetten unter Verwendung einer Mischung aus synthetischem POPE : POPS (4:1) (1-Palmitoyl-2-oleoyl-Sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin und -serin) gebildet. Fünf bis 10 ml der Peptidlösung ( $1,0 \times 10^{-7}$  oder  $2,0 \times 10^{-6}$  M in 25% DMSO in einer Pufferlösung mit 500 mM NaCl oder KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH-Wert=7,5) wurden zu einem Subphasenvolumen von 150 ml hinzugegeben, was eine spontane Verteilung des Peptids in die Membran zur Folge hatte. Nachdem das Peptid zu der Lipiddoppelschichten-Subphase zugegeben worden ist, bildeten sich spontan Ionenkanäle. In gleichartigen Lösungen von 500 mM NaCl oder KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH-Wert = 7,5 wurde bei 14 von 22 Membranen eine Ionenkanalaktivität beobachtet. Die Datenerfassung und -analyse wurde auf einem Gateway 2000/486 Computer unter Verwendung eines pClamp-Softwarepaketes und einer TL-1-Labmaster-Schnittstelle durchgeführt. Die Erfassungsrate betrug 0,1 ms und die Daten wurden mit 2 kHz gefiltert.

[0072] Kontrolluntersuchungen, nämlich die Überwachung der Freisetzung von 5(6)-Carboxyfluorescein-Farbstoff, zeigten, daß der Zusammenbruch des pH-Gradienten weder aufgrund des Zerreißens der Liposomen noch aufgrund der bei diesen Untersuchungen verwendeten geringen Menge organischen Lösungsmittels (<2% DMSO) stattfand. Ferner zeigte das Kontrollpeptid cyclo[-(Gln-D-Leu)<sub>4</sub>], welchem es an den entsprechenden Oberflächencharakteristika zum Verteilen in die Lipiddoppelschichten mangelt, aber ansonsten in der Gestaltung dem weiter oben beschriebenen kanalbildenden Peptid sehr ähnlich ist, unter ähnlichen Bedingungen keinerlei Ionentransportaktivität. Das zweite Kontrollpeptid cyclo[-(<sup>15</sup>N-D-Ala-Phe)<sub>4</sub>-], welches die erwünschten hydrophoben Oberflächencharakteristika aufweist, dem es aber an der Neigung zum Teilnehmen an einem ausgedehnten Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk mangelt, wurde ebenfalls für eine Ionentransportaktivität gestaltet und darauf getestet. Die Peptidgestaltung umfaßt eine neue N-Methylierungs-Strategie an einer Fläche der Ringstruktur, welche die Untereinheit für eine dimere zylindrische Struktur prädisponiert (Ghadiri, M.

[0073] R., Kobayashi, K., Granja, J.R., Chadha, R. und McRee, D. E. Manuskript in Vorbereitung). Ein solches dimeres zylindrisches Gefüge ist ungefähr 10 Å dick und kann sich nicht durch die Lipiddoppelschicht erstrecken. Obgleich für das Peptid gezeigt wurde, daß es sich effektiv in Lipiddoppelschichten verteilt, fördert es die Protonentransportaktivität bei den oben genannten Vesikel-Versuchen nicht. Insgesamt legen diese Versuche nahe, daß nicht nur die hydrophobe Oberflächencharakteristik des kanalbildenden Peptides ein wichtiger Faktor ist, sondern auch, daß die Peptiduntereinheit in der Lage sein muss, an ausgedehnten, durch Wasserstoffbrückenbindungen bewirkten Stapelungs-Wechselwirkungen zum Erzeugen von Kanalstrukturen teilzunehmen, die lang genug sind, um sich durch die Lipiddoppelschicht zu erstrecken.

[0074] Das gestaltete transmembrane Gefüge teilt ferner wichtige Charakteristika mit natürlichen Ionenkanalbildnern wie beispielsweise Gramicidin A und Amphotericin B. Erstens zeigt das Peptid konzentrationsabhängige Auswirkungen auf die Geschwindigkeit der Kanalbildung (Daten nicht gezeigt). Zweitens erreicht nur ein Teil der Vesikel-Population das Gleichgewicht sehr rasch, wenn geringe Konzentrationen des kanalbildenden Peptids bei den oben genannten Protonentransport-Versuchen verwendet werden. Dieses Phänomen gibt die statistische Verteilung der kanalbildenden Spezies in der Vesikel-Population an – lediglich ein Teil der Population weist genügend kanalbildende Moleküle auf, um in einem alles-oder-nichts-Prozesstyp permeable Strukturen zu bilden. Anders als "Iontträger" wie beispielsweise Monensin und Valinomycin, welche an Metallionen binden und sich zwischen der wässrigen Phase und der Lipidphase verteilen, um ein Ionengleichgewicht über die Membran einzustellen, können kanalbildende Spezies bei geringen Konzentrationen (das hier gestaltete Peptid, Amphotericin B, Gramicidin A und andere) aufgrund ihrer Unfähigkeit aus der Membran zu diffundieren, nicht in andere Vesikel eindringen und im Unterschied zu Ionophoren nicht einfach bei sämtlichen in der Lösung vorhandenen Vesikeln ein Protonen- oder Ionengleichgewicht einstellen. Daher zeigt der beobachtete schnelle Protonenausfluß bei den oben genannten Arten von Versuchen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Peptiddiffusion in die Lipiddoppelschicht und der Selbstzusammenfügung zu ionentransport-fähigen

Kanalstrukturen und zeigt nicht die tatsächliche Geschwindigkeit des kanalvermittelten Ionentransportes, die bei einer wesentlich schnelleren Zeitskala liegen kann (Vide infra).

[0075] Der beste Test zum Feststellen und quantitativen Bestimmen der Transporteffizienz einer Membrankanalstruktur ist es, ihre Einzelkanalleitfähigkeit unter Verwendung von Mikro-Patch-Clamp-Methoden zu messen (B.A. Suarez-Isla et al., *Biochemistry* (1983), Ausgabe 22, Seiten 2319–2323). Ein Beobachten einer hohen Durchsatzgeschwindigkeit von Ionen zeigt eine Ionenkanalbildung und ist ein diagnostisches Merkmal, welches Ionenkanalmechanismen von denen anderer Ionentransportmitteln wie beispielsweise Ionenträgern unterscheidet (P. Leuger, *Angew. Chem.* (1985), Ausgabe 97, Seite 939 und *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1985), Ausgabe 24, Seiten 905–923). Einzelkanalleitfähigkeiten betragen bei Verwendung von ebenen Lipiddoppelschichten mit Peptidkonzentrationen in dem Bereich von  $10^{-7}$  M in der Subphase ungefähr 55 pS (pico Siemens) in 500 mM NaCl und 65 pS in 500 mM KCl (**Fig. 26**). Die im Vergleich zu NaCl höhere Leitfähigkeit bei KCl steht im Einklang mit der erwarteten schwachen Ionenselektivität der Porenstrukturen mit 7,5 Å und zeigt die relative Beweglichkeit von  $\text{Na}^+$ - gegenüber  $\text{K}^+$ -Ionen in Lösung. Daher ist es wahrscheinlich, daß ein Kanal in NaCl mit 55 pS und ein Kanal in KCl mit 65 pS aus der gleichen Struktureinheit entsteht (gleiche Anzahl von gestapelten Ringen). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die Einzelkanalleitfähigkeit in dem gemessenen Bereich von 10–100 mV unabhängig von der angelegten Spannung ist. Die tatsächliche Geschwindigkeit des kanalvermittelten Ionentransports beträgt daher erstaunliche  $2,2 \times 10^7$  Ionen/Sekunde $^{-1}$  bei  $\text{K}^+$  und  $1,8 \times 10^7$  Ionen/Sekunde $^{-1}$  bei  $\text{Na}^+$ , was fast 3 mal größer ist als die von Gramicidin A unter ähnlichen Bedingungen (E. Bamberg et al. in *Biochim. Biophys. Acta* (1974), Ausgabe 367, Seiten 127–133).

[0076] Die hier beschriebene Strategie ermöglicht ferner die Gestaltung von transmembranen Kanalstrukturen mit größeren Porendurchmessern für eine Verwendung beim "molekularen" Transport durch Lipiddoppelschichten und als solche sollte sie ein potentielles Trägermittel für eine Arzneimittel-Zuführung in lebende Zellen zur Verfügung stellen und könnten bei Antisense- und Gentherapie-Anwendung angewendet werden.

#### Kanalvermittelter Transport von Glucose durch Lipiddoppelschichten:

[0077] Es wird die Gestaltung, die Synthese und die Charakterisierung einer künstlichen transmembranen Porenstruktur beschrieben, die einen Transport von Glucose durch Lipiddoppelschichten vermitteln kann. Die Gestaltungsstrategie basiert auf der Neigung einer neuen cyclischen Peptiduntereinheit mit 10 Resten, cyclo-[Gln-(D-Leu-Trp) $_4$ -D-Leu-] (Sequenz Nr.: 10), zur spontanen Selbstzusammenfügung in Lipiddoppelschichten zum Ausbilden von wasserhaltigen 10 Å van-der-Waals-Porenstrukturen. Molecular Modeling zeigt, daß für den Durchgang von Glucose durch den zylindrischen Hohlraum der rohrförmigen transmembranen Struktur ein innerer van-der-Waals-Durchmesser der Pore von mehr als 9 Å erforderlich ist. Daher wird für die hier gestellte Aufgabe eine Peptiduntereinheit mit 10 Resten verwendet, welche bei einer Selbstzusammenfügung ein rohrförmiges Gefüge mit einem gleichmäßigen inneren Durchmesser von 10 Å erzeugen kann (**Fig. 27A–27B**).

[0078] Die in der vorliegenden Untersuchung verwendete Peptiduntereinheit mit 10 Resten, cyclo-[Gln-(D-Leu-Trp) $_4$ -D-Leu-], wird zum größten Teil aus Tryptophan- und Leucinresten hergestellt, um seine Verteilung und Selbstzusammenfügung in Lipiddoppelschichten zu begünstigen. Sie wurde auf einem Feststoff-Träger synthetisiert und durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und Massenspektroskopie charakterisiert. Eine Zugabe der Peptiduntereinheit zu wässrigen Suspensionen großer unilaminarer Liposomen bewirkt eine schnelle Aufnahme des Peptides in die Lipiddoppelschicht. Dies wurde durch Absorptions- und Fluoreszenz-Spektralphotometrie- und Gelpermeationstudien gestützt. Die Bildung einer über Wasserstoffbrückenbindungen gebundenen transmembranen Kanalstruktur in Phosphatidylcholin-Liposomen wurde durch FT-IR-Spektroskopie nachgewiesen. Die beobachtete Amid-I-Bande bei  $1,625 \text{ cm}^{-1}$  und die N-H-Streckbande bei  $3,272 \text{ cm}^{-1}$  sind denen der zuvor charakterisierten Peptidnanoröhre<sup>2a,4</sup> ähnlich und stützen die Bildung eines dichten Netzwerkes von  $\beta$ -Faltblatt-ähnlichen, über Wasserstoffbrückenbindungen gebundenen Strukturen mit einem durchschnittlichen Abstand von 4,8 Å zwischen den Untereinheiten. Die Bildung von transmembranen Kanälen wurde ferner aus ihren bemerkenswert hohen Ionentransporteffizienzen ( $>10^7$  Ionen/Sekunde $^{-1}$ ) geschlossen, wie es durch Einzelionenkanalmessungen unter Verwendung von Micro-Patch-Clamp-Verfahren gezeigt wurde.

[0079] Die Glucosetransportaktivität wurde in isotonischen Lösungen unter Verwendung von unilaminaren Lipidvesikeln mit eingeschlossener Glucose untersucht. Unilaminare Vesikel, Durchmesser ungefähr 150 nm, wurden mit dem Umkehrphase-Verdampfungs-Verfahren unter Verwendung von 1,2-Dipalmitoyl-Sn-glycero-3-phosphatidylcholin (DPPC), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-Sn-glycero-3-phosphatidylcholin (POPO), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-Sn-glycero-3-phosphatidylserin (POPS) und Cholesterol in dem Verhältnis 1:1:0,1:1 in einer Lösung mit 50, 100, 150 oder 200 mM D-Glucose, 100 mM NaCl und 50 mM Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 gemäß dem Verfahren von F. Szoka et al. in *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1978), Ausgabe 75, Seiten 4194–4198) hergestellt. Die Liposomen wurden unter Verwendung einer Sephadex G-25 in einen isotonischen Puffer mit 50, 100, 150 oder 200 mM Sucrose, 100 mM NaCl und 50 mM Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 gel-filtriert. Die Liposomzubereitung wurde bei 4°C gelagert und innerhalb von 24 Stunden nach der Synthese ver-

wendet. Das Transportphänomen wurde gemäß dem Verfahren von S.C. Kinsky in *Methods in Enzymology*; Fleischer, S., Packer, L., Editoren; Academic Press: London, 1974; Ausgabe 32, Seiten 501–513 bei 340 nm spektralphotometrisch auf die Herstellung von NADPH unter Verwendung einer enzymgekoppelten Untersuchung überwacht. Sämtliche Versuche wurden mit einem Spectronic-3000-Spektralphotometer mit Photodioden-Array unter Verwendung von 3 ml Quarzküvetten durchgeführt, die in dem wärmeisolierten Mehrfachzellenhalter angeordnet und bei 27°C gehalten wurden. Bei einem typischen Versuch wurden die folgenden Lösungen nacheinander in die Küvetten gefüllt: 750 ml Puffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris, pH-Wert 7,5, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>), 500 ml der Enzymlösung (8 Einheiten/ml<sup>-1</sup> Hexokinase, 16 Einheiten/ml<sup>-1</sup> Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 2,5 mM ATP, 1,3 mM NADP, alle in 200 mM NaCl gelöst, 50 mM Tris mit einem pH-Wert von 7,5, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>) und 75 ml der Liposom-Vorratslösung (2,6×10<sup>-3</sup> M an Phospholipiden). In jeder Küvette wurde der Gesamtglucosegehalt mit einer Triton X-100-Behandlung bestimmt. Der Transport wurde durch die Zugabe einer entsprechenden Menge (5, 7,5, 10, 15 oder 20 ml) der Peptidlösung (1 mM in DMF) zu der Referenz- und der Probenküvette initiiert (Hexokinase wurde bei der Referenzprobe fortgelassen). Zum Messen des Hintergrundes (nicht spezifischer Glucoseausfluß aus den Liposomen) wurde die Probe auf die gleiche Weise hergestellt, außer daß entsprechende Mengen von DMF anstelle der kanalbildenden Peptide zugegeben wurden. Die Erzeugung von NADPH wurde bei 350 nm für 1,5 Stunden mit 90 Sekundenintervallen beobachtet. Aufgrund der hohen katalytischen Effizienzen der verwendeten Enzyme ist die Geschwindigkeit der NADPH-Erzeugung direkt proportional zu der Geschwindigkeit, mit welcher Glucose aus den Liposomen freigesetzt wird. Der mit der Zugabe von verschiedenen Mengen des kanalbildenden Peptides zu den Liposomen mit eingeschlossenem Glucose initiierte Transport von Glucose folgt einem Geschwindigkeitsprofil erster Ordnung mit scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten von 1,2±0,09, 0,74±0,1, 0,48±0,05 und 0,18±0,02 Mol (Glucose)/Mol (Peptid)/Minute<sup>-1</sup> bei Liposomen mit anfänglichen Glucosekonzentrationen von 200, 150, 100 bzw. 50 mM (**Fig. 29**). Die scheinbare Geschwindigkeit des Glucosetransportes ist mit aller Wahrscheinlichkeit eine grobe Unterschätzung der wirklichen Geschwindigkeit des kanalvermittelten Transportes, da lediglich ein sehr kleiner Anteil der Gesamtzahl von in der Lipiddoppelschicht aufgenommenen Peptide zu einer gegebenen Zeit in der Form von aktiven transmembranen Kanalstrukturen zusammengefügt sind. Im Gegensatz zum trägervermittelten Transport, der die Michaelis-Menten-Sättigungskinetik widerspiegeln muß, stützt die beobachtete lineare Beziehung zwischen der Transportgeschwindigkeit und der Glucosekonzentration einen einfachen transmembranen kanalvermittelten Diffusionsprozess (W.D. Stein in *Channels, Carriers, and Pumps*, Academic Press: San Diego, 1990). Kontrolluntersuchungen, d. h. Überwachung der Freisetzung von eingeschlossenem 5(6)-Carboxyfluorescein unter ähnlichen Bedingungen, wiesen nach, daß der Transport von Glucose weder aufgrund des Zerreißen der Liposomen noch aufgrund der bei diesen Untersuchungen verwendeten geringen Mengen von DMF (<2%) stattfand (siehe: N. Jayasuriya et al., in *J. Am. Chem. Soc.* (1990), Ausgabe 112, Seiten 5844–5850; und J.N. Weinstein et al. in *Science* (1977), Ausgabe 195, Seiten 489–492). Darüber hinaus zeigen weder Gramacidin A, ein bekanntes natürlich vorkommendes ionenkanalbildendes Peptid mit einem Innendurchmesser von ungefähr 4,5 Å, noch das sehr ähnliche, ionenkanalbildende Peptid cyclo[Gln-(D-Leu-Trp)<sub>3</sub>-D-Leu-], von dem hier beschrieben ist, daß es Kanäle mit einem Innendurchmesser von ungefähr 7,5 Å bildet, zeigen unter ähnlichen Prüfbedingungen irgendeine Glucosetransportaktivität. Zusammengefasst belegt dies einen gröÙenselektiven porenvermittelten Transport von Glucose.

#### Überkappte (capped) Nanoröhre:

[0080] Ein weiteres derartiges Merkmal hat mit dem Kanalüberkappen (channel capping) – dem Prozess, bei dem das selbstzusammengelagerte Molekularrohr beendet wird – zu tun. Es wird aus **Fig. 4** klar, daß die Untereinheiten an den Kanalöffnungen, d. h. bei den "cap"-Positionen, im Hinblick auf ihre Art der Wechselwirkung mit sowohl anderen Untereinheiten als auch der Mikroumgebung, in der sie sich aufhalten, einzigartig sind. Die Peptiduntereinheiten an der cap-Position nehmen an Hauptkette-Hauptkette-Wasserstoffbrückenbindungen zu lediglich einer anderen Untereinheit und mit lediglich einer Seite der Hauptkettenstruktur teil. Die cap-Untereinheiten befinden sich darüber hinaus in der amphipathischen Mikroumgebung der Lipid-Wasser-Schnittstelle.

[0081] Die strukturelle Hauptanforderung beim Erzeugen einer mehrfach ring-gestapelten rohrförmigen Struktur ist die räumliche Anordnung der Wasserstoffbindungsdonor- und -akzeptorstellen der Hauptkette an beiden Seiten der Peptidringstruktur. Wenn die cyclische Peptiduntereinheit jedoch aufgrund der Blockierung, beispielsweise Alkylierung, von Amidstickstoff-Funktionalitäten der Hauptkette einer der vorhandenen chiralen Teile frei von Wasserstoffbindungsdonoren ist, kann eine derartige cyclische Peptiduntereinheit nicht an einem ausgedehnten Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk teilhaben, kann aber zum Überkappen (to cap) einer rohrförmigen Struktur dienen.

[0082] In einer unpolaren Lösung sind derartig selektiv alkylierten cyclischen Peptide für eine Dimerisierung prädisponiert. Die Zugabe derartig selektiv alkylierter cyclischer Peptiduntereinheiten zu der zuvor erwähnten

ring-gestapelten rohrförmigen Struktur in einem entsprechenden Lösungsmittel erlaubt das Überkappen (capping) oder Beenden der ring-gestapelten rohrförmigen Strukturen mit den monomeren, selektiv alkylierten cyclischen Peptiden.

[0083] Ein derartiges bevorzugtes cyclisches Peptid ist das cyclische Peptid mit acht Resten cyclo[-(L-Phe-D<sup>Me</sup>NAla)<sub>4</sub>-], das in **Fig. 15** gezeigt ist. Der sinnvollste Weg zum Klassifizieren der verschiedenen Aminosäuren basiert auf der Polarität ihrer R-Gruppen in Wasser in der Nähe von pH-Wert 7. Es gibt 4 Hauptklassen: (1) unpolar oder hydrophob, (2) polar aber nicht geladen, (3) positiv geladen, (4) negativ geladen. Die unpolare oder hydrophobe Gruppe umfaßt Aminosäuren mit aliphatischen Gruppen wie beispielsweise Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin und Prolin, Aminosäuren mit aromatischen R-Gruppen wie beispielsweise Phenylalanin und Tryptophan und eine Aminosäure mit einer schwefelhaltigen R-Gruppe, nämlich Methionin.

[0084] Molecular Modeling läßt erkennen, daß die Methylierung von Amidstickstoff-Funktionalitäten der Hauptkette bei sämtlichen Alaninresten ausreichen würde, um eine Seite der vermeintlichen Peptidringstruktur effektiv am Teilnehmen an intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungs- und Ringstapelwechselwirkungen zu hindern. Das Peptid wurde ferner derart gestaltet, daß es eine erlaubte Symmetrie für bevorzugte intermolekulare Packungswechselwirkungen im Festkörperzustand aufweist, wodurch seine detaillierte strukturelle Charakterisierung mit Röntgen-Kristallstrukturanalysetechniken ermöglicht wird. Aminosäuren mit hydrophoben R-Gruppen wurden für dieses Beispiel gewählt, um die Untereinheit und das daraus resultierende Dimergefüge in unpolaren organischen Lösungsmitteln löslich zu machen. Die Wahl der R-Gruppe hängt jedoch in jedem Fall von den gewünschten Löslichkeitscharakteristika des Endproduktes ab.

[0085] Die lineare Form der Zielsequenz HN<sub>2</sub>-(L-Phe-D<sup>Me</sup>NAla)<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>H wurde gemäß weiter oben beschriebenen üblichen Festphase-Verfahren synthetisiert und anschließend in Lösung cyclisiert, um die gewünschte cyclische Peptiduntereinheit unter Verwendung der folgenden Prozedur zu schaffen. Eine Lösung des linearen Peptids in DMF (1 mM) wurde bei 5°C 12 Stunden mit TBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat, 3 mM), HOBt (1-Hydroxybenzotriazol, 3 mM) und DIEA (Diisopropylethylamin, 1% v/v) behandelt, um nach einer Umkehrphase-HPLC-Reinigung in 70% Ausbeute das gewünschte cyclische Peptidmonomer zu erhalten, welches anschließend zum Überkappen oder Beenden von Peptidnanoröhren verwendet werden kann.

[0086] Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der hergestellten Peptiduntereinheit in polaren Lösungsmitteln wie beispielsweise deuteriertem Methanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) zeigt aufgrund der bekannten Neigung von sekundären Amidn zu cis-trans-Isomerisierung eine Vielzahl langsam austauschender Konformationsisomere. NMR-Experimente bei variabler Temperatur in DMSO zeigen Aktivierungsbarrieren der cis-trans-Konformere in der Größenordnung von 16 bis 17 kcal·mol<sup>-1</sup>. In unpolaren Lösungsmitteln wie beispielsweise Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>) oder Deutero-Chloroform (CDCl<sub>3</sub>) liegt das Peptid jedoch in der Hauptkette in einer ebenen ringförmigen all-trans-Konformation vor, welche in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem erwarteten dimeren zylindrischen Gefüge steht. Die monomere Peptiduntereinheit zeigt ein temperaturunabhängiges (von -40 bis 55°C in CDCl<sub>3</sub>) und hochsymmetrisches <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum, was die Möglichkeit einer intermolekularen, über Wasserstoffbrückenbindungen gebundenen Konformation ausschließt. Das Überwiegen einer ebenen ringförmigen Hauptkettenkonformation wird ferner durch die beobachtete J<sub>NH-CaH</sub> Kupplungskonstante von 7,5 Hz angedeutet. Die das gestapelte Dimer erzeugenden intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen werden durch die erwartete Tieffeldverschiebung der Phenylalanin-N-H-Hauptkettenresonanz von 6, 98 zu 8, 73 ppm (J<sub>NH-CaH</sub>=8, 5 Hz) angedeutet und werden eindeutig durch die beobachteten Austausch- und NOE-Kreuzpeaks in dessen ROESY-Spektrum nachgewiesen.

[0087] Die ROESY-Untersuchungen wurden auf einem Bruker AMX-500 mit 300 ms Spinlock(Mischung)-Zeit unter Verwendung des üblichen Pulsprogrammes von Bruker durchgeführt. Die Daten wurden unter Verwendung der FELIX-Software bearbeitet. Time-Domain-Daten wurden unter Verwendung von verzerrten/verschobenen (skewed) Sine-Bell-Quadrat-Fenster-Funktionen (sine-bell. squared window functions) apodisiert. Um die entgeltliche Datengröße einer Komplex-Matrix mit 1024×1024 zu erhalten, wurde ein Zero-Filling verwendet. A. Bax, D. G. Davis, J. Magnetic Resonance 1985, 63, 207-213.

[0088] Die Bildung eines dichten, über Wasserstoffbrückenbindungen gebundenen Gefüges mit einem durchschnittlichen N-O-Abstand zwischen den Untereinheiten von 2,95 Å wird ferner durch das Auftreten einer N-H-Streckbande im Infrarotspektrum bei 3309 cm<sup>-1</sup> belegt. Wie erwartet zeigt der Prozess der Selbstzusammenfügung konzentrations- und lösungsmittelabhängige Spektren mit den Assoziationskonstanten K<sub>a</sub> (CCl<sub>4</sub>)=1, 4×10<sup>4</sup>M<sup>-1</sup> und K<sub>a</sub> (CDCl<sub>3</sub>)=1,26±0, 13×10<sup>3</sup>M<sup>-1</sup> bei 293 K.

[0089] Die aufgezeigten Assoziationskonstanten sind aufgrund des Vorhandenseins von geringen Mengen von in den Peptidproben enthaltenen Wassers die unteren Grenzen. Wenn Wasser strikt ausgeschlossen ist (4-Å-Molekularsiebe), verdoppelt sich die Assoziationskonstante K<sub>a</sub> (CDCl<sub>3</sub>)=1260 M<sup>-1</sup> ungefähr auf K<sub>a</sub>(CDCl<sub>3</sub>)=2540 M<sup>-1</sup>. Aus Gründen der Löslichkeit wurde die aufgezeigte K<sub>a</sub>(CCl<sub>4</sub>) in einer Mischung aus 84% CCl<sub>4</sub> und 16% CDCl<sub>3</sub> gemessen.

[0090] Untersuchungen bei variabler Temperatur (Auftragungen nach van't Hoff) ergaben die folgenden thermodynamischen Parameter für den Dimerisierungsprozess in Chloroform: ΔSp=-203,1 cal·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>,

$\Delta H_{298}^0 = -11.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  und  $\Delta S_{298}^0 = -23,7 \text{ e.u.}$ , was eindeutig die erwartete Enthalpieverteilung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen ( $0,5$  bis  $0,7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  für jede Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkung) als die Haupttriebkraft bei dem Prozess der Selbstzusammenfügung stützt.

[0091] Die oben genannten Untersuchungen zeigen, daß die Peptiduntereinheit eine ebene ringförmige Konformation in Lösung annimmt, welche energetisch gegenüber einer Ringstapelung und intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen in Abhängigkeit von dem verwendeten Lösungsmittel mit  $4,0$  bis  $5,6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  bevorzugt ist. Es folgt daraus, daß ein zusätzlicher Gewinn an freier Stabilisierungsenergie zu erwarten ist, wenn die Anzahl von Ringstapelungs-Wechselwirkungen erhöht wird. Dies ist insbesondere bei den selbstzusammengefügten Nanoröhren und den transmembranen Ionenkanalstrukturen, die erzeugt werden können, wichtig.

[0092] Aus den Lösungen des Peptids in wassergesättigtem Dichlormethan wurden durch Dampfphasen-Equilibration mit Hexan farblose prismatische, für Röntgenanalysen geeignete Kristalle erhalten. Die Kristallstruktur wurde der Raumgruppe I422 mit einem endgültigen R-Faktor von  $8,87\%$  zugeordnet. Die Daten wurden auf einem Rigaku AFC6R-Diffraktometer mit einer rotierenden Kupferanode ( $\text{Cu}_{\text{K}\alpha}$ ) und einem Monochromator aus hochorientiertem Graphit gesammelt. Die Struktur wurde der Raumgruppe I422 mit einem endgültigen R-Faktor von  $8,87\%$  und einem gewichteten R-Faktor von  $10,35\%$  und der Restelektronendichte von  $0,64 \text{ e}\cdot\text{\AA}^{-3}$  bei  $983$  charakteristischen Reflexionen mit  $F > 4,0 \sigma(F)$  zugeordnet. Die Parameter der Elementarzelle sind  $a=b=16,78$  und  $c=21,97 \text{ \AA}$ .

[0093] Die Festkörperstruktur ist, analog zu der aus den  $^1\text{H-NMR}$ - und FT-IR-Analysen gefolgerten Struktur in Lösung, ein zylindrisches Dimergefüge, was die zuvor berechneten Nanorohrstrukturen bekräftigt, die hauptsächlich aus der Analyse von Elektronenbeugungsmustern hergeleitet wurde. Das dimere Gefüge ist eine Kombination einer ebenen ringförmigen zylindrischen Untereinheit aus Peptiden mit Hauptkette-Amidgruppen senkrecht zu der Ebene der Ringstruktur und einer kristallographischen vierzähligen Rotationsachse parallel zu der c-Achse durch den Mittelpunkt des Peptidringes. Zwei Peptiduntereinheiten sind in einer antiparallelen Orientierung eng gestapelt und durch zweizählige Drehung entlang entweder der a- oder b-Achse ineinander überführbar. Das  $\beta$ -Faltblatt-ähnliche zylindrische Gefüge wird durch acht Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen zwischen den Untereinheiten mit einem N-O-Abstand zwischen den Untereinheiten von  $2,90 \text{ \AA}$  stabilisiert. Es ist bemerkenswert, daß der Abstand, beobachtet aus der NH-Streckbande bei  $3312 \text{ cm}^{-1}$  des FT-IR-Spektrums, von  $2,95 \text{ \AA}$  mit den kristallographischen Messungen erstaunlich übereinstimmt. Das zylindrische Gefüge weist einen ungefähren inneren van-der-Waals-Durchmesser von  $7,5 \text{ \AA}$  und ein Volumen von  $450 \text{ \AA}^3$  auf. Der rohrförmige Hohlraum ist mit zum Teil ungeordneten Wassermolekülen ausgefüllt, die die hydrophoben internen Charakteristika der Peptid-Nanorohrstrukturen begründen. Das Gefüge ist zum Erzeugen einer durchgehenden kanalisierten Übergitterstruktur entlang der c-Achse in dem Kristall raumzentriert gepackt. Die Charakteristika der Innenfläche der Kanäle wechseln ungefähr alle  $11 \text{ \AA}$  zwischen den hydrophoben Bereichen, die durch die aromatischen Phenylteile gebildet werden, und dem hydrophilen Inneren des zylindrischen Peptidgefüges. Wassermoleküle in der Nähe der hydrophoben Bereiche sind in erheblichem Maße ungeordneter, was eine lediglich schwache Restelektronendichte zeigt. Die beobachtete Wasser-Elektronendichte ist das zeitliche Mittel von Wassermolekülen, die an zahlreichen überlappenden Stellen binden, was eine einfache Bewegung von lose gehaltenen Wassermolekülen in dem Hohlraum andeutet. Diese Beobachtung, die dem Mangel einer diskreten stark bindenden Stelle bzw. von diskreten stark bindenden Stellen zuzuschreiben ist, ist ein wichtiges Merkmal der erzeugten Peptid-Nanorohrstrukturen und es wird angenommen, daß es zu den bemerkenswerten Transporteffizienten der gebildeten transmembranen Ionenkanäle beiträgt.

[0094] Die vorstehende Beschreibung und die begleitenden Beispiele sind veranschaulichend ausgeführt und sollen nicht als begrenzend aufgefaßt werden. Auch andere Variationen innerhalb des Schutzbereiches dieser Erfindung sind möglich und erschließen sich dem Fachmann ohne weiteres.

#### Kontrollierbar durchlässige (gated) Nanoröhre:

[0095] Cyclische Peptidrohre können ferner als Ionen-verschließbare Membrankanalstrukturen verwendet werden. Durch die entsprechende Wahl der Aminosäureseitenkettenteile kann man die Oberflächencharakteristika der selbstzusammengefügten cyclischen Peptidrohre nach Belieben einstellen. Zum Zwecke des Aufbaus von Membrankanalstrukturen werden cyclische Peptide derart gestaltet, daß sie hydrophobe Seitenkettenteile aufweisen, um deren Einführung und Selbstzusammenfügung in die bzw. der unpolare(n) Umgebung von Lipiddoppelschichtmembranen sicherzustellen.

[0096] In **Fig. 2** ist der Aufbau der rohrförmigen Membrankanalstruktur schematisch gezeigt. Sie besteht aus ungefähr acht Stapeln antiparalleler Peptiduntereinheiten, welche es der Kanalstruktur ermöglichen, sich durch die Dicke einer durchschnittlichen biologischen Lipidmembran zu erstrecken – gemäß unseren zuvor beschriebenen Elektronenbeugungsuntersuchungen an den selbstzusammengefügten organischen Nanoröhren wird für derartige großflächig über Wasserstoffbrückenbindungen gebundene antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Gefüge ein durchschnittlicher Abstand von  $4,8$  bis  $5,0 \text{ \AA}$  zwischen den Untereinheiten erwartet. Die Kanalstruktur kann sich

spontan beim Lösen einer ausreichenden Konzentration des Peptidmonomers in der Lipiddoppelschicht bilden. Die Triebkraft für die Selbstzusammenfügung der Kanalstruktur wird zur Verfügung gestellt durch a) die Enthalpieverteilung einer großen Anzahl von stark bevorzugten und hoch ausgerichteten Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen – jede Wasserstoffbrückenbindung in der unpolaren Membranumgebung trägt schätzungsweise  $5\text{--}6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  bei (bei einem aus acht cyclischen Peptiden bestehendem Kanal besteht das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk aus 56 stark zusammenwirkenden intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen) und b) der Zunahme der aus den Seitenkette-Lipid-Wechselwirkungen hervorgehenden Lipiddoppelschichtentropie. Diese stark bevorzugten energetischen Verteilungen kompensieren leicht den Verlust an Entropie, welcher mit der Peptid-Selbstzusammenfügung und -Selbstorganisation verbunden ist. Zieht man ferner in Betracht, daß lediglich hydrophobe Reste bei der Peptidgestaltung verwendet werden, spielt die ungünstige Hauptketten-Solvatationsenergie bei dem Zusammenfügungsprozess keine entscheidende Rolle, und zwar insbesondere darum, weil von dem hydrophilen Inneren der Kanalstruktur erwartet wird, mit einer großen Anzahl von wechselwirkenden Wassermolekülen gefüllt zu sein. Kurz gesagt sind derartige de novo-gestaltete cyclische Peptide nicht nur strukturell gegenüber einer intermolekularen Wechselwirkung prädisponiert, sondern sind ferner in der Lipiddoppelschichtumgebung energetisch gegenüber einem Selbstzusammenfügen zu künstlichen Membrankanälen begünstigt. Darüber hinaus sind, wenn benötigt, einfache Verfahren zum Verknüpfen der Untereinheiten durch Ausbilden kovalenter Seitenkette-Seitenkette-Bindungen zum Erhalten einer permanent verschmolzenen molekularen Kanalstruktur verfügbar.

[0097] Die selbstzusammengefügten Kanäle weisen zwei wichtige und einmalige, hier relevante strukturelle Eigenschaften auf. Eine Eigenschaft ist, daß die Kanalporengröße einfach gezielt eingestellt werden kann, indem eine entsprechende Ringgröße für die cyclische Peptiduntereinheit gewählt wird (**Fig. 3**). Dies ermöglicht die Gestaltung von formselektiven Membranporenstrukturen. Die zweite Eigenschaft, welche einer kurzen Erklärung bedarf, hat zu tun mit dem Kanalverschließen (channel gating) – dem Vorgang, bei welchem ein molekularer Transport durch den Kanal an- oder ausgeschaltet wird. Aus **Fig. 4** ist ersichtlich, daß die zwei Untereinheiten bei dem Kanaleingang, d. h. der "überkappten" Position ("cap" Position), im Hinblick auf ihre Art der Wechselwirkung sowohl mit den anderen Untereinheiten als auch mit der Mikroumgebung, in der sie sich aufhalten, einmalig sind. Die Peptiduntereinheiten bei der cap-Position nehmen an einer Hauptkette-Hauptkette-Wasserstoffbrückenbindung mit nur einer weiteren Untereinheit und nur mit einer Seite der Hauptkettenstruktur teil. Die überkappten Untereinheiten (cap subunits) halten sich ferner in der amphipathischen Mikroumgebung der Lipid-Wasser-Schnittstelle auf. Diese einmaligen Charakteristika können für die Gestaltung von verschließbaren Membrankanälen auf folgende Weise verwendet werden. Um eine Trennung der cap-Untereinheiten von den anderen kanalbildenden Untereinheiten sicherzustellen; kann eine Seite der Hauptkettenstruktur an einem Teilnehmen an Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen zwischen den Untereinheiten abgehalten werden, indem einfach die Amidstickstoff-Funktionalitäten der Hauptkette bei den homo-chiralen Resten alkyliert werden. Derartigen N-alkylierten Spezies mangelt es nicht nur an einer Wasserstoffbrückenbindungs-Donorfähigkeit auf einer Seite der Scheibenstruktur, sondern auch die durch die N-Alkyl-Substituenten aufgezwungene starke sterische Wechselwirkung verhindert effektiv die Teilnahme der Peptiduntereinheit an bidirektionalen Wasserstoffbrückenbindungs-Stapelungswechselwirkungen. Daher können sich derartige N-alkylierte Untereinheiten nur bei den cap-Positionen aufhalten. Darüber hinaus können Seitenketten eingeführt werden, die mit polaren Lipidkopfgruppen wechselwirken können, um deren ordnungsgemäße Positionierung bei der Lipidoberfläche sicher zu stellen. Wie es in **Fig. 5** gezeigt ist, hat die Alkylierung des Amidstickstoffes, neben der Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen zu stören, eine weitere wichtige Funktion, d. h. sie stellt eine einfache Strategie zum Gestalten verschließbarer bzw. kontrollierbar durchlässiger Membrankanäle zur Verfügung. Allgemein gesagt, es kann durch N-Alkylierung eine breite Vielzahl von bi- oder multidatanten Rezeptoren für kleine Moleküle an dem Kanaleingang eingeführt werden, wie es in **Fig. 6** gezeigt ist.

[0098] **Fig. 7** zeigt, daß dieses einfache Verankerungsmotiv mit einer Anzahl von Übergangsmetallionen-Bindungsstellen verwendet werden kann. Auf diese Weise zusammengefügte Kanalstrukturen sind bei dem Vorhandensein von Übergangsmetallionen gegenüber einem Molekulartransport aufgrund der durch die Metallion-Ligand-Wechselwirkungen bei dem Kanaleingang induzierten sterischen Hinderung blockiert (in der "abgeschaltet"-Position), wie es in **Fig. 8** gezeigt ist. Eine derartige Strategie kann auch bei der Gestaltung von hochselektiven und hochsensitiven Ionensensoren verwendet werden.

#### Verfahren:

[0099] Das Peptid kann durch das von Rovero, P. et al. (1991), Tetrahedron Lett., 32, 2639–2642 beschriebene Festphasen-Verfahren synthetisiert und durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, Elementaranalyse und Ionen-Spray-Massenspektrometrie charakterisiert werden. Obgleich eine Vielzahl von Bedingungen bei der Selbstzusammenfügung von cyclischen Peptidrohren verwendet werden kann, hat das folgende Verfahren die beständigsten Ergebnisse geliefert. Eine Suspension mit ungefähr 25 mg Peptiduntereinheit pro ml wird durch

die Zugabe von 2,5 Äquivalenten NaOH geklärt. Die resultierende Peptidlösung wurde zum Entfernen von Feststoffspuren zentrifugiert und anschließend durch die Zugabe von 1/3 Volumen einer 1% Trifluoressigsäure in Acetonitril angesäuert. Über einen Zeitraum von einer Stunde bilden sich nach und nach Partikel cyclischer Peptidrohre als eine weiße Suspension. Die cyclischen Peptidrohre werden anschließend durch eine Zentrifugierung gesammelt und wiederholt mit destilliertem Wasser gewaschen, um überschüssige Säure und Salze zu entfernen. Für Elektronenmikroskop- und Diffraktionsuntersuchungen wird eine Suspension von Partikeln cyclischer Peptidrohre kurz mit Ultraschall behandelt und kleine Tropfen werden auf glimmentladene Kohlenstoffträgerfilme auf EM-Gittern aufgebracht. Überschüssige Flüssigkeit wird durch Blotting entfernt und die Gitter werden in einem Slush mit flüssigem Ethan gefroren; gemäß dem von Adrian, M. et al., (1984) *Nature* 308, 32–36 und Milligan, R. A. et al., (1984) *Ultramicroscopy* 13, 1–10 beschriebenen Verfahren. Die Gitter wurden in einem Gatan-Kühlhalter befestigt und in einem mit 120 kV betriebenen Philips CM12 Elektronenmikroskop untersucht. Die Proben temperatur betrug während der Untersuchung und Abbildung  $-175^{\circ}\text{C}$ . Die Bilder wurden mit 35.000X unter Verwendung strenger Low-Dose-Bedingungen bei verschiedenen Defokussierungsgraden aufgezeichnet. Für die Bildanalyse werden die mikroskopischen Aufnahmen unter Verwendung eines abtastenden Mikrodensitometers von Perkin-Elmer mit gleichem Sondendurchmesser und Schrittgröße von 2,86 Å bei der Probe zu optischen Dichte-Arrays konvertiert. Unter Verwendung des von Schroeter, J. P. et al. (1992), *J. Structural Biology* 109, 235–247 beschriebenen SUPRIM-Programmpaketes wird eine Anzahl von kleinen Bereichen eines einzelnen TEM-Bildes bezüglich Drehung und Translation ausgerichtet und anschließend gemittelt.

### Syntheseverfahren

#### Synthese linearer Peptide:

[0100] Die lineare Form der Zielsequenz kann gemäß üblichen Festphase-Verfahren synthetisiert und anschließend in Lösung cyclisiert werden, um die gewünschte cyclische Peptiduntereinheit zu schaffen. Ein bevorzugtes Verfahren zum synthetisieren linearer Peptide ist wie folgt vorgesehen:

Schritt A: Der C-terminale Aminosäurerest (aa.1) des linearen Zielpeptides wird an einen PAM-Harz (Phenylacetamidomethyl) gebunden. Hydroxymethyl-PAM-Harz ist ein bevorzugter PAM-Harz. Vor der Verwendung wird dieser 4 mal in DMF gewaschen. Anschließend wird N-Boc-aa.1 (N-tert-Butoxycarbonylamino-säure) mit dem gewaschenen PAM-Harz verbunden, um ein Boc-aa.1-PAM-Harz zu bilden. Die Bindung wird durch Vereinigung des PAM-Harzes mit 4 Äquivalenten N-Boc-Aminosäure (D oder L), 3,8 Äquivalenten HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat) und 6 Äquivalenten DIEA (N,N-Diisopropylamin) in DMF erhalten. Die resultierende Mischung wird anschließend für eine Stunde geschüttelt. Wenn der C-terminale Aminosäurerest (aa.1) des linearen Zielpeptides eine potentiell reaktive Seitengruppe umfasst, wird die Seitengruppe vor der Anbindung an das PAM-Harz zuerst mit üblichen Blockierungs-Mitteln blockiert. Nachdem die Reaktion beendet ist, wird das PAM-Harz-Produkt 3 mal für 1 Minute in DMF gewaschen.

Schritt B: Da die Produktmischung eine Komponente des nicht reagierten PAM-Harzes enthält, wird das PAM-Harz anschließend verkappt, indem es mit 20 Äquivalenten Trimethylsigsäureanhydrid und 10 Äquivalenten DIEA in DMF gemischt wird und die resultierende Mischung über Nacht geschüttelt wird. Das verkappte PAM-Harz mit N-Boc-Aminosäureresten wird anschließend 3 mal in DMF und weitere 3 mal in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen.

Schritt C: Die geschützte Aminogruppe des Boc-aa.1-PAM-Harzes wird anschließend durch eine Behandlung mit gereinigtem TFA entschützt, um einen aa.1-PAM-Harz zu bilden. Schritt D: Das entschützte Boc-aa.1-PAM-Harz wird dann an den zweiten Aminosäurerest (aa.2), d. h. den Aminosäurerest, der einst von dem C-Terminus des linearen Zielpeptides entfernt wurde, gekoppelt, um ein Boc-aa.2-aa.1-PAM-Harz zu bilden. Der zweite Aminosäurerest (aa.2) weist eine Chiralität entgegengesetzt zu der Chiralität des C-terminalen Aminosäurerestes (aa.1) auf, d. h. wenn aa.1 eine D-Chiralität besitzt, besitzt aa.2 eine L-Chiralität; wenn aa.1 eine L-Chiralität besitzt, weist aa.2 eine D-Chiralität auf. Das entschützte Boc-Aminosäure-PAM-Harz aus Schritt C wird mit 4 Äquivalenten N-Boc-aa.2, 3,8 Äquivalenten HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat) und 6 Äquivalenten DIEA (N,N-Diisopropylethylamin) in DMF kombiniert. Die Reaktionsmischung wird anschließend für eine Stunde geschüttelt.

Schritt E: Die geschützte Aminogruppe des Boc-aa.2-aa.1-PAM-Harzes wird anschließend durch eine Behandlung mit gereinigtem TFA entschützt, um ein aa.2-aa.1-PAM-Harz zu erzeugen.

Schritt F: Die Schritte D und E werden dann wie benötigt wiederholt, um den dritten und nachfolgende Aminosäurereste hintereinander an die entstehende Peptidkette anzubinden, um ein Reaktionsprodukt mit der Struktur aa.n-aa(n-1)-...aa.1-PAM-Harz zu bilden. Die Chiralität der geraden Aminosäuren ist entgegengesetzt der Chiralität der ungeraden Aminosäuren.

Schritt G: Nachdem die Synthese des linearen Zielpeptides abgeschlossen ist, wird es von dem PAM-Harz abgespalten. Die Abspaltung wird durch eine einstündige Behandlung des PAM-Harzes bei  $0^{\circ}\text{C}$  mit einer 10:1:0,5

Mischung aus HF, Anisol und Dimethylsulfid erreicht. Das Abspaltungsprodukt kann anschließend mit einer wässrigen Essigsäure (50% v/v) von der Reaktionsmischung abgetrennt und lyophilisiert werden. Wenn das lineare Zielpeptid geschützte Seitengruppen umfaßt, können diese Seitengruppen zu dieser Zeit entschützt werden. Das Produkt kann anschließend mit der Massenspektroskopie verifiziert werden.

#### Synthese von selektiv N-alkylierten linearen Peptiden:

[0101] Die lineare Form von selektiv N-alkylierten Zielpeptiden kann gemäß einer Modifikation üblicher Festphasen-Verfahren zur Peptidsynthese synthetisiert werden. Die lineare Form selektiv N-alkylierter Zielpeptide wird anschließend in Lösung cyclisiert, um das gewünschte selektiv N-alkylierte cyclische Peptid zu erhalten. Das Verfahren zum Synthetisieren der linearen Form selektiv N-alkylierter Zielpeptide verwendet selektiv N-alkylierte N-Boc-Aminosäuren. Bevorzugte Verfahren zum Synthetisieren dieser N-alkylierten Aminosäuren und selektiv N-alkylierter linearer Peptide sind folgende: N-alkylierte Aminosäuren können gemäß dem Verfahren von S. T. Cheung et al. (Canadian Journal of Chemistry (1977), Ausgabe 55, Seite 906; Canadian Journal of Chemistry (1977), Ausgabe 55, Seite 911 und Canadian Journal of Chemistry (1977), Ausgabe 55, Seite 916) synthetisiert werden. Kurz gesagt werden acht Äquivalente Methyljodid bei 0°C unter Stickstoff mit Tetrahydrofuran (THF) vereinigt und zum Bilden einer Suspension gerührt. Andere Alkyljodide und Alkylbromide können als Ersatz für Methyljodid dienen. Zu dieser Suspension wurde ein Äquivalent N-Boc-aa (N-tert-Butoxycarbonylamino-säure) als Feststoff und 3 Äquivalente Natriumhydrid zugegeben. Die resultierende Mischung wurde anschließend unter Stickstoff für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 Stunden wurde überschüssiges NaH durch die vorsichtige Zugabe von H<sub>2</sub>O zu der Reaktionsmischung gequenchst. Die Mischung wurde anschließend eingeeengt und der ölige Rest wurde mit Et<sub>2</sub>O und Wasser aufgenommen. Die Et<sub>2</sub>O-Schicht wurde anschließend mit einer NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die kombinierten wässrigen Extrakte wurden anschließend mit wässriger Zitronensäure (5%) auf einen pH-Wert von 3 angesäuert. Das angesäuerte Produkt wurde anschließend in EtOAc extrahiert. Die kombinierten EtOAc-Schichten wurden nacheinander mit H<sub>2</sub>O, Natriumthiosulfat-Lösung, H<sub>2</sub>O und Salzlösung gewaschen. Das Produkt wurde anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und anschließend umkristallisiert. Eine typische Ausbeute beträgt 86%.

[0102] Selektiv N-alkylierte lineare Peptide können mit einer Modifikation des zuvor genannten Verfahrens für die Synthese von nicht-N-methylierten linearen Peptiden synthetisiert werden. N-alkylierte N-Boc-Aminosäuren sind im Hinblick auf Kupplungsreaktionen im Vergleich zu nicht-N-alkylierten N-Boc-Aminosäuren weniger reaktiv. Folglich können Kupplungsreaktionen mit N-alkylierten N-Boc-Aminosäuren weniger effizient sein. Um eine höhere Gesamtausbeute zu erzielen, ist es demgemäß oftmals sinnvoll, jeder Kupplungsreaktion eine oder mehrere Ent-Kupplungsreaktionen folgen zu lassen.

[0103] Ein selektiv N-alkyliertes Zielpeptid kann wie folgt synthetisiert werden:

Schritt A: Der C-terminale Aminosäurerest (aa.1) des linearen Zielpeptides wird an ein PAM-Harz (Phenylacetamidomethyl) gebunden. Ein bevorzugtes PAM-Harz ist Hydroxymethyl-PAM. Vor der Verwendung wird dies 4 mal in DMF gewaschen. N-Boc-aa.1 (N-tert-Butoxycarbonylamino-säure) oder eine N-alkylierte N-Boc-aa.1 wird anschließend an das gewaschene PAM-Harz gebunden, um ein Boc-aa.1-PAM-Harz zu bilden. Die Bindung wird durch eine Vereinigung des PAM-Harzes mit 4 Äquivalenten N-Boc-aa.1 (D oder L) oder N-alkyliertem N-Boc-aa.1 (D oder L), 3,8 Äquivalenten HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat) und 6 Äquivalenten DIEA (N,N-Diisopropylethylamin) in DMF erreicht. Die resultierende Mischung wird anschließend für eine Stunde geschüttelt. Wenn der C-terminale Aminosäurerest (aa.1) des linearen Zielpeptides eine potentiell reaktive Seitengruppe umfaßt, wird die Seitengruppe vor ihrer Anbindung an den PAM-Harz zuerst mit einem üblichen Blockierungsmittel blockiert. Nachdem die Reaktion beendet ist, wird das Produkt-PAM-Harz 3 mal für eine Minute in DMF gewaschen.

Schritt B: Da die Produktmischung eine Komponente des nicht reagierten PAM-Harzes enthält, wird das PAM-Harz anschließend durch Mischen mit 20 Äquivalenten Trimethylsigsäureanhydrid und 10 Äquivalenten DIEA in DMF und Schütteln der resultierenden Mischung über Nacht verkappt. Das PAM-Harz mit N-Boc-Aminosäurerest oder einer N-alkylierten N-Boc-Aminosäure wird anschließend 3 mal in DMF und weitere 3 mal in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen.

Schritt C: Die geschützte Aminogruppe des Boc-aa.1-PAM-Harzes oder N-alkylierten N-Boc-aa.1-PAM-Harzes wird anschließend durch eine Behandlung mit gereinigtem TFA entschützt, um ein aa.1-PAM-Harz bzw. ein N-alkyliertes aa.1-PAM-Harz zu erhalten.

Schritt D: Das entschützte Boc-aa.1-PAM-Harz oder N-alkylierte aa.1-PAM-Harz wird anschließend an den zweiten Aminosäurerest (aa.2 oder N-alkyl-aa.2), d.h. den Aminosäurerest, der der einmal von dem C-Terminus des linearen Zielpeptides entfernt wurde, gekoppelt, um einen Boc-aa.2-aa.1-PAM-Harz, ein Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz, ein N-alkyl-Boc-aa.2-aa.1-PAM-Harz oder ein N-alkyl-Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz zu bilden. Der zweite Aminosäurerest (aa.2) weist eine Chiralität entgegen der Chiralität des C-terminalen Aminosäurerestes (aa.1) auf, d. h. wenn aa.1 eine D-Chiralität aufweist, weist aa.2 eine L-Chiralität auf; wenn aa.1 eine L-Chiralität aufweist, weist aa.2 eine D-Chiralität auf. Das entschützte Bo-

caa.1-PAM-Harz oder N-alkyl-Boc-aa.1-PAM-Harz gemäß Schritt C wird mit 4 Äquivalenten N-Boc-aa.2 oder N-alkyl-N-Boc-aa.2, 3,8 Äquivalenten HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluorborat) und 6 Äquivalenten DIEA (N,N-Diisopropylethylamin) in DMF umgesetzt. Die Reaktionsmischung wird anschließend für eine Stunde geschüttelt. Wenn eine Kupplung mit dem N-alkyl-Boc-aa.1-PAM-Harz eintritt, kann die Effizienz der anfänglichen Kupplungsreaktion relativ gering sein. In diesem Falle kann ein Aliquot der Reaktionsmischung dann mit dem Chloranil-Test geprüft werden. Wenn der Test positiv ausfällt, wird das Reaktionsprodukt ein zweites Mal mit den oben genannten Reagenzien behandelt, um eine im wesentlichen quantitative Ausbeute an Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz oder N-alkyl-Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz zu erhalten.

Schritt E: Die geschützte Aminogruppe des Produktes gemäß Schritt D, d. h. Boc-aa.2-aa.1-PAM-Harz, Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz, N-alkyl-Boc-aa.2-aa.1-PAM-Harz oder N-alkyl-Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz wird anschließend durch eine Behandlung mit gereinigtem TFA entschützt, um aa.2-aa.1-PAM-Harz, aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz, N-alkyl-aa.2-aa.1-PAM-Harz oder N-alkyl-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz zu erhalten.

Schritt F: Die Schritte D und E werden anschließend zum Kuppeln des dritten und weiterer Aminosäurereste nacheinander an die entstehende Peptidkette wie erforderlich wiederholt, um ein selektiv N-alkyliertes lineares, an ein Harz gebundenes Zielpeptid zu bilden.

Schritt G: Nachdem die Synthese des selektiv N-alkylierten linearen Zielpeptides abgeschlossen ist, wird es von dem PAM-Harz abgespalten. Die Abspaltung wird durch eine einstündige Behandlung des PAM-Harzes bei 0°C mit einer 10:1:0,5 Mischung aus HF, Anisol und Dimethylsulfid erreicht. Das Abspaltungsprodukt kann anschließend aus der Reaktionsmischung mit einer wässrigen Essigsäure (50% v/v) entfernt und lyophilisiert werden. Wenn das selektiv N-alkylierte lineare Zielpeptid geschützte Seitengruppen umfasst, können diese Seitengruppen zu dieser Zeit entschützt werden. Das Produkt kann anschließend mit der Massenspektrometrie verifiziert werden.

Die Synthese linearer Peptid-Precursor verschließbarer bzw. kontrollierbar durchlässiger cyclischer Peptide:

[0104] Die lineare Form selektiv N-substituierter Zielpeptide kann gemäß einer Modifikation üblicher Festphasen-Verfahren zur Peptidsynthese synthetisiert werden. Verschließbare cyclische Peptide können durch Cyclisierung von im Hinblick auf ihre Peptidhauptkette-Aminogruppen selektiv N-substituierte lineare Peptide gebildet werden. Bevorzugte Substituenten zum Bilden verschließbarer cyclischer Peptide sind in **Fig. 7** gezeigt. Jeder der bevorzugten Substituenten umfasst eine über eine Alkylkette verknüpfte heterocyclische Struktur, nämlich N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Heterocyclus, wobei N ein Peptid-Aminostickstoff ist und "n" zwischen 1 und 5 liegt. Das distale Ende der Alkylkette ist an einen ausgewählten Peptid-Aminostickstoff der Peptidhauptkette gebunden. Bei dem bevorzugten Ausführungsbeispiel befinden sich sämtliche N-Substitutionen auf der gleichen Seite des cyclischen Peptides. Bevorzugte heterocyclische Strukturen umfassen Imidazol, Pyridin, 2,2':6,2''-Terpyridin und 2,2'-Bipyridin.

[0105] N-substituierte N-Boc-Aminosäuren werden zum Synthetisieren der linearen Form selektiv N-substituierter Zielpeptide verwendet. Das Verfahren von S.T. Cheung et al. (Canadian Journal of Chemistry (1977), Ausgabe 55, Seite 906; Canadian Journal of Chemistry (1977), Ausgabe 55, Seite 911 und Canadian Journal of Chemistry (1977), Ausgabe 55, Seite 916) kann zum Synthetisieren dieser N-substituierten Aminosäuren verwendet werden. Das Syntheseverfahren verwendet einen Haloalkyl-Heterocyclus als ein Substrat, d. h. X-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Heterocyclus, wobei X ein Halogen ist und "n" zwischen 1 und 5 liegt. Bevorzugte Halogene sind Brom und Iod. Bevorzugte Alkylgruppen umfassen (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, wobei n zwischen 1 und 5 liegt. Das Halogen ist an einem Ende der Alkylkette, distal in Bezug auf die Befestigung mit der Alkylkette, an dem Heterocyclus angeordnet.

[0106] Bevorzugte Haloalkyl-Heterocyclus-Substrate können wie folgt erhalten werden:

4-Bromomethyl-1-H-imidazol kann gemäß dem Verfahren von D.E. Ryono et al., Deutsches Patent DE 33 09 014 (29. September 1983), beanspruchte Priorität: US-Patentanmeldung Nr. 356941 (15. März 1982), oder gemäß dem Verfahren von W. Schunack in Arch. Pharm. (1974), Ausgabe 307(1), Seiten 46–51 synthetisiert werden.

4-(2-Bromomethyl)-1-H-imidazol kann gemäß dem Verfahren von E.T. Chen in Anal. Chem. (1993), Ausgabe 65(19), Seiten 2563–2567 synthetisiert werden.

4-(3-Bromopropyl)-1-H-imidazol kann gemäß dem Verfahren von P. Franchetti et al. in Farmaco, Ed. Sci., Ausgabe 29(4), Seiten 309–316 und gemäß dem Verfahren von W.M.P.B. Menge et al. in Journal Labelled Compd. Radiopharm. (1992), Ausgabe 31(10), Seiten 781–786 synthetisiert werden.

3-Bromomethyl-pyridin kann gemäß dem Verfahren von R. Jokela et al. in Heterocycles 1985, Ausgabe 23(7), Seiten 1707–22 synthetisiert werden.

3-(2-Bromomethyl)-pyridin kann gemäß dem Verfahren von A. Lochead et al. in der europäischen Patentanmeldung Nr. EP 320362 (14. Juni 1989) und EP 88-403079 (12. Juni 1988), beanspruchte Priorität: Französische

Patentanmeldung FR 87-17044 oder gemäß dem Verfahren von R.A.R. Bruneau et al. in der europäischen Patentanmeldung EP 284174 (28. September 1988) und EP 88-300281 (14. Januar 1988), beanspruchte Priorität: EP 87-400122 (19. Januar 1987) und EP 87-401798 (31. Juli 1987) synthetisiert werden.

3-(3-Brompropyl)-pyridin kann gemäß dem Verfahren von A.W. Van der Made et al. in Recl. Trav. Chim. Pays-Bas (1990), Ausgabe 109(11), Seiten 537–551 synthetisiert werden.

3-(4-Bromethyl)-pyridin kann gemäß dem Verfahren von J.W. Tilley et al. in Journal of Organic Chemistry (1987), Ausgabe 52(12), Seiten 2469–2474 oder gemäß dem Verfahren von U.R. Patel in dem US-Patent Nr. 4,855,430 (8. August 1989) oder gemäß dem Verfahren von M. Carson et al. in dem US-Patent Nr. 4,663,332 (5. Mai 1987) synthetisiert werden.

3-Iodmethyl-pyridin kann gemäß dem Verfahren von G.G. Abashev in dem USSR-Patent Nr. SU 1692985 A1 (23. November 1991) synthetisiert werden.

4'-(4-Brombutyl)-2,2':6,2"-Terpyridin kann gemäß dem Verfahren von J.K. Bashkin in der PCT-Anmeldung Nr. WO 9119730 A1 (26. Dezember 1991) oder WO 91-US3880 (3. Juni 1991) synthetisiert werden.

5-Brommethyl-2,2'-bipyridin kann gemäß dem Verfahren von J. Uenishi et al. in Journal of Organic Chemistry (1993), Ausgabe 58(16), Seiten 4382–4388 oder gemäß dem Verfahren von B. Imperiali et al. in Journal of Organic Chemistry (1993), Ausgabe 56(6), Seiten 1613–1616 synthetisiert werden.

[0107] Kurz gesagt werden, wie oben angedeutet, 8 Äquivalente eines haloalkyl-heterocyclischen Substrates bei 0°C unter Stickstoff mit Tetrahydrofuran (THF) kombiniert und zum Ausbilden einer Suspension gerührt. Zu dieser Suspension wird 1 Äquivalent N-Boc-aa (N-tert-Butoxycarbonylamino-säure) als Feststoff und 3 Äquivalente Natriumhydrid gegeben. Die resultierende Mischung wird anschließend bei Raumtemperatur für 24 Stunden unter Stickstoff gerührt. Nach 24 Stunden wird überschüssiges NaH durch die vorsichtige Zugabe von H<sub>2</sub>O zu der Reaktionsmischung gequenchet. Die Mischung wird anschließend eingeeengt und der ölige Rückstand wird in Et<sub>2</sub>O und Wasser aufgenommen. Die Et<sub>2</sub>O-Schicht wird anschließend mit einer NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die kombinierten wässrigen Extrakte werden anschließend mit wässriger Zitronensäure (5%) auf einen pH-Wert von 3 angesäuert. Das angesäuerte Produkt wird anschließend in EtOAc extrahiert. Die kombinierte EtOAc-Schicht wird anschließend nacheinander mit H<sub>2</sub>O, Natriumthiosulfat-Lösung, H<sub>2</sub>O und einer Salzlösung gewaschen. Das Produkt wird anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und anschließend umkristallisiert.

[0108] Selektiv N-substituierte lineare Peptide können gemäß dem weiter oben zur Verfügung gestellten Verfahren für die Synthese von N-alkylierten oder N-methylierten linearen Peptiden synthetisiert werden. Wenn ein N-Substituent sterisch anspruchsvoll ist, können die N-substituierten N-Boc-Aminosäuren aufgrund der sterischen Hinderung im Hinblick auf Kupplungsreaktionen sogar noch weniger reaktiv als N-Methyl-N-Boc-Aminosäuren sein. Folglich können Kupplungsreaktionen mit N-substituierten N-Boc-Aminosäuren langsam und relativ ineffizient sein. Demgemäß ist es oftmals sinnvoll, um zum Erzielen einer hohen Gesamtausbeute jeder Kupplungsreaktion wiederholt Entkupplungsreaktionen folgen zu lassen.

[0109] Ein selektiv N-substituiertes Zielpeptid kann wie folgt synthetisiert werden:

Schritt A: Der C-terminale Aminosäurerest (aa.1) des linearen Zielpeptides wird an ein PAM-Harz (Phenylacetamidomethyl) gebunden. Hydroxymethyl-PAM-Harz ist ein bevorzugtes PAM-Harz. Vor der Verwendung wird es 4 mal in DMF gewaschen. N-Boc-aa.1 (N-tert-Butoxycarbonylamino-säure) oder N-substituiertes N-Boc-aa.1 wird anschließend an das gewaschene PAM-Harz gebunden, um ein Boc-aa.1-PAM-Harz zu bilden. Die Bindung wird durch eine Vereinigung des PAM-Harzes mit 4 Äquivalenten N-Boc-aa.1 (D oder L) oder N-substituiertem N-Boc-aa.1 (D oder L), 3,8 Äquivalenten HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluorborat) und 6 Äquivalenten DIEA (N,N-Diisopropylethylamin) in DMF erreicht. Die resultierende Mischung wird anschließend für eine Stunde geschüttelt. Wenn der C-terminale Aminosäurerest (aa.1) des linearen Zielpeptides eine potentiell reaktive Seitengruppe umfaßt, wird die Seitengruppe vor Anknüpfung des Aminosäurerestes an das PAM-Harz zuerst mit einem üblichen Blockierungs-Mittel blockiert. Nach der Beendigung der Reaktion wird das Produkt-PAM-Harz 3 mal für eine Minute in DMF gewaschen.

Schritt B: Da die Produktmischung eine Komponente unreaktierten PAM-Harzes enthalten wird, wird das PAM-Harz anschließend durch Mischen mit 20 Äquivalenten Trimethylsigsäureanhydrid und 10 Äquivalenten DIEA in DMF verkappt und die resultierende Mischung wird über Nacht geschüttelt. Das verkappte, einen N-Boc-Aminosäurerest oder N-substituierte N-Boc-Aminosäure aufweisende PAM-Harz wird anschließend 3 mal in DMF und weitere 3 mal in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen.

Schritt C: Die geschützte Aminogruppe des Boc-aa.1-PAM-Harzes oder des N-substituierten N-Boc-aa.1-PAM-Harzes wird anschließend durch eine Behandlung mit gereinigtem TFA zum Ausbilden eines aa.1-PAM-Harzes oder N-substituierten aa.1-PAM-Harzes entschützt.

Schritt D: Das entschützte Boc-aa.1-PAM-Harz oder N-substituierte aa.1-PAM-Harz wird anschließend an den zweiten Aminosäurerest (aa.2 oder N-alkyl-aa.2), d. h. den Aminosäurerest, der einmal von dem C-Terminus des linearen Zielpeptides entfernt wurde, gekoppelt, um ein Boc-aa.2-aa.1-PAM-Harz, Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz, N-alkyl-Boc-aa.2-aa.1-PAM-Harz oder ein N-alkyl-Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz zu bilden. Der zweite Aminosäurerest (aa.2) weist eine Chiralität entgegen der Chiralität des C-terminalen Aminosäurerestes (aa.1) auf, d. h. wenn aa.1 eine D-Chiralität aufweist, weist aa.2 eine L-Chiralität auf; wenn aa.1

eine L-Chiralität aufweist, weist aa.2 eine D-Chiralität auf. Das entschützte Boc-aa.1-PAM-Harz oder das N-alkylierte Boc-aa.1-PAM-Harz gemäß Schritt C wird anschließend mit 4 Äquivalenten N-Boc-aa.2 oder N-alkyliertem N-Boc-aa.2, 3,8 Äquivalenten HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat) und 6 Äquivalenten DIEA (N,N-Diisopropylamin) in DMF vereinigt. Die Reaktionsmischung wird anschließend für eine Stunde geschüttelt. Wenn eine Kupplung mit N-alkyliertem Boc-aa.1-PAM-Harz stattfindet, kann die Effizienz der anfänglichen Kupplungsreaktion relativ gering sein. In diesem Falle wird ein Aliquot der Reaktionsmischung mit dem Chloranil-Test geprüft. Wenn der Test positiv ausfällt, wird das Reaktionsprodukt ein zweites Mal mit den oben genannten Reagenzien behandelt, um eine im wesentlichen quantitative Ausbeute an Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz oder N-alkyl-Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz zu erhalten.

Schritt E: Die geschützte Aminogruppe des Produktes gemäß Schritt D, d. h. Boc-aa.2-aa.1-PAM-Harz, Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz, N-alkyl-Boc-aa.2-aa.1-PAM-Harz, oder N-alkyl-Boc-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz wird anschließend durch eine Behandlung mit gereinigtem TFA entschützt, um ein aa.2-aa.1-PAM-Harz, aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz, N-alkyl-aa.2-aa.1-PAM-Harz oder N-alkyl-aa.2-N-alkyl-aa.1-PAM-Harz zu erzeugen.

Schritt F: Die Schritte D und E werden anschließend zum Anknüpfen des dritten und nachfolgender Aminosäurereste nacheinander an die entstehende Peptidkette so häufig wie erforderlich wiederholt, um ein selektiv N-substituiertes lineares, an das Harz gebundene Zielpeptid verknüpft.

[0110] Schritt G: Nachdem die Synthese des selektiv N-substituierten linearen Zielpeptides beendet ist, wird es von dem PAM-Harz abgetrennt. Die Abtrennung wird durch eine einstündige Behandlung des PAM-Harzes bei 0°C mit einer 10:1:0,5 Mischung aus HF, Anisol und Dimethylsulfid erreicht. Das Abtrennungsprodukt kann anschließend mit einer wässrigen Essigsäure (50% v/v) aus der Reaktionsmischung extrahiert und lyophilisiert werden. Wenn das selektiv N-substituierte lineare Zielpeptid geschützte Seitengruppen umfaßt, können diese Gruppen zu dieser Zeit entschützt werden. Das Produkt kann anschließend durch Massenspektroskopie verifiziert werden.

#### Cyclisierung linearer Peptide:

[0111] Die linearen Zielpeptide, selektiv N-alkylierte lineare Zielpeptide und selektiv N-substituierte lineare Zielpeptide, deren Synthesen weiter oben beschrieben wurden, können jeweils gemäß der folgenden Prozedur cyclisiert werden: Eine Lösung des linearen Peptides in DMF (1 mM) wird bei 5°C 12 Stunden mit TBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat), 3 mM, HOBt (1-Hydroxybenzotriazol, 3 mM) und DIEA (Diisopropylamin, 1% v/v) behandelt, um die gewünschten cyclischen Peptidmonomere zu erhalten. Das Produkt kann durch eine Umkehrphase-HPLC-Reinigung aufgereinigt werden. Eine typische Ausbeute bei der Cyclisierung eines N-methylierten linearen Peptidocytomers beträgt 70%.

#### Alternatives Verfahren zur Peptidsynthese und -cyclisierung:

[0112] Alternativ können Peptide mit einem Asp-Rest gemäß dem von Rovero, P. et al. (1991) Tetrahedron Lett., 32, 2639–2642 beschriebenen Festphasen-Verfahren synthetisiert und cyclisiert werden. Kurz gesagt wird Boc-Asp (N-tert-Butoxycarbonylasparginsäure) über die  $\beta$ -Carbonylfunktion an ein PAM-Harz (Phenylacetamidomethyl) gebunden, während die  $\alpha$ -Carbonylgruppen als ein Fluorenylmethyl-Ester (OFm) geschützt werden. Boc-Asp ( $\beta$ -PAM-Harz)OFm kann von der Bachem AG, Schweiz, erworben werden. Ein lineares Peptid mit dem D-L-Chiralitätsmotiv kann dann auf dem Boc-Asp( $\beta$ -PAM-Harz)OFm gemäß der klassischen Boc/Benzyl-Strategie unter Verwendung eines automatischen oder semi-automatischen Peptidsynthesierers, beispielsweise Labortec SP 640, aufgebaut werden. Die Synthese wird durch aufeinanderfolgendes Addieren Boc-geschützter Aminosäuren gemäß der BOP-Kupplungsprozedur, d. h. 3 Äquivalente Boc-Aminosäure, 3 Äquivalente BOP und 6 Äquivalente DIEA, in DMF für eine Stunde durchgeführt. Eine Vervollständigung kann durch zweifaches Wiederholen jeder Kupplung erreicht werden. Sobald die Synthese des linearen Peptides beendet ist, ist es für die Cyclisierung bereit. Vor der Cyclisierung wurde die N-terminale Aminogruppe mit TFA entschützt und der C-terminale Fluorenylmethyl-Ester wurde 3 + 7 Minuten mit Piperidin (20% v/v Piperidin in DMF) entschützt. Eine Cyclisierung wurde anschließend durch eine dreistündige Behandlung mit 3 Äquivalenten BOP ((Benzotriao)-zoly)-N-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphat) und 6 Äquivalenten DIEA (N,N-Diisopropylethylamin) in DMF erreicht. Wenn die Cyclisierungsreaktion vollständig ist, kann die BOP-Behandlung wiederholt werden. Ein Entschützen der Seitenketten und ein Abtrennen des cyclischen Peptids von dem Harz kann durch eine einstündige Behandlung mit einer 10:1:0,5-Mischung aus HF, Anisol und Dimethylsulfid bei 0°C erreicht werden. Das Produkt kann anschließend mit einer wässrigen Essigsäure (50% v/v) extrahiert und lyophilisiert werden.

[0113] Verkapselte und verschließbare cyclische Peptide können ebenfalls gemäß dem oben genannten Verfahren durch Cyclisierung der entsprechenden N-substituierten linearen Peptide synthetisiert werden.

SEQUENZ-LISTING

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: The Scripps Research Institute
- (B) STRASSE: 10666 North Torrey Pines Road,  
TPC-8
- (C) STADT: La Jolla
- (D) STAAT: CA
- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZAHL (ZIP): 92037
- (G) TELEFON: 619-554-2937
- (H) TELEFAX: 619-664-6312

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: CYCLISCHES PEPTIDROHR

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11

(iv) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) ART DES MEDIUMS: Floppy-Disk
- (B) COMPUTER: IBM-PC-Kompatibler
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version  
#1.25 (EPO

(v) DATEN DER AKTUELLEN ANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: US PCT/US/
- (B) ANMELEDETAG: 14. Oktober 1994

(vi) DATEN PRIORITÄTSANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: US 08/138,502
- (B) ANMELEDETAG: 14. Oktober 1993

(vi) DATEN PRIORITÄTSANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: Nicht zugewiesen
- (B) ANMELEDETAG: 11. Oktober 1994

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID-NR.: 1:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: ringförmig
  
- (ii) MOLEKÜLART: Peptid
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 2
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala  
/Anmerkung = "Rest zwei, vier, sechs und acht sind als D-Ala bezeichnet, was dem D-Isomer der Aminosäure Alanin entspricht".
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 4
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 6
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 8
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala
  
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-NR.: 1:

Gln Ala Glu Ala Gln Ala Glu Ala

1

5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID-NR.: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 2
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala  
/Anmerkung = "Rest zwei, vier, sechs und acht sind als D-Ala bezeichnet, was dem D-Isomer der Aminosäure Alanin entspricht".

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 4
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 6
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 8
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-NR.: 2:

Gln Ala Gln Ala Gln Ala Gln Ala

1

5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID-NR.: 3:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: ringförmig
  
- (ii) MOLEKÜLART: Peptid
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 2
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Leu  
/Anmerkung = "Rest zwei, vier, sechs und acht sind als D-Leu bezeichnet, was dem D-Isomer der Aminosäure Leucin entspricht".
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 4
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Leu
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 6
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Leu
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 8
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Leu
  
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-NR.: 3:

Gln Leu Gln Leu Gln Leu Gln Leu

1

5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID-NR.: 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 2
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Val  
/Anmerkung = "Rest zwei, vier, sechs und acht sind als D-Val bezeichnet, was dem D-Isomer der Aminosäure Valin entspricht".

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 4
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Val

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 6
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Val

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 8
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Val

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-NR.: 4:

Gln Val Gln Val Gln Val Gln Val

1

5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID-NR.: 5:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: ringförmig
  
- (ii) MOLEKÜLART: Peptid
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 2
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Leu  
/Anmerkung = "Rest zwei, vier, sechs und acht sind als D-Leu bezeichnet, was dem D-Isomer der Aminosäure Leucin entspricht".
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 4
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Leu
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 6
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Leu
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 8
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Leu
  
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-NR.: 5:

Phe Leu Phe Leu Phe Leu Phe Leu

1

5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID-NR.: 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 2
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala  
/Anmerkung = "Rest zwei, vier, sechs und acht sind als D-Ala bezeichnet, was dem D-Isomer der Aminosäure Alanin entspricht".

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 4
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 6
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 8
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-NR.: 6:

Phe Ala Phe Ala Phe Ala Phe Ala

1

5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID-NR.: 7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 2
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = N-Methyl-Ala

/Anmerkung = "Rest zwei, vier, sechs und acht sind als N(Me)Ala bezeichnet, was dem N-methylierten Derivat von Alanin entspricht".

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 4
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = N-Methyl-Ala

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 6
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = N-Methyl-Ala

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
- (B) ORT: 8
- (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = N-Methyl-Ala

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-NR.: 7:

Phe Ala Phe Ala Phe Ala Phe Ala

1

5

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ-ID-NR.: 8:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: ringförmig
  
- (ii) MOLEKÜLART: Peptid
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 2
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala  
/Anmerkung = "Rest zwei, vier, sechs,  
acht, zehn und zwölf sind als D-Ala  
bezeichnet, was dem D-Isomer der Ami-  
nosäure Alanin entspricht".
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 4
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 6
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala
  
- (ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 8
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala
  
- ix) MERKMAL:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle
  - (B) ORT: 10
  - (D) ANDERE INFORMATIONEN: /Label = D-Ala









ner anti-parallelen Weise unter einer Bildung von  $\beta$ -Schicht-Wasserstoffbindungen zwischen benachbarten cyclischen Peptiden hervorgerufen wird.

5. Molekularrohr, welches eine Vielzahl an cyclischen homodeten Peptiden aufweist, wobei jedes cyclische homodete Peptid hydrophobe Seitenkettenanteile und eine Aminosäuresequenz mit einer Länge zwischen 6 und 16 Aminosäureresten mit einem sich wiederholenden D-L-Chiralitätsmotiv und mit einer geraden Anzahl an Aminosäureresten besitzt, und das Molekularrohr in einer Lösung durch Selbstzusammenfügen gebildet wird, welches durch Kontakt mit einem Lipiddoppelschichtmedium und Stapeln der cyclischen Peptide benachbart zueinander innerhalb des Lipiddoppelschichtmediums in einer anti-parallelen Weise unter einer Bildung von  $\beta$ -Schicht-Wasserstoffbindungen zwischen benachbarten cyclischen Peptiden hervorgerufen wird.

6. Molekularrohr nach Anspruch 4 oder Anspruch 5, welches weiter ein endständiges cyclisches Peptid mit einer Ringstruktur mit einer ersten Seite und einer zweiten Seite aufweist, wobei die erste Seite Wasserstoffbindungsdonatoren besitzt und die zweite Seite keine Wasserstoffbindungsdonatoren besitzt; wobei das endständige cyclische Peptid ein terminales Ende des Molekularrohrs durch Stapeln der ersten Seite darunter in einer anti-parallelen Weise unter einer Bildung von  $\beta$ -Schicht-Wasserstoffbindungen zwischen den benachbarten cyclischen Peptiden bildet.

7. Cyclisches Peptid nach Anspruch 6, wobei sich auf der zweiten Seite des endständigen cyclischen Peptids alkyl-blockierte Aminogruppen befinden, wie zum Beispiel Methyl-blockierte Aminogruppen.

8. Verfahren zum Zerlegen eines Molekularrohrs in Kontakt mit einer Lösung, wobei das Molekularrohr aus cyclischen homodeten Peptiden hergestellt ist und jedes cyclische homodete Peptid ein sich wiederholendes D-L-Chiralitätsmotiv und ionisierbare Aminosäurereste aufweist, wobei sich die cyclischen Peptide innerhalb des Molekularrohrs durch Aufeinanderstapeln in anti-paralleler Weise unter einer Bildung von  $\beta$ -Schicht-Wasserstoffbindungen zwischen benachbarten cyclischen Peptiden selbst zusammenfügen, wobei das Verfahren den folgenden Schritt aufweist:

Ionisieren der ionisierbaren Aminosäuren der cyclischen Peptide durch Ändern des pH-Wertes der Lösung zur Erzeugung geladener cyclischer Peptide mit einer Nettoladung und Brechen der Wasserstoffbindungen zwischen benachbarten cyclischen Peptiden, wodurch das Molekularrohr zerlegt wird.

Es folgen 32 Blatt Zeichnungen

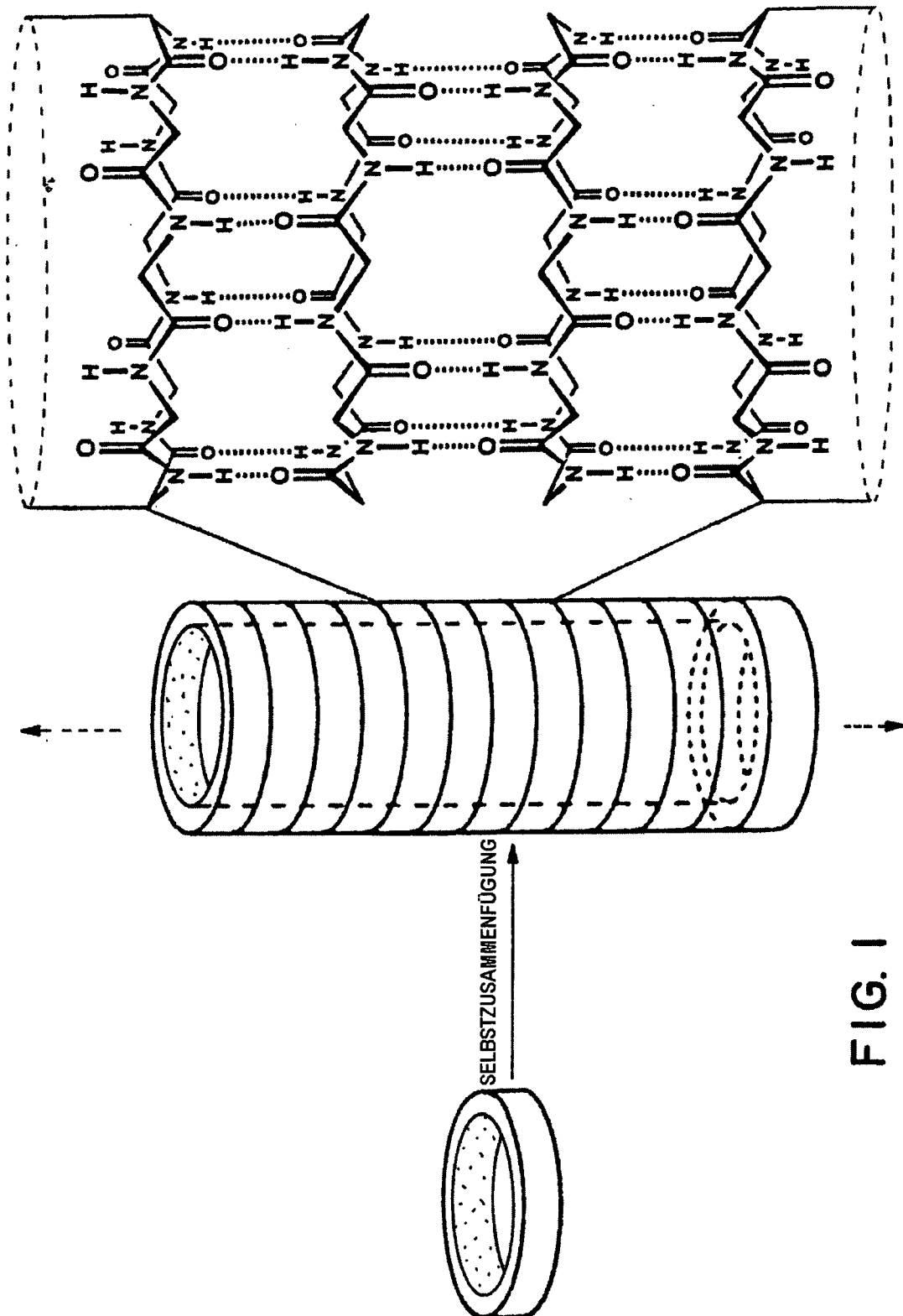
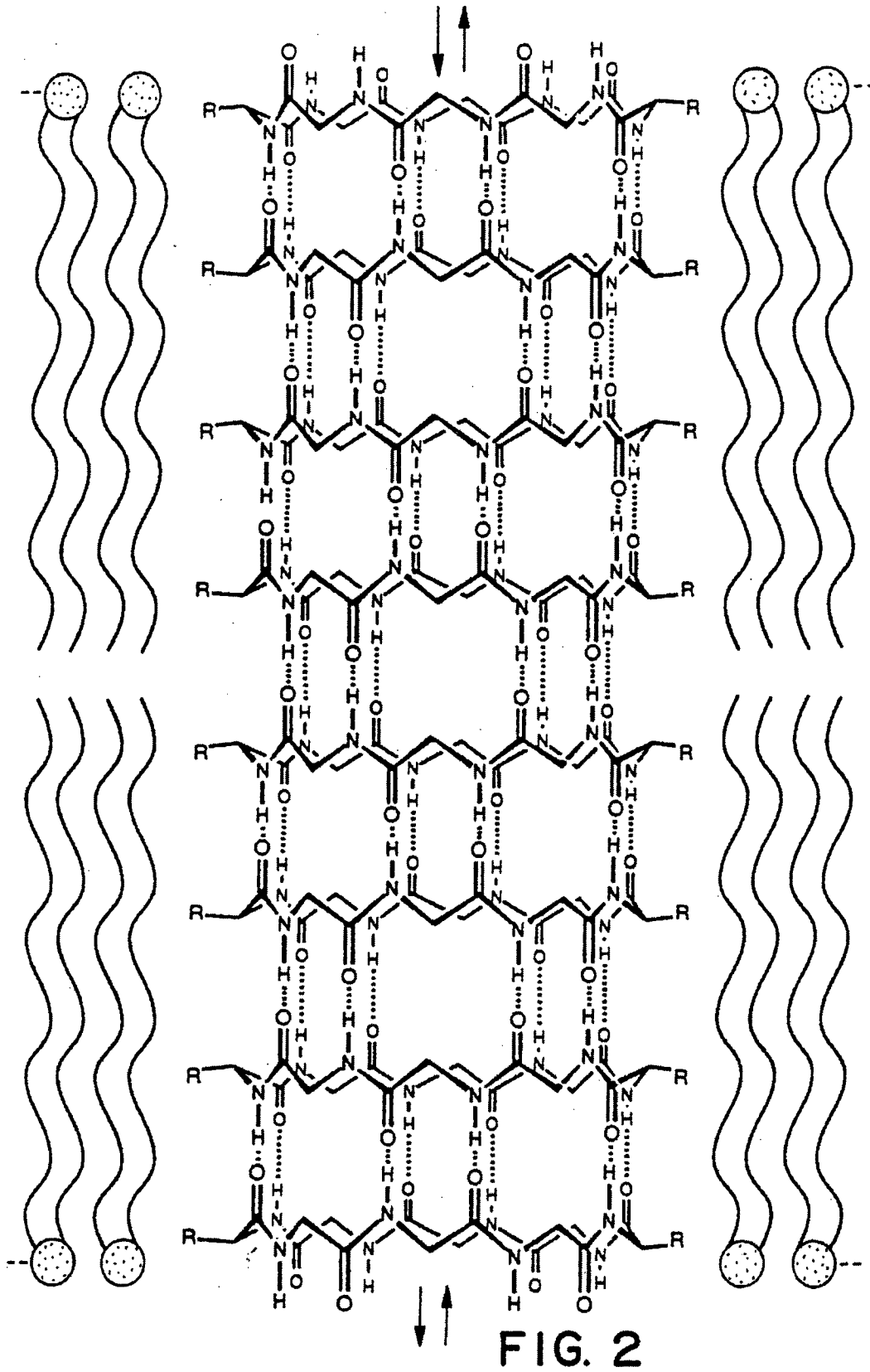
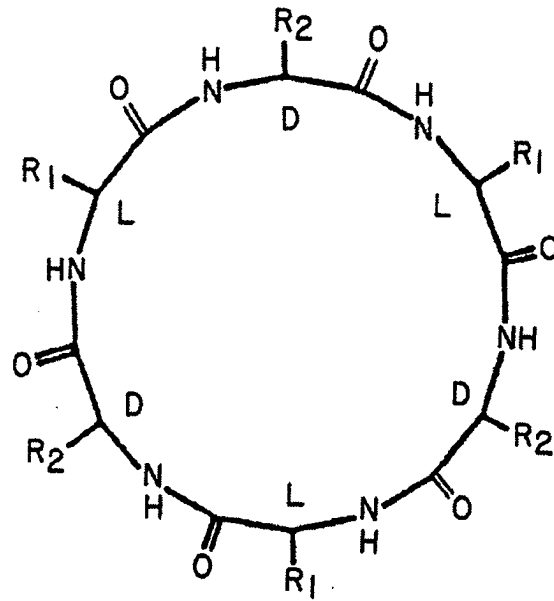
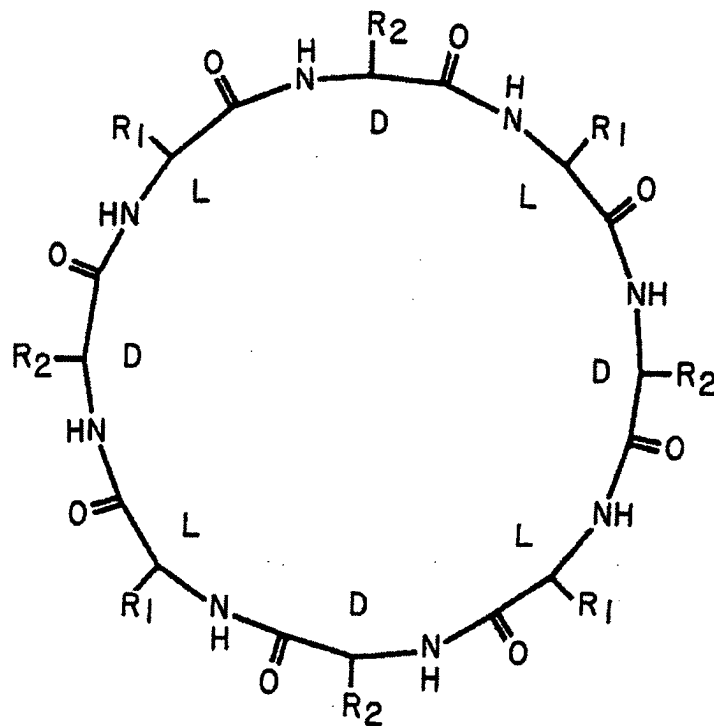


FIG. 1





**FIG. 3a**



**FIG. 3b**



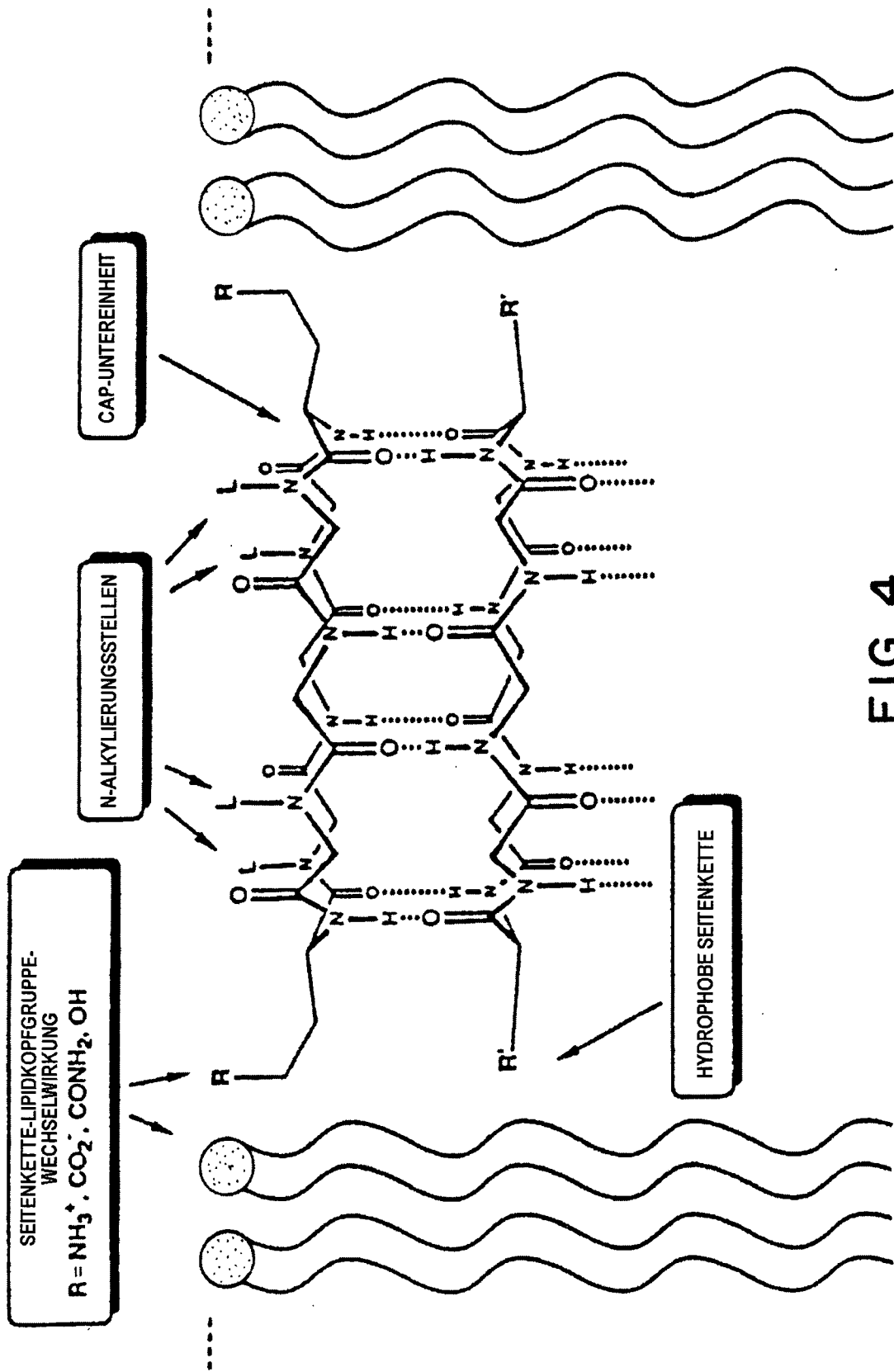


FIG. 4

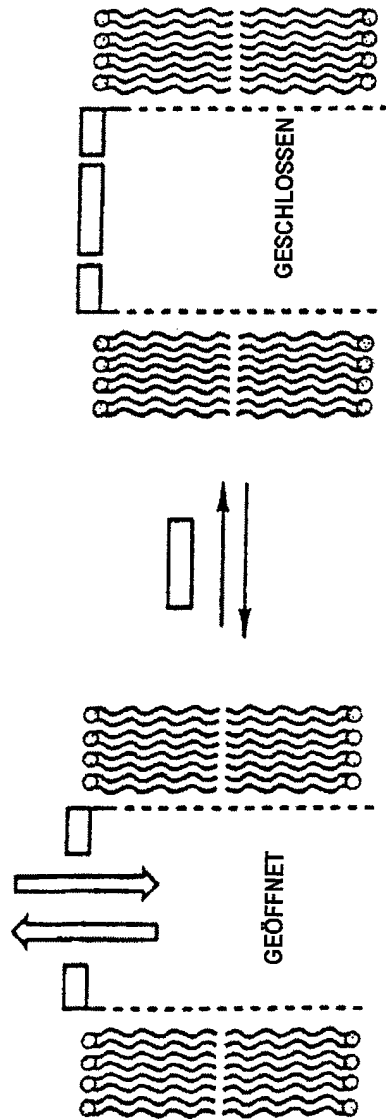


FIG. 5

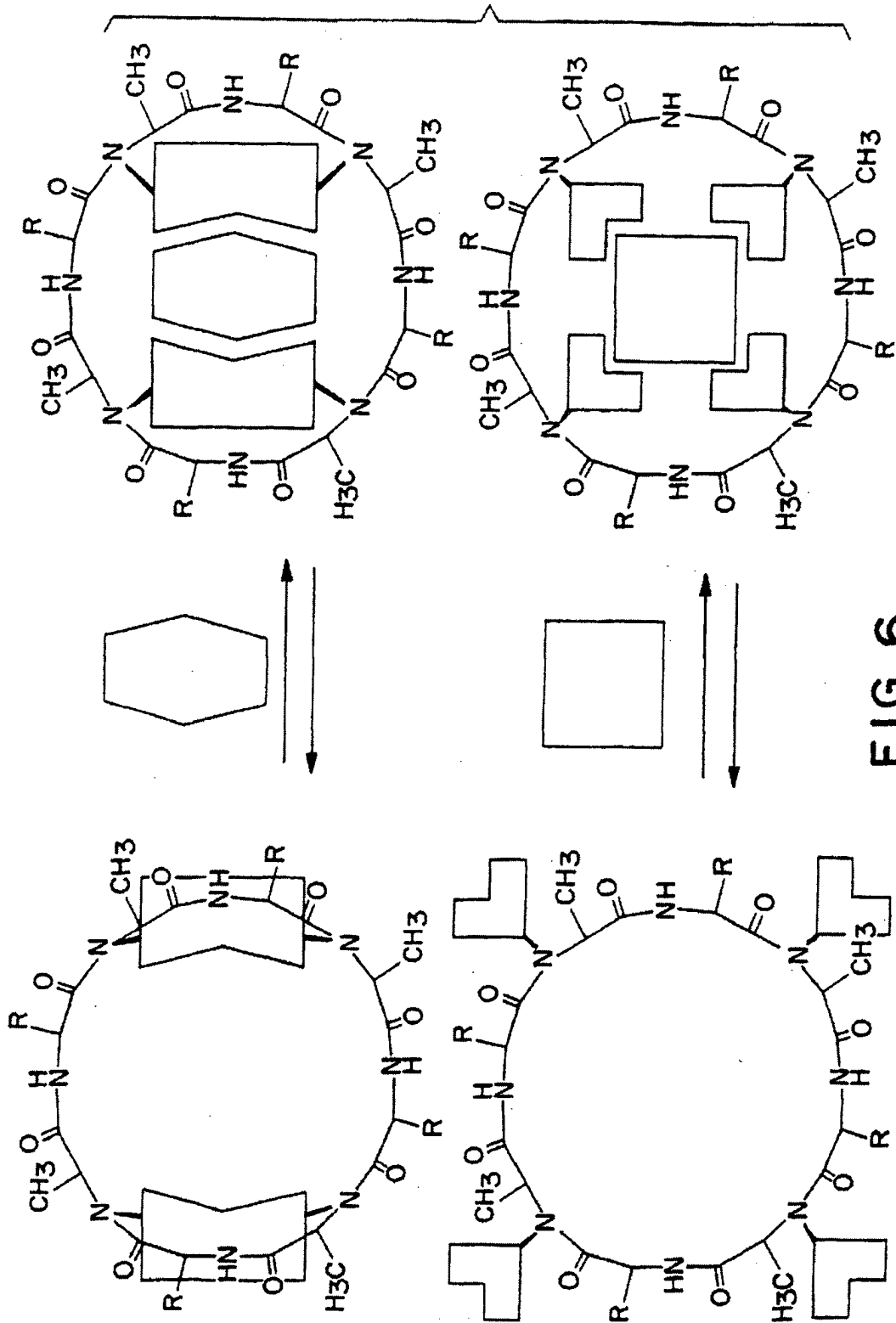
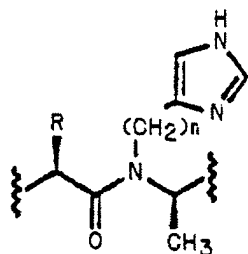
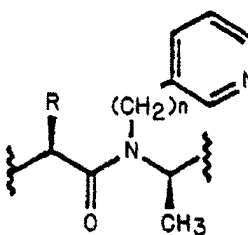


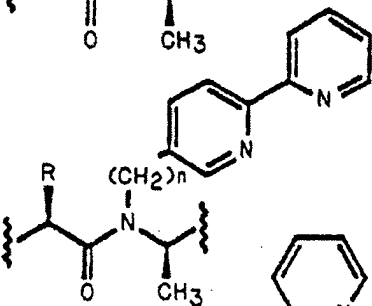
FIG. 6



4 LIGANDEN:  $M = Cu^{II}, Ni^{II}, Co^{II}, Pt^{II}, Pd^{II}$

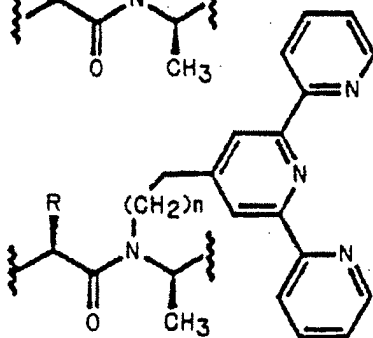


4 LIGANDEN:  $M = Cu^{II}, Ni^{II}, Co^{II}, Pt^{II}, Pd^{II}$

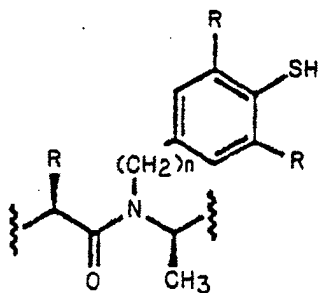


2 LIGANDEN:  $M = Cu^{II}$

3 LIGANDEN:  $M = Fe^{II}, Ni^{II}, Co^{II}$



2 LIGANDEN:  $M = Fe^{II}, Ni^{II}, Co^{II}$



2 LIGANDEN:  $M = Hg^{II}$

3 LIGANDEN:  $M = Hg^{II}, Fe^{II}, Cd^{II}, Co^{II}$

4 LIGANDEN:  $M = Cd^{II}, Co^{II}$

FIG. 7

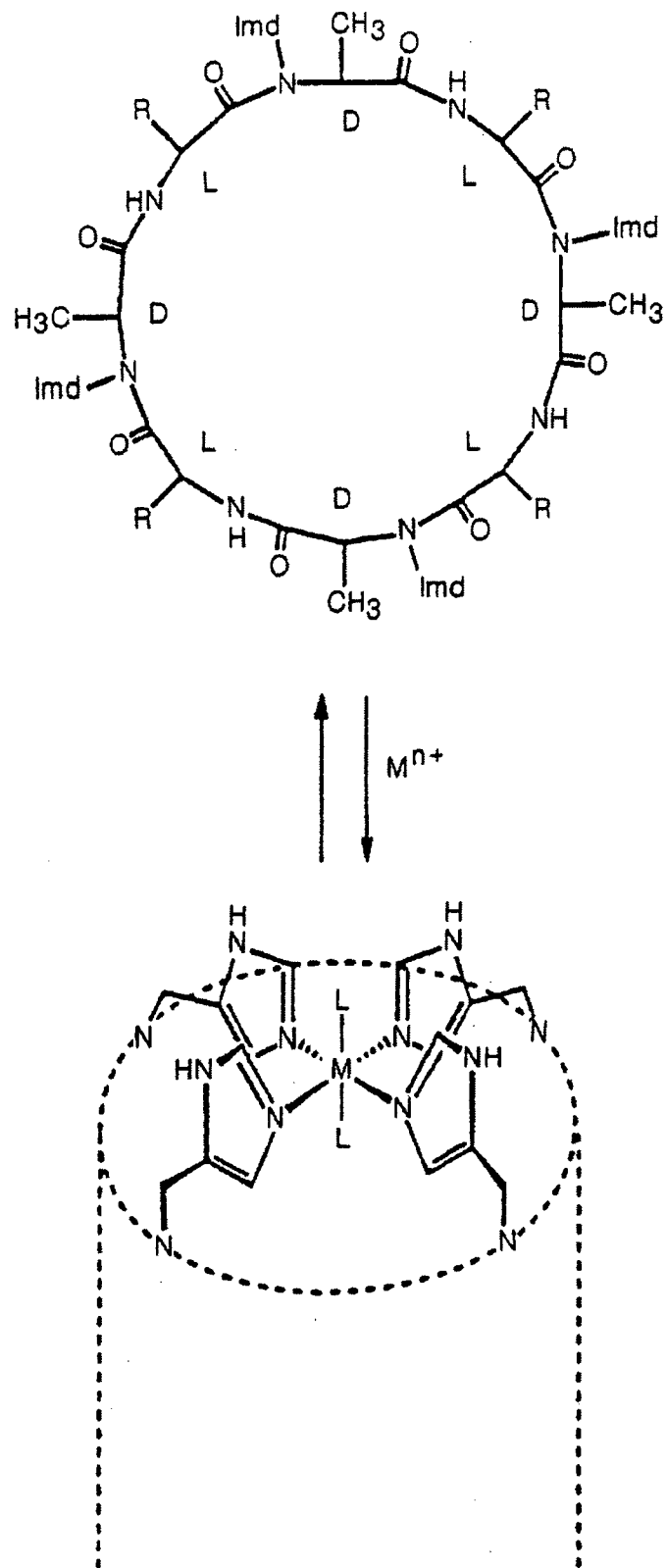


FIG. 8

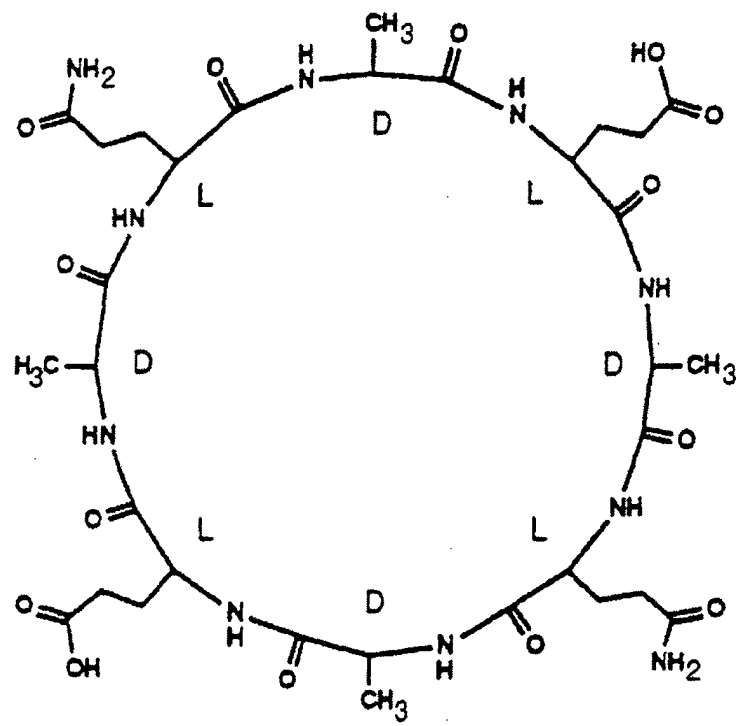


FIG. 9a

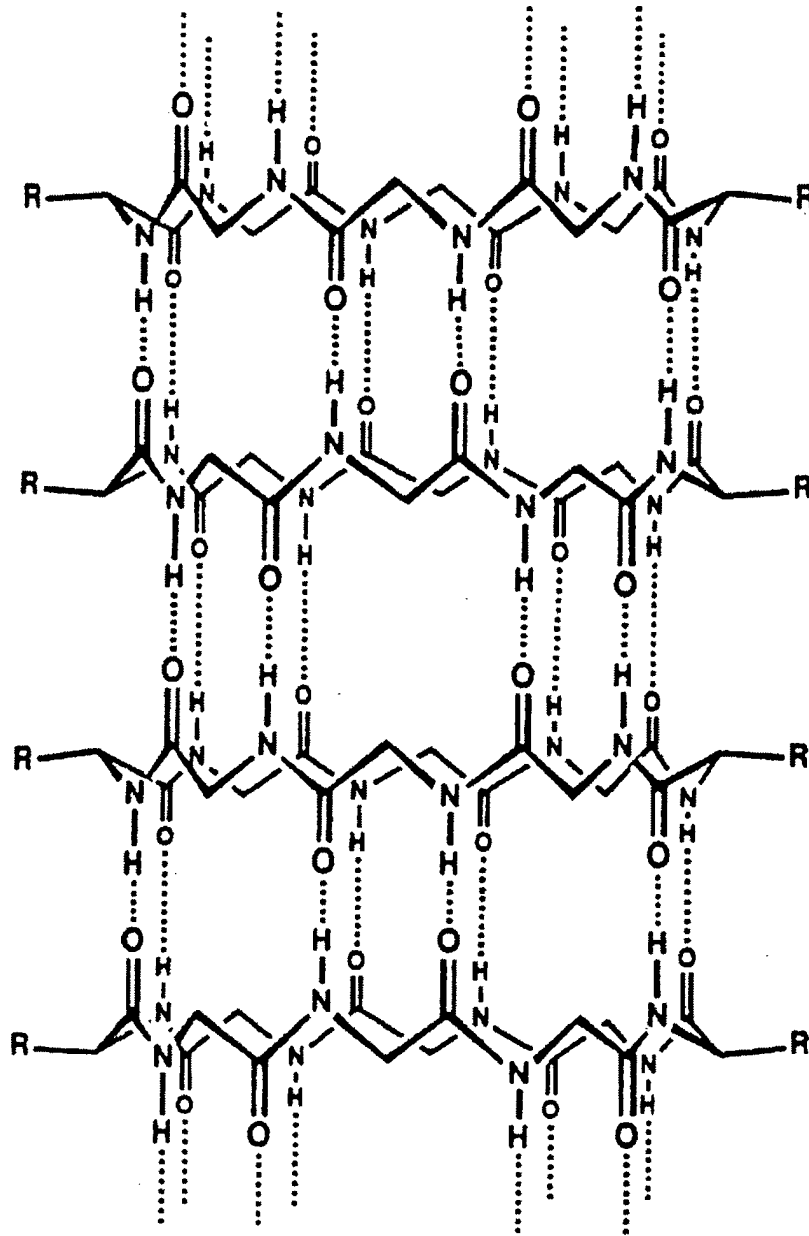


FIG.9b

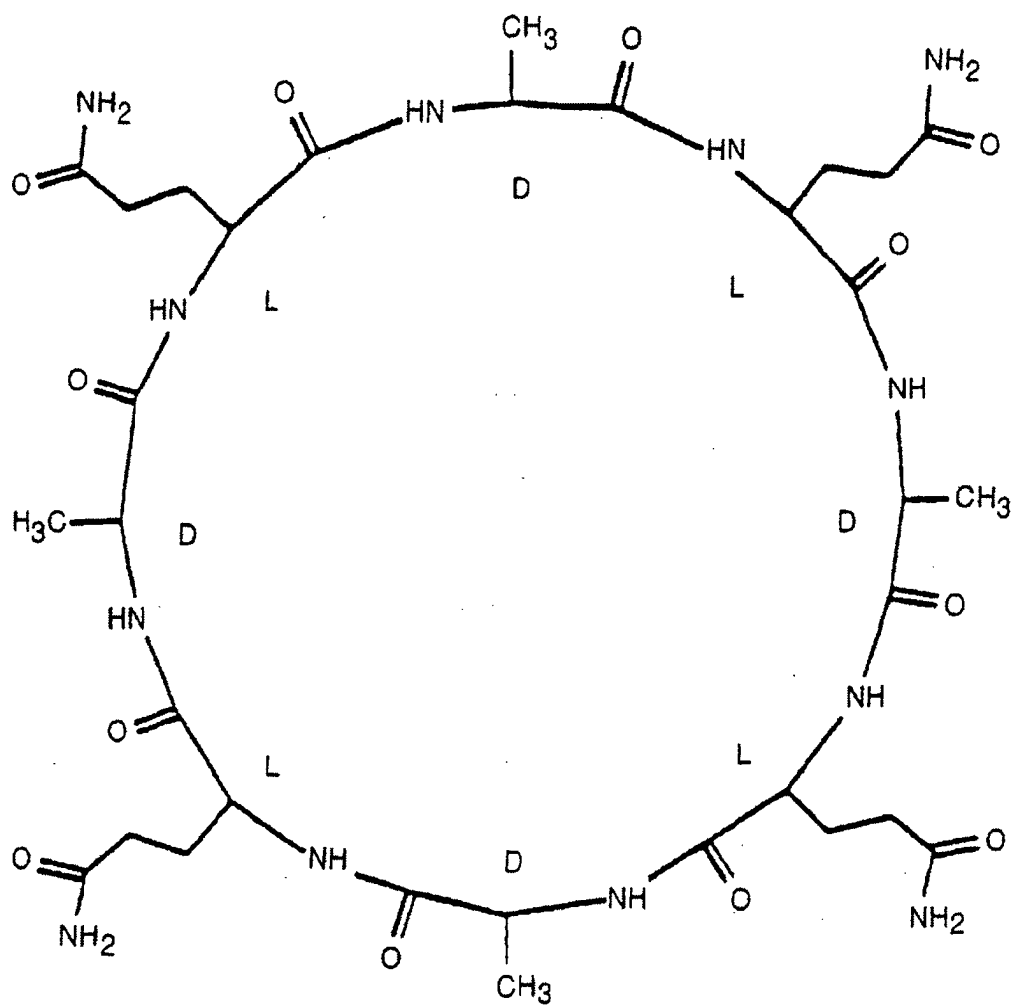


FIG.10

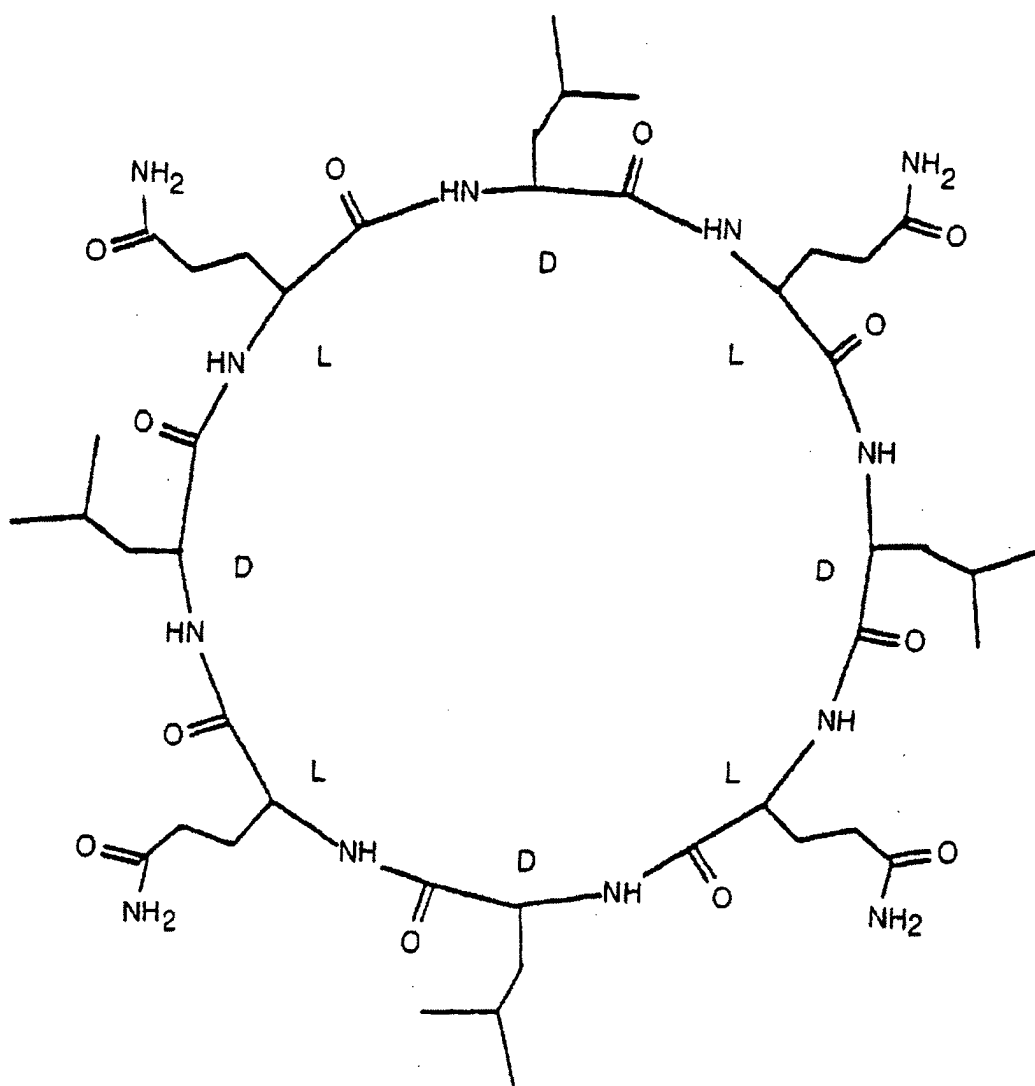


FIG. II

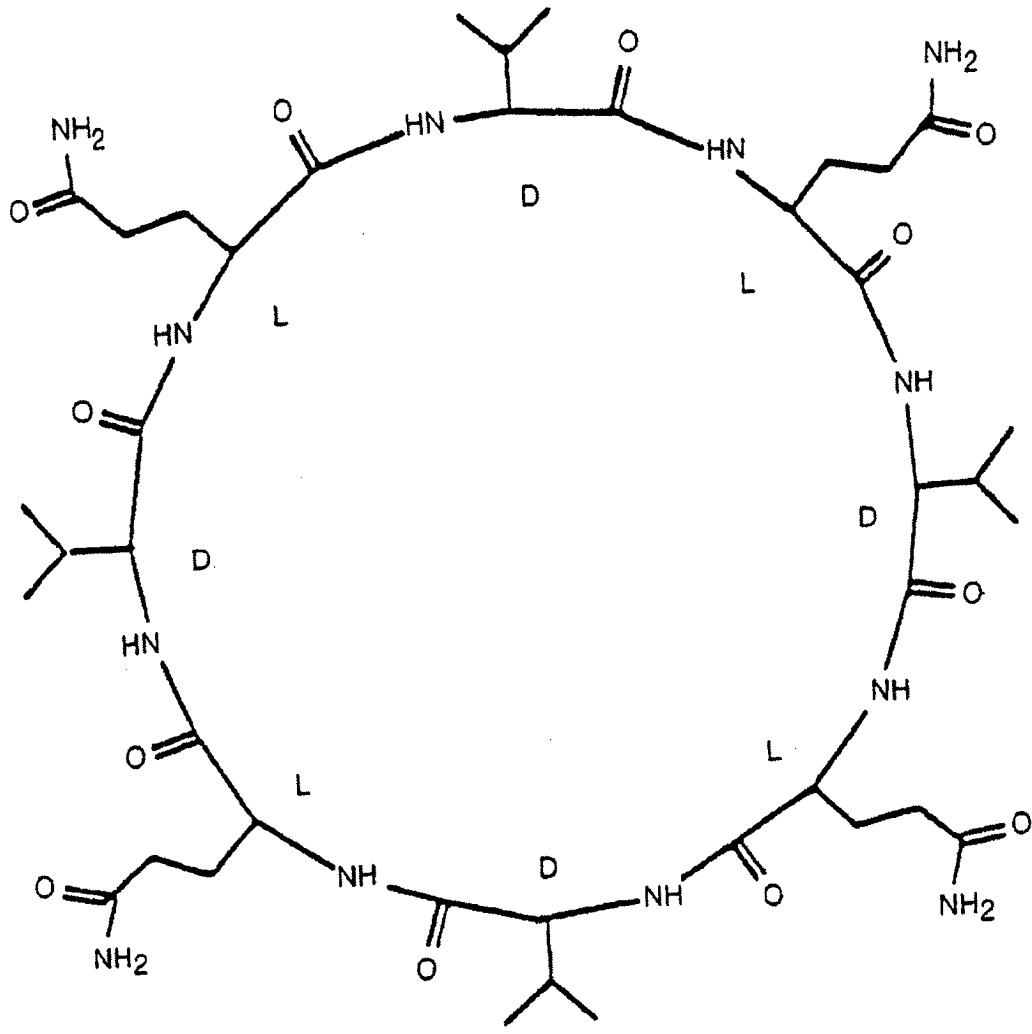


FIG.12





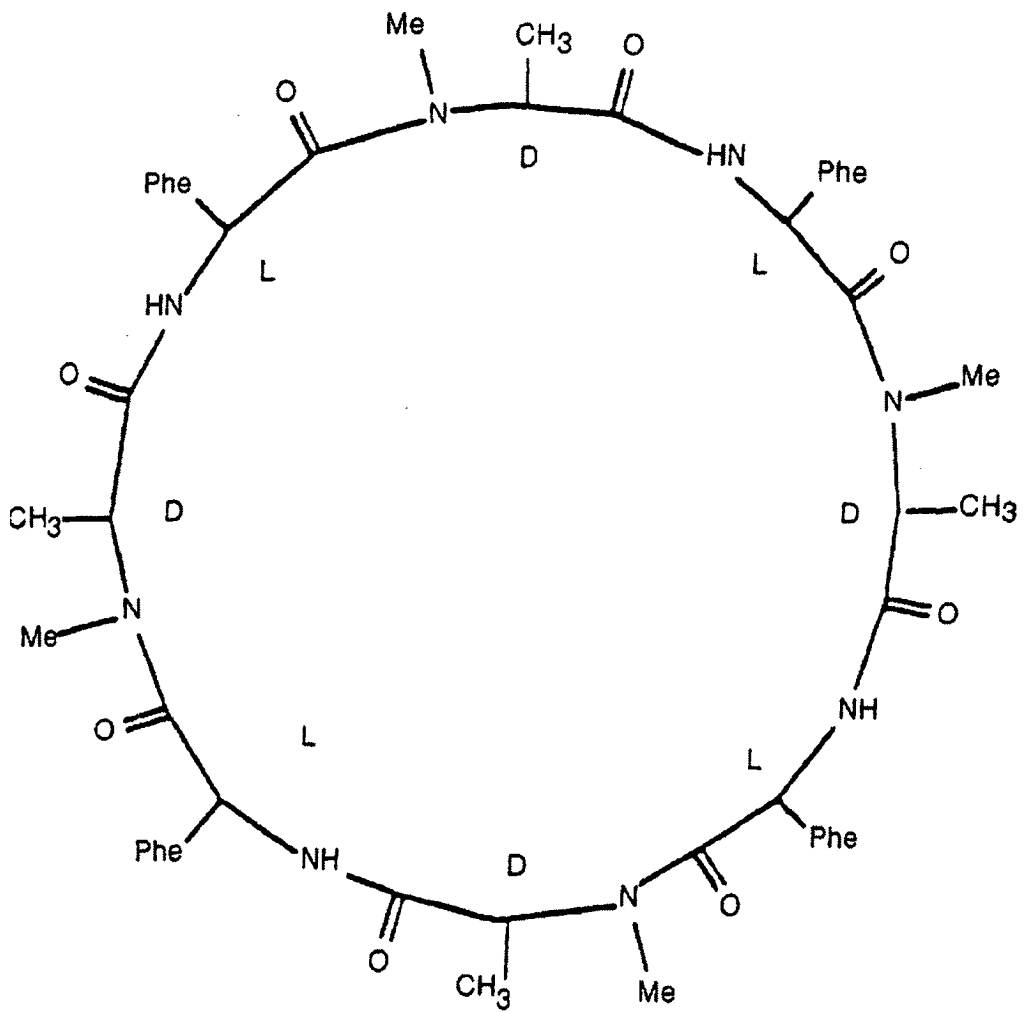


FIG.15

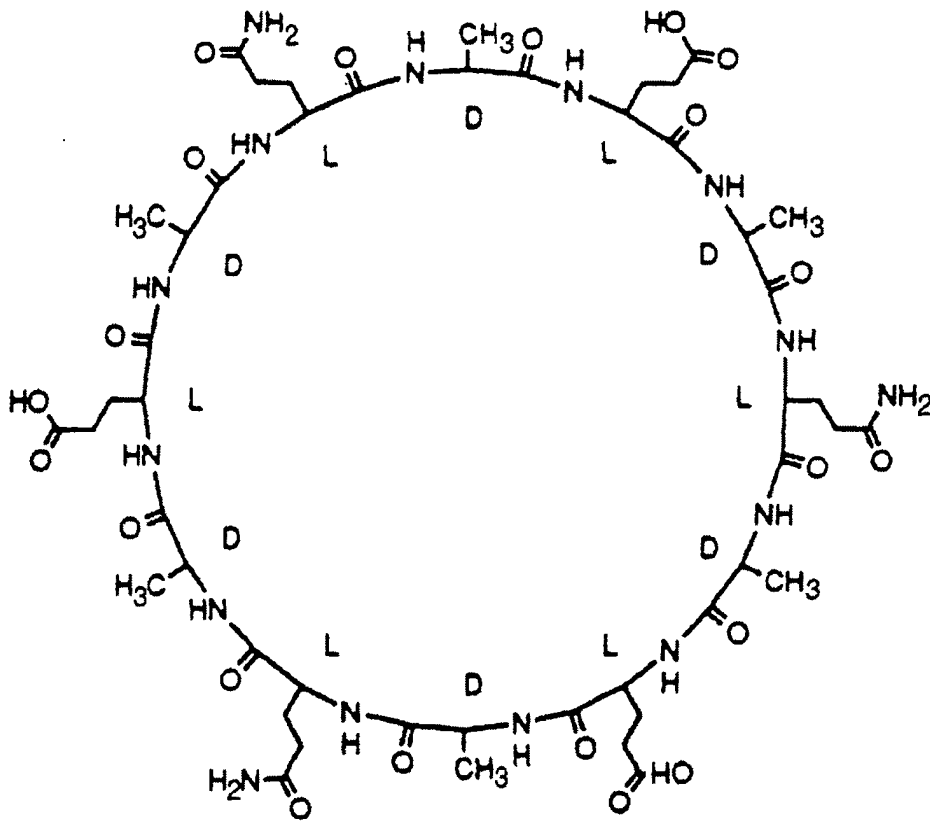


FIG. 16a

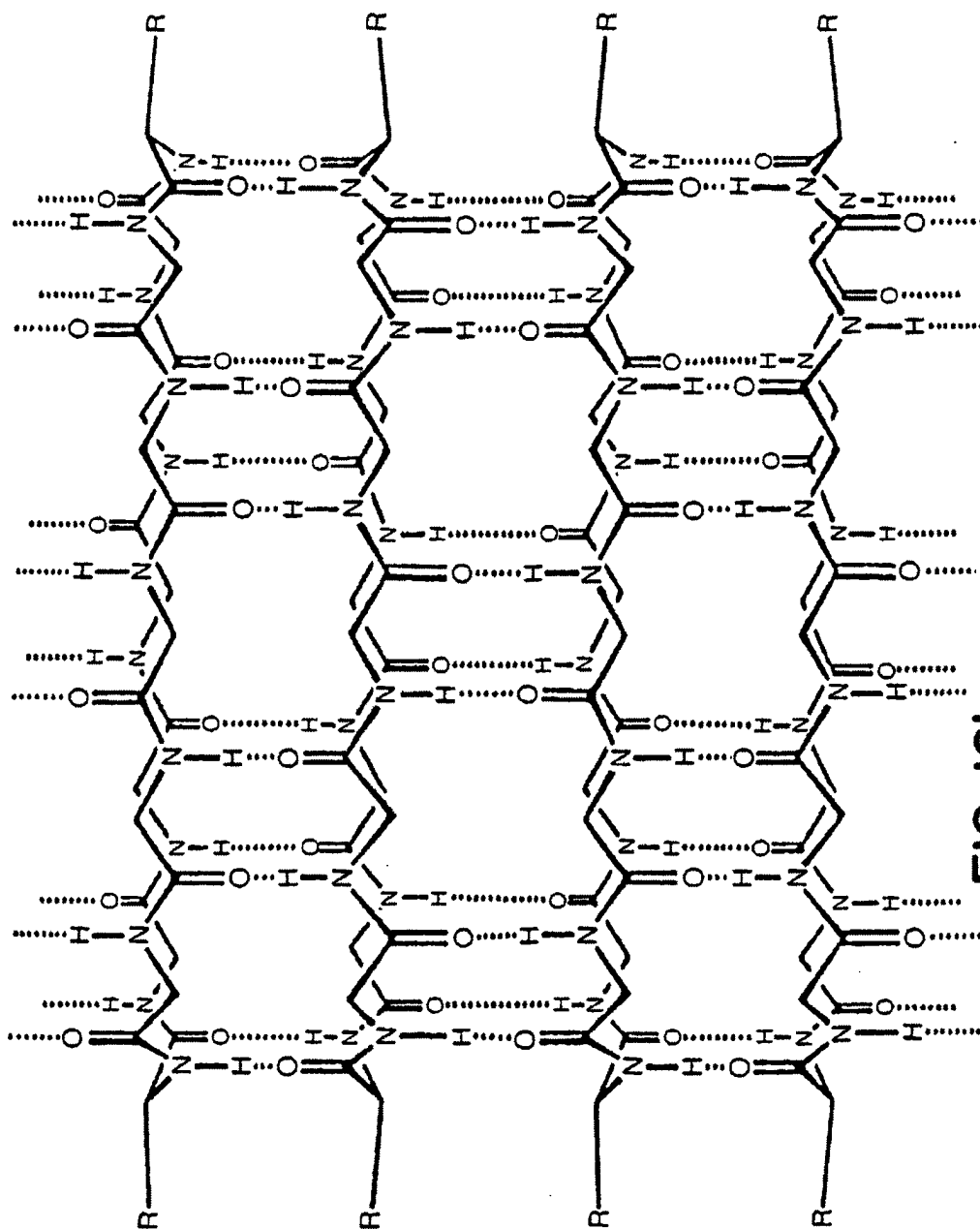


FIG. 16b

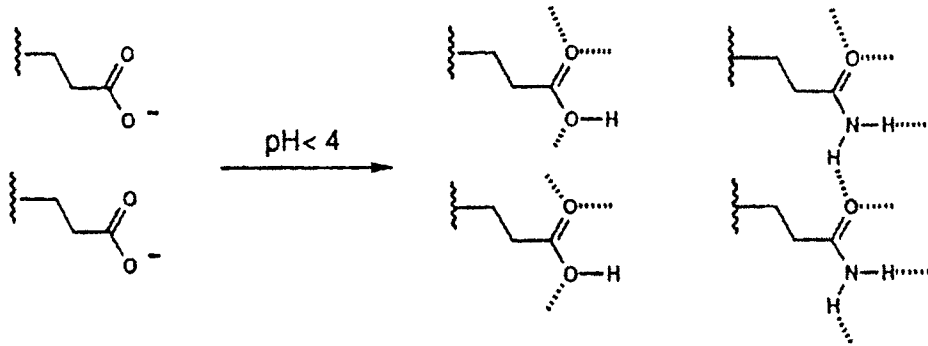


FIG. 17

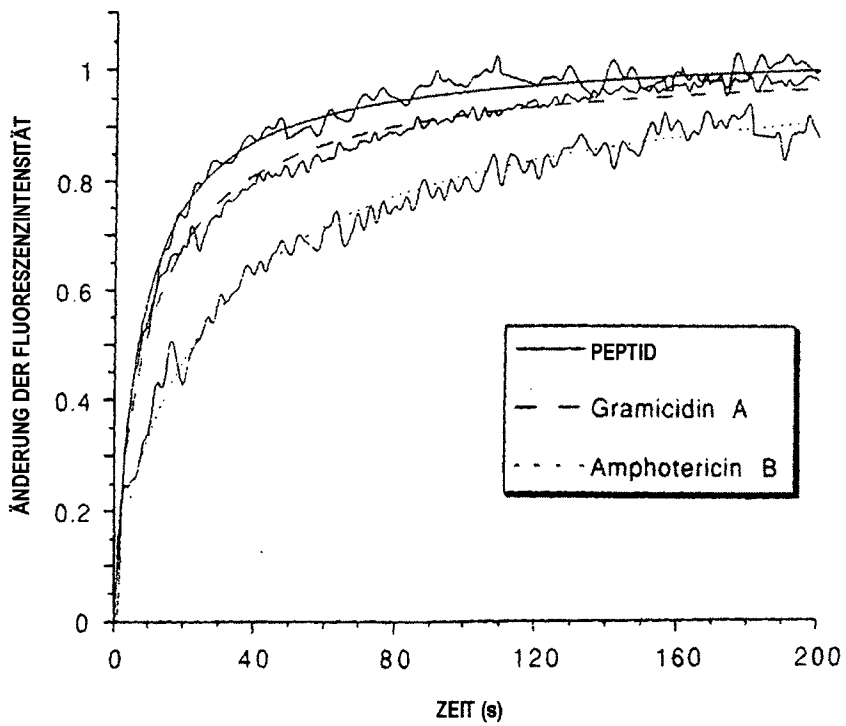
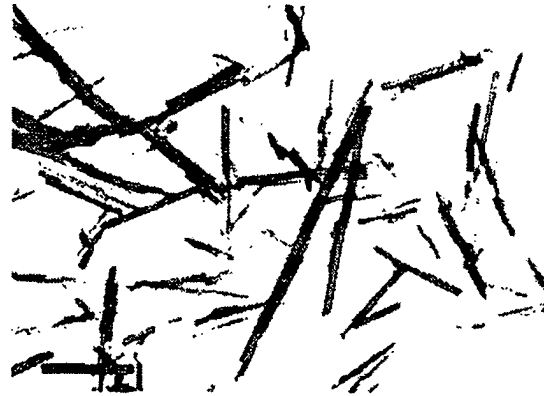


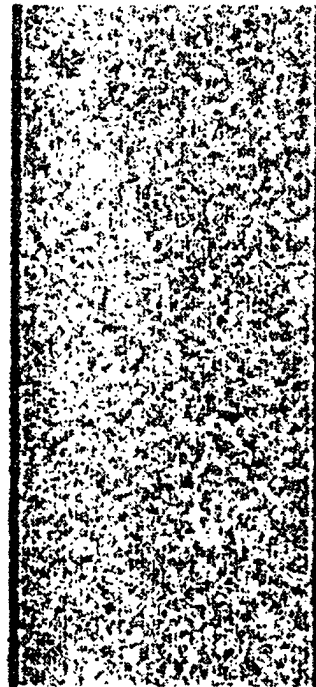
FIG. 25



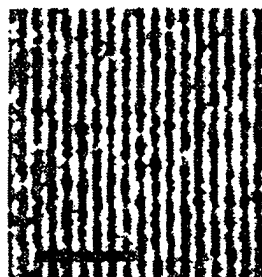
**FIG. 18a**



**FIG. 18b**



**FIG. 18c**



**FIG. 18d**



**FIG. 18e**

FIG. 19a

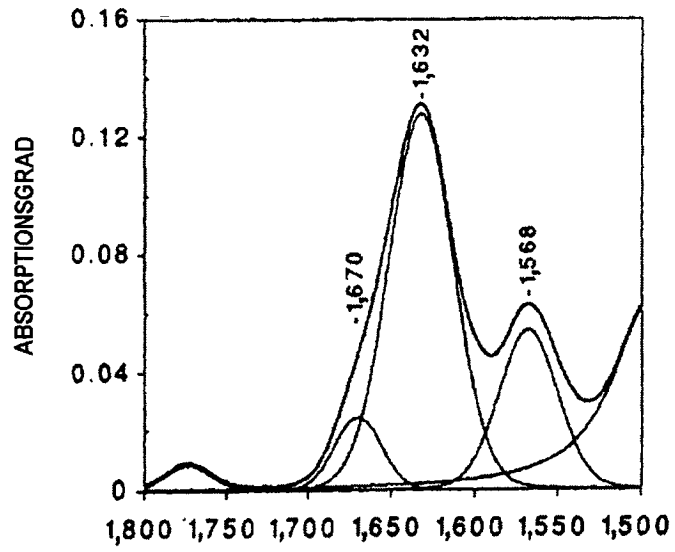


FIG. 19b

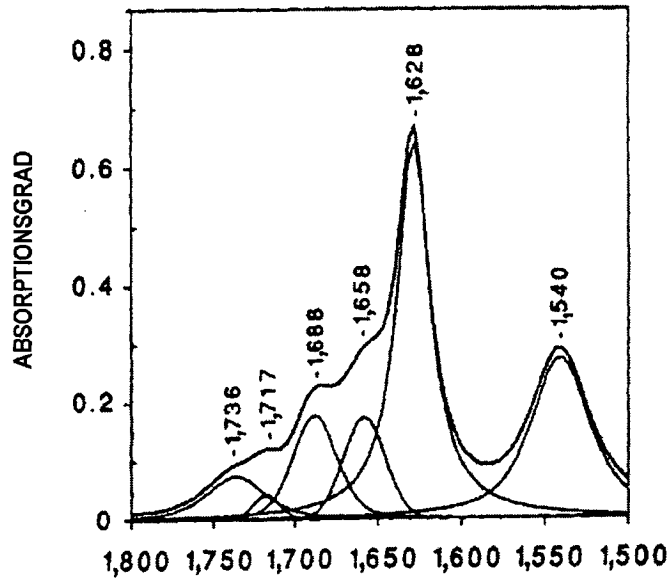
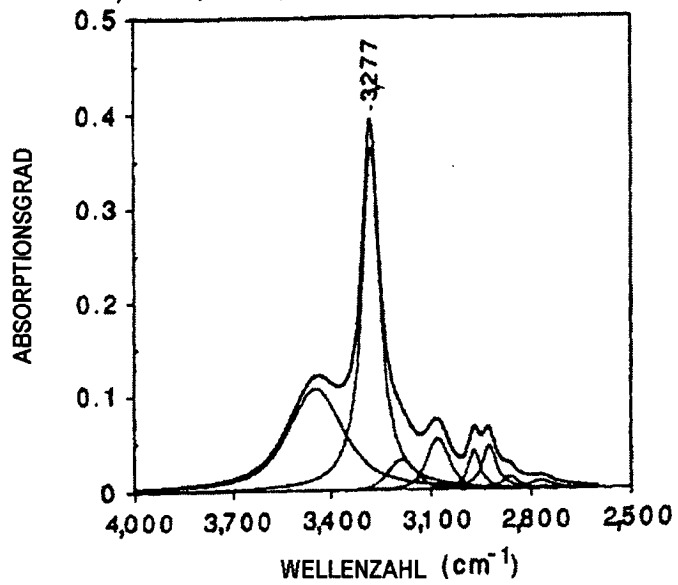
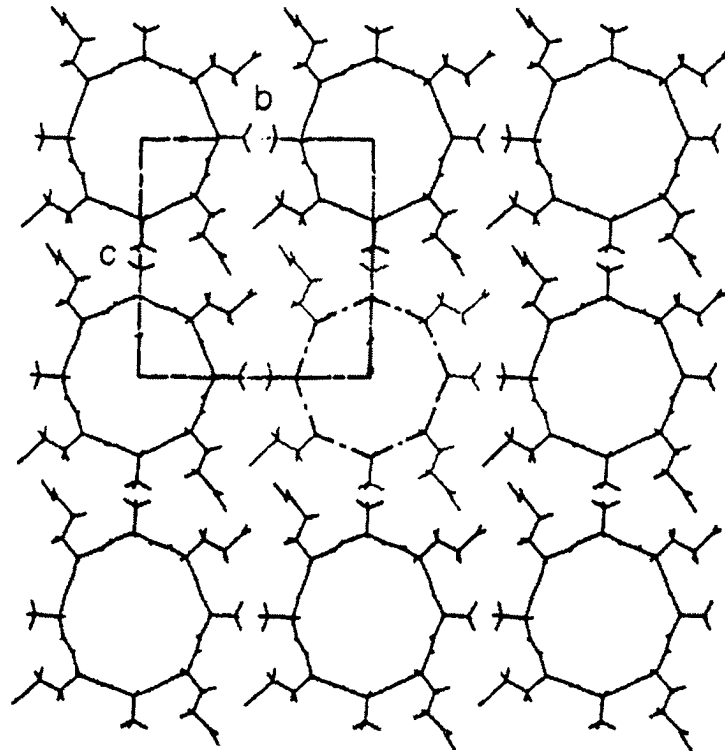
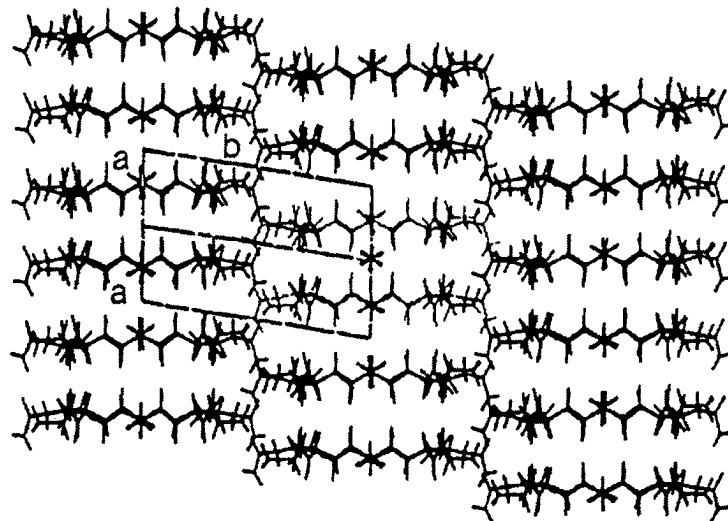


FIG. 19c





**FIG. 20a**



**FIG. 20b**

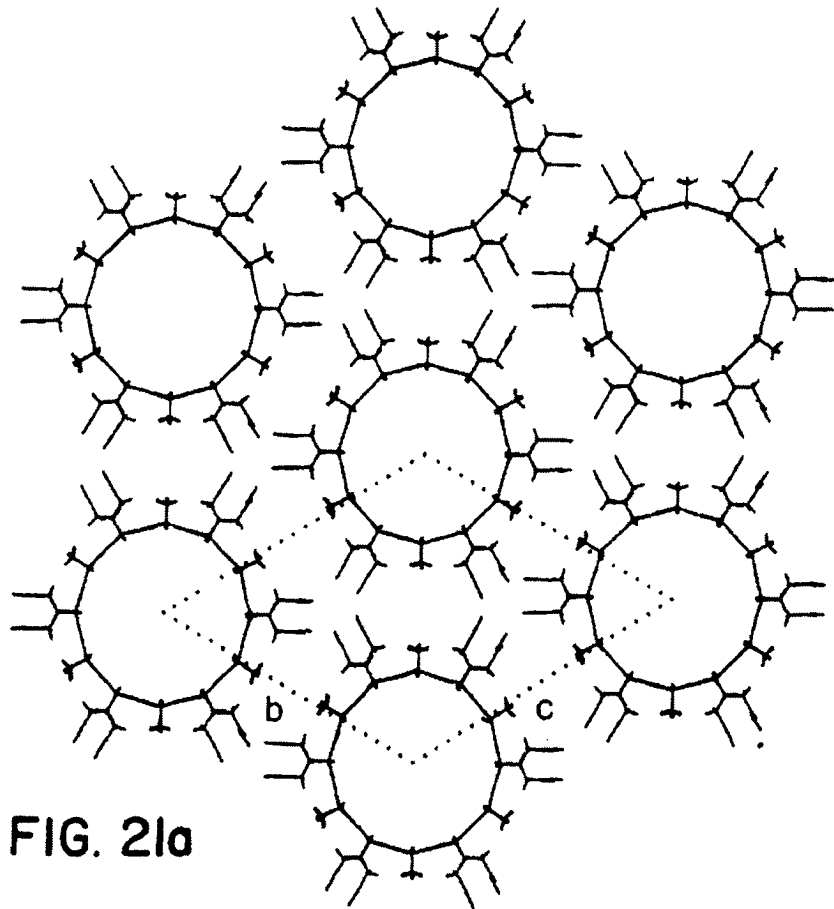


FIG. 21a

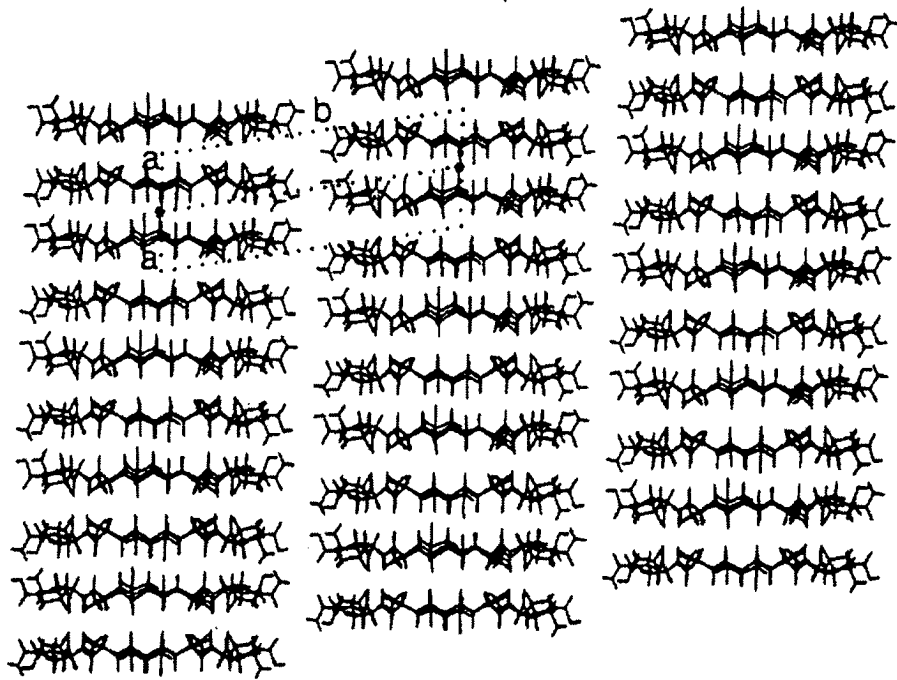


FIG. 21b

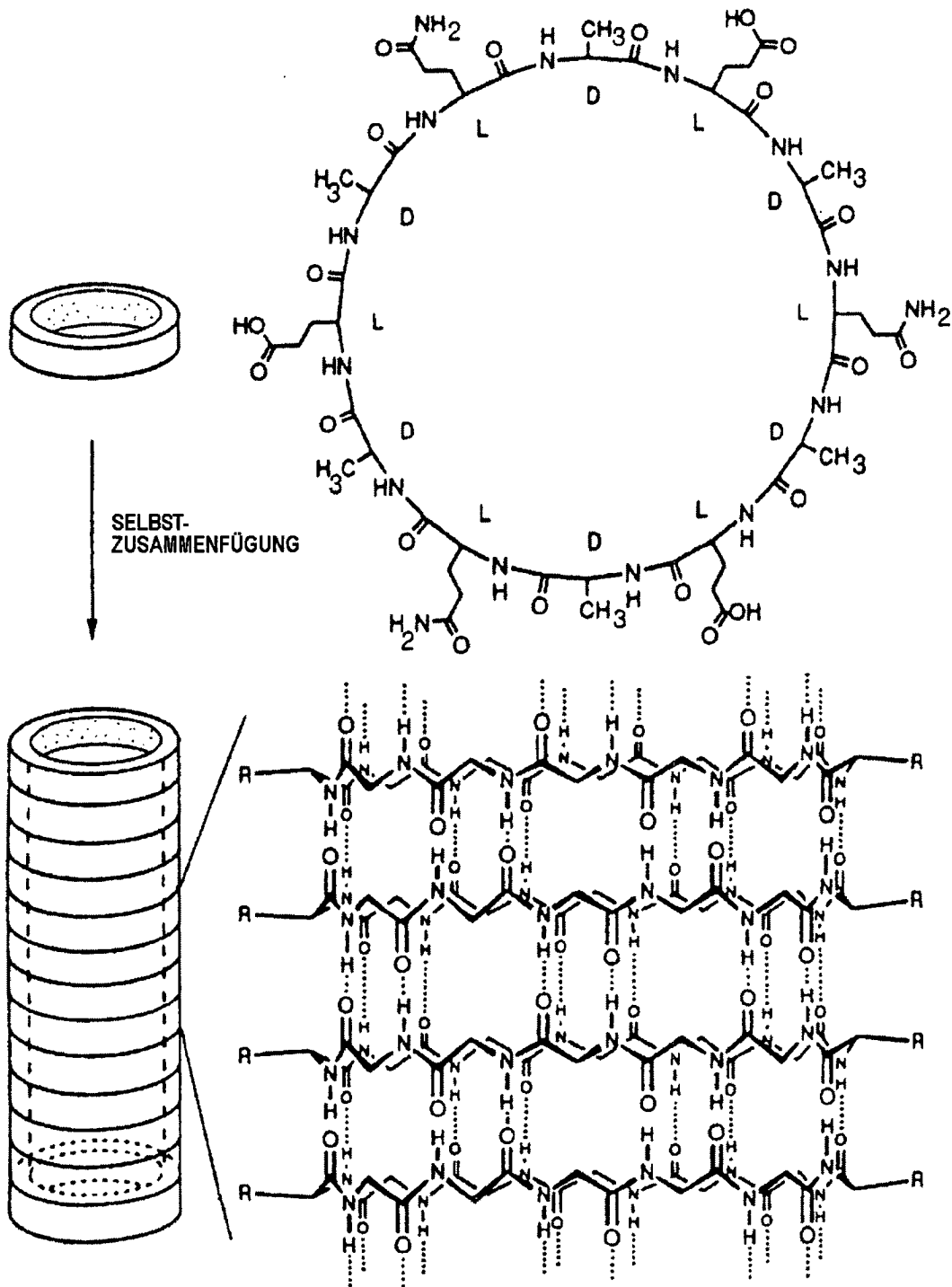
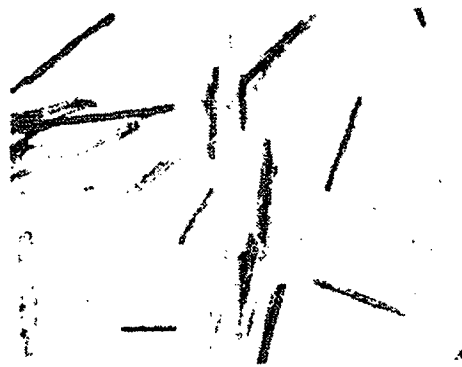


FIG. 22



**FIG. 23a**



**FIG. 23b**

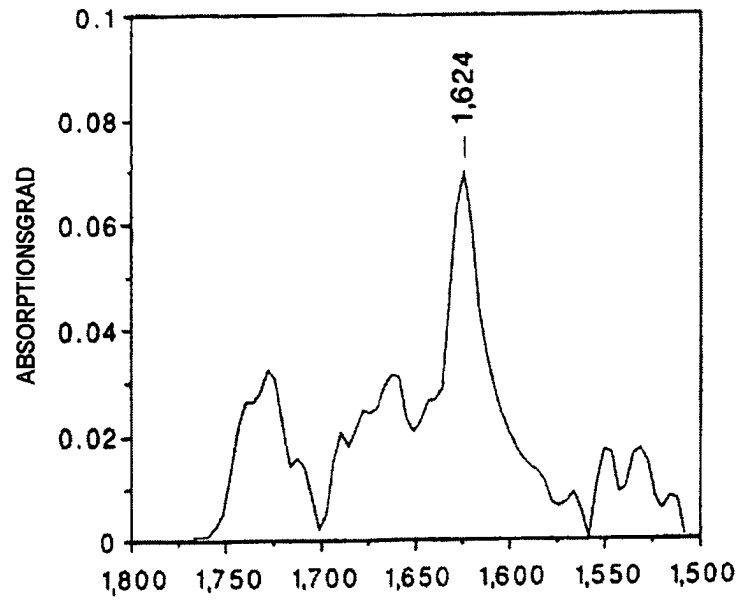


FIG. 24a

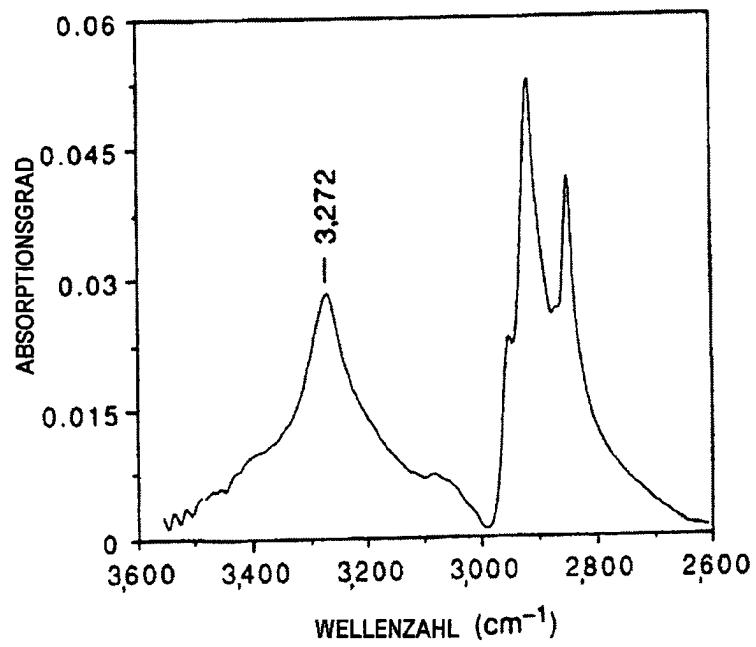
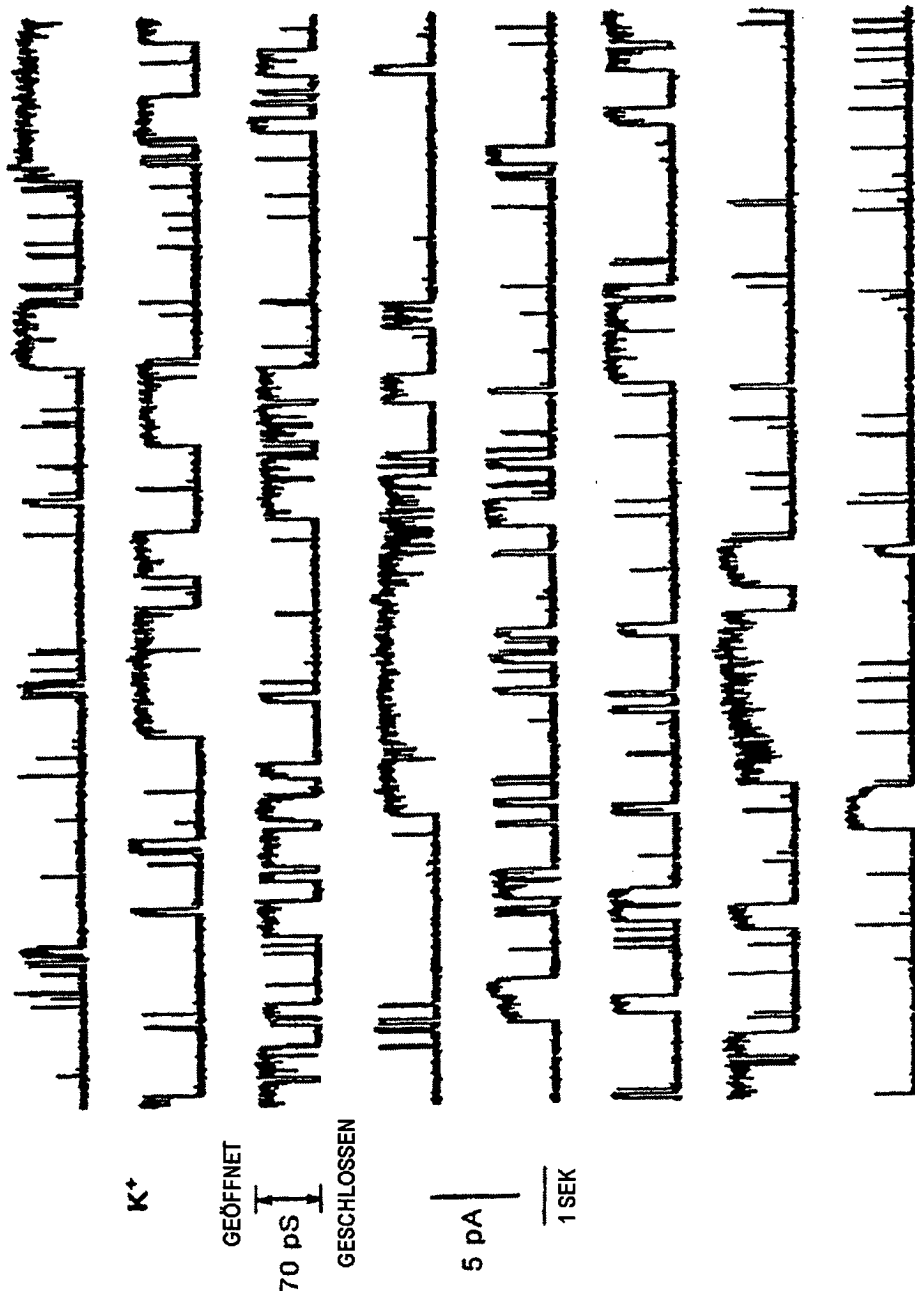


FIG. 24b



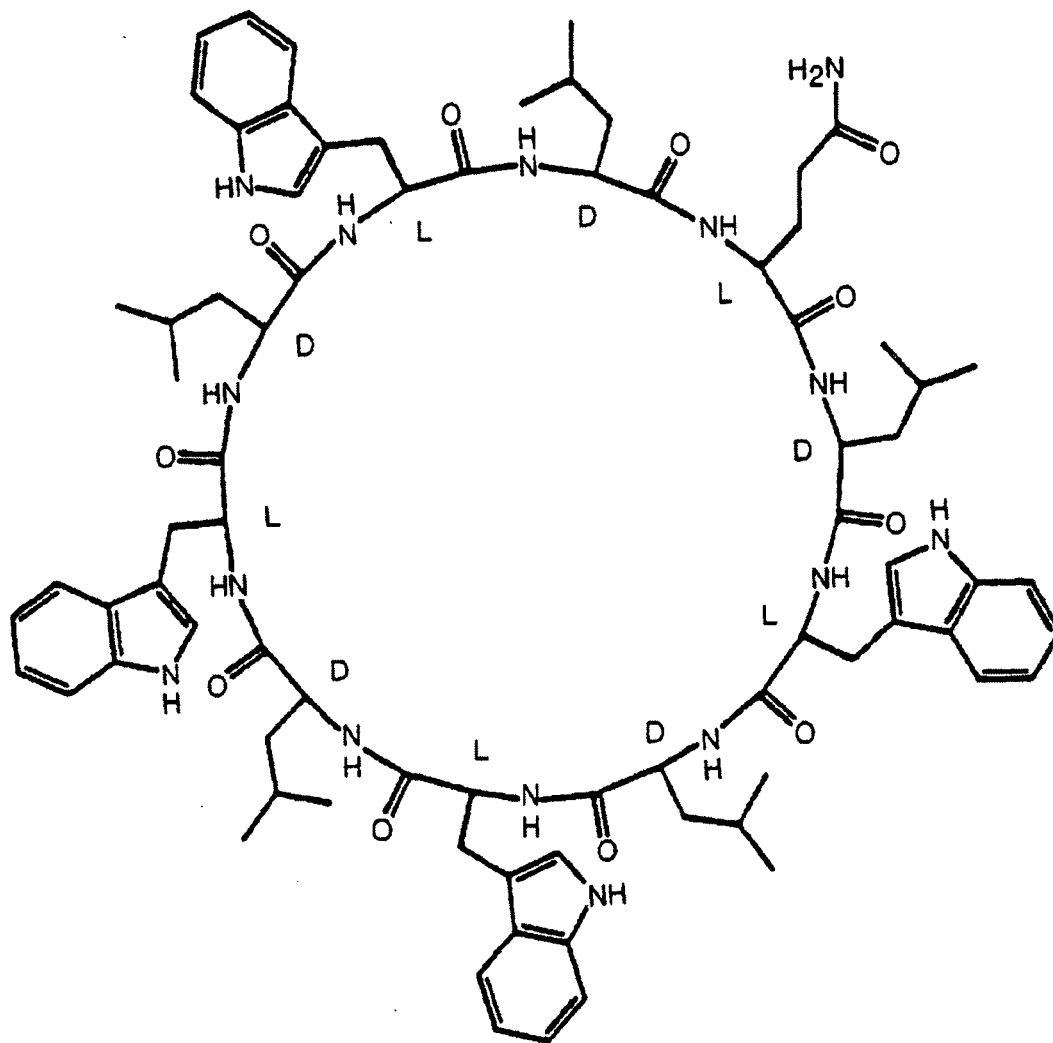


FIG. 27a

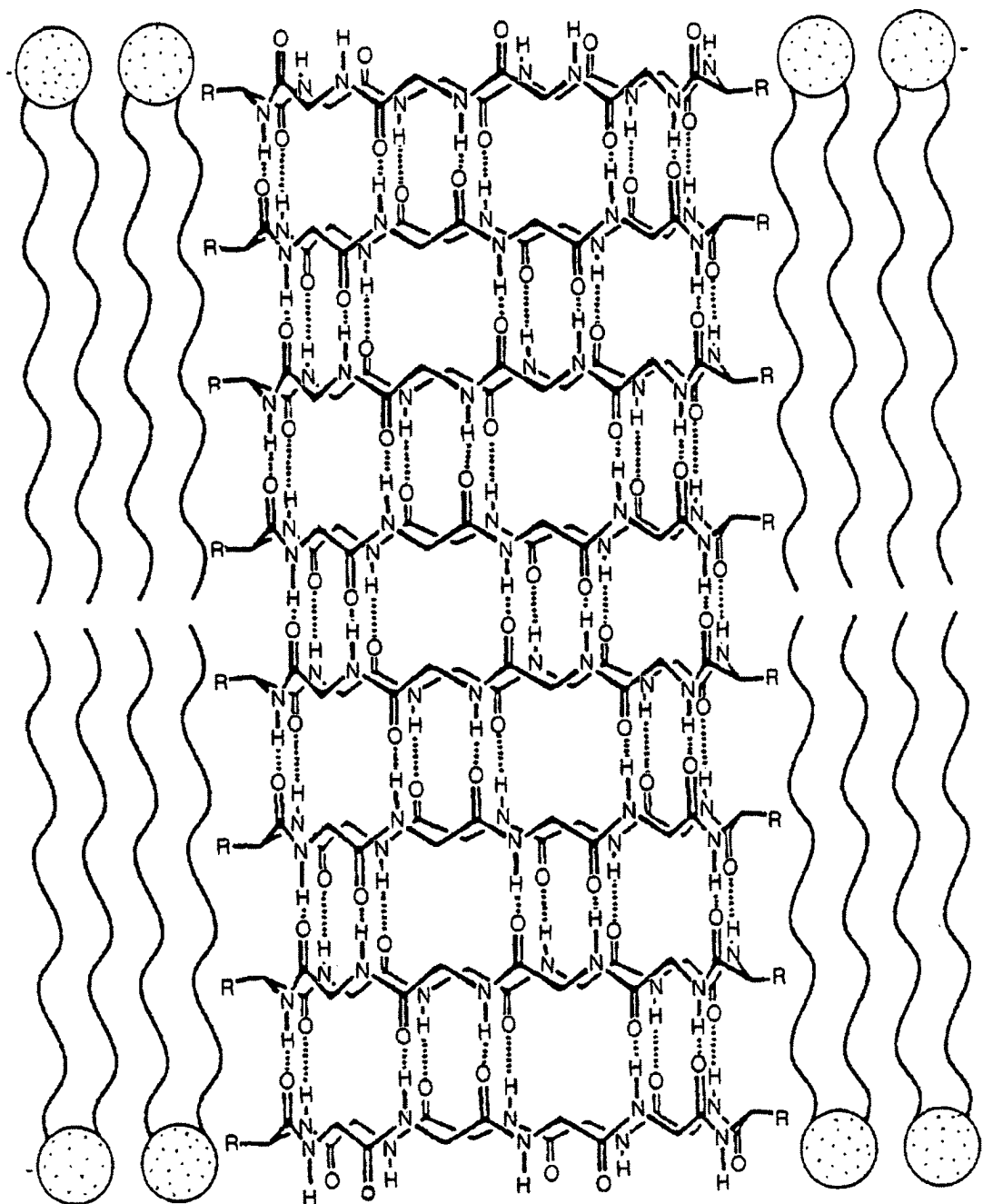
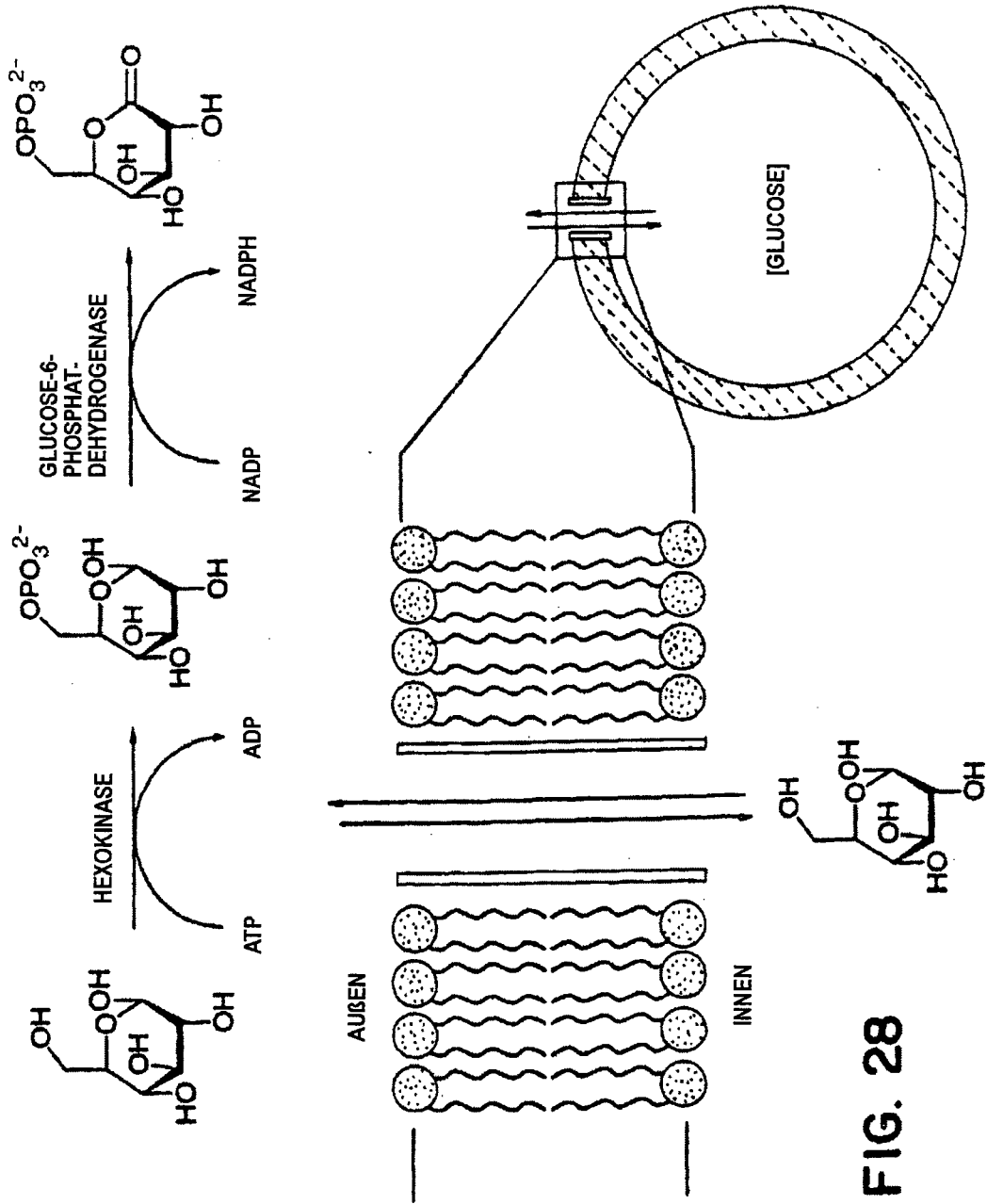


FIG. 27b



**FIG. 28**

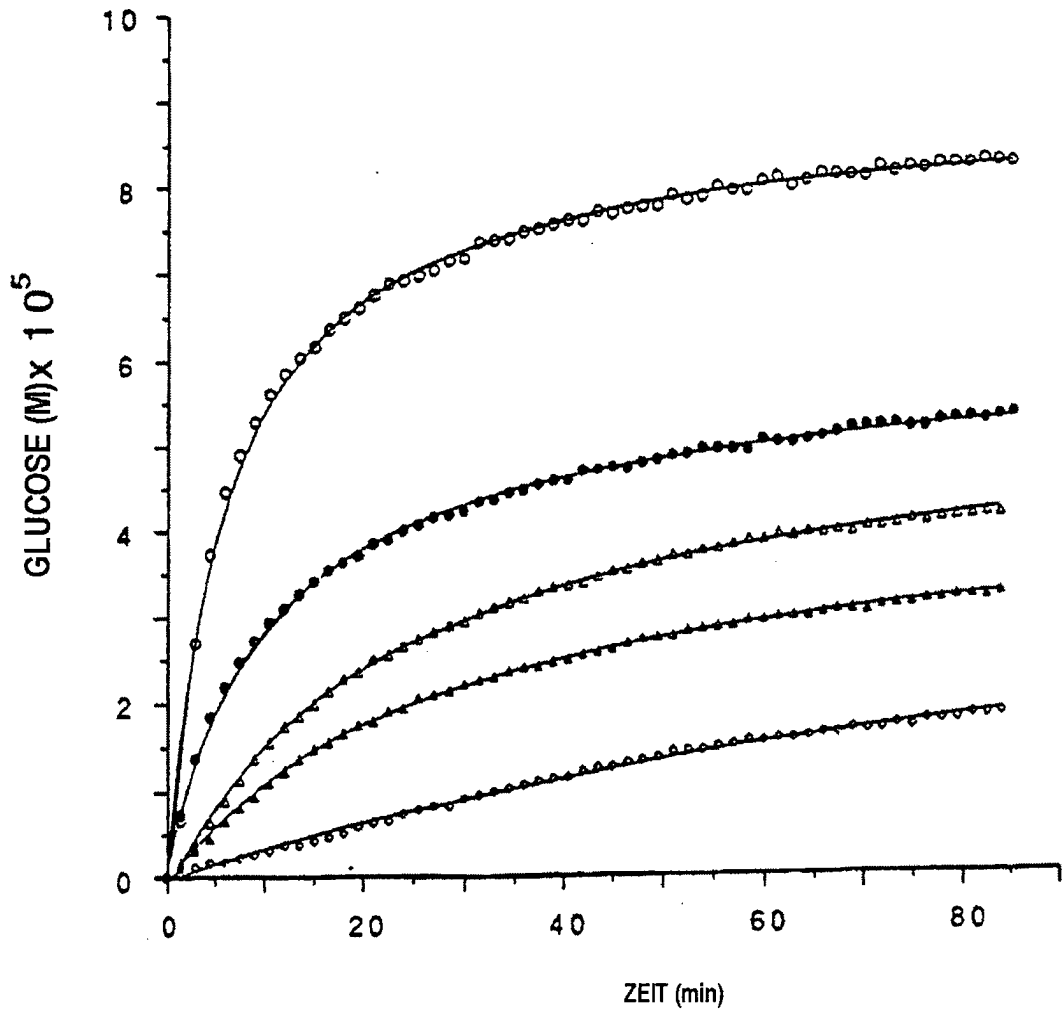


FIG. 29