

# Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV und ihre Anwendung zur Beeinflussung der Glukosetole- ranz in einem Tiermodell des Diabetes Typ 2

DISSERTATION

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

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

von

Dipl.-Biochem. Dagmar Schlenzig  
geb. am 14. November 1967 in Zittau

Gutachter:

1. Prof. Neubert
  2. Prof. Reutter
  3. Dr. habil. Demuth
- Halle (Saale), den 23. 07. 2001

verteidigt am 07. 12. 2001

**urn:nbn:de:gbv:3-000003338**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003338>]

## INHALTSVERZEICHNIS

### Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

### EINLEITUNG

1.1 Die Dipeptidylpeptidase IV	9
1.2 Substratspezifität der DP IV	11
1.3 Inhibitoren der DP IV	11
1.4 Biologische Bedeutung der DP IV	12
1.5 Das Inkretinkonzept	16
1.5.1 <i>Glucose-dependent insulintropic polypeptide</i> (GIP)	17
1.5.2 <i>Glucagon-like peptide-1</i> (GLP-1)	18
1.6 Inkretine und Diabetes Mellitus Typ 2	21
1.7 Zielstellung der vorliegenden Arbeit	24

### SYNTHESE DER UNTERSUCHTEN VERBINDUNGEN

2.1 Aminosäurepyrrolidide und –thiazolidide	26
2.2 Isoleucinderivate	27
2.3 Aminosäurepyrrolidinomethylketone	27
2.4 N-terminal verlängerte Aminosäurethiazolidide – <i>prodrugs</i>	28
2.5 Seitenkettenmodifizierte Glutaminsäurethiazolidide	29
2.6 Darstellung des O-Benzoyl, N-Glycylphenyl-Hydroxylamins	30

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Enzymkinetische Untersuchungen	32
3.1.1 Inhibierung der DP IV und POP mit Aminosäurethiazolididen und –pyrrolididen sowie Isoleucinderivaten	33
3.1.2 Inhibierung der DP IV und POP mit Aminosäurepyrrolidinomethylketonen	36
3.1.3 Inhibierung der DP IV und POP mit N-terminal verlängerten Aminosäurethiazolididen – <i>prodrugs</i>	37
3.1.3.1 N-terminal verlängerte Aminosäurethiazolidide als maskierte Inhibitoren der DP IV	38
3.1.3.2 N-terminal verlängerte Aminosäurethiazolidide als Inhibitoren der POP	44
3.1.4 Inhibierung der DP IV und POP mit seitenkettenmodifizierten Glutaminsäurethiazolididen	45
3.1.5 Selektivität von Isoleucinthiazolidid	48
3.2 Stabilitätsuntersuchungen	49
3.2.1 Stabilität der Aminosäurethiazolidide	49
3.2.2 Nichtenzymatischer Zerfall der Aminosäurepyrrolidinomethylketone	52
3.2.3 Nichtenzymatischer Zerfall des O-Benzoyl, N-Glycylphenyl-Hydroxylamins	54

3.3	Transportstudien an PepT1	54
3.3.1	Inhibitionsstudien mit den synthetisierten Verbindungen an PepT1 exprimierenden <i>Pichia pastoris</i> -Zellen	57
3.3.2	Elektrophysiologische Analyse des Transportverhaltens ausgewählter Verbindungen in PepT1 exprimierenden <i>Xenopus leavis</i> Oozyten	59
3.4	Tierexperimentelle Untersuchungen	61
3.4.1	Ile-Thia-Konzentrationsbestimmung in Plasma	62
3.4.1.1	Indirekte Bestimmung der Ile-Thia-Konzentration in Plasma über die DP IV-Restaktivität	62
3.4.1.2	Versuch der Entwicklung eines verdünnungsunabhängigen DP IV-Aktivitätstests	65
3.4.1.3	Direkte Bestimmung der Ile-Thia-Konzentration in Plasma mittels MS	66
3.4.2	Dosis-Wirkungskurve für die orale Applikation von Ile-Thia	66
3.4.3	Reaktivierung der DP IV im Plasma nach einmaliger oraler Gabe von Ile-Thia	68
3.4.4	Orale Gabe von Ile-Thia an Wistar-Ratten - Einfluß auf die Glukosetoleranz	68
3.4.5	Die Zucker-Ratte – ein Tiermodell für den Diabetes Typ 2 des Menschen	70
3.4.6	Orale Gabe von Ile-Thia an schlanke Zucker-Ratten - Einfluß auf die Glukosetoleranz	71
3.4.7	Orale Gabe von Ile-Thia an adipöse Zucker-Ratten - Einfluß auf die Glukosetoleranz	72
3.4.8	Orale Gabe der <i>prodrugs</i> PITHia und GPITH an Zucker-Ratten - Einfluß auf die Glukosetoleranz	75
3.4.8.1	Orale Bioverfügbarkeit von Ile-Thia aus GPITHia und PITHia in Zucker-Ratten	75
3.4.8.2	Einfluß der <i>prodrugs</i> auf die Glukosetoleranz nach OGTT in Zucker-Ratten	76
3.5	Inhibierung der Dipeptidylpeptidase I mit einer Verbindung aus der Klasse der O-Acyl, N-Peptidyl-Hydroxylamine	79
3.5.1	Bestimmung der 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung der DP I durch GF-NHO-Bz	80
3.5.2	Nachweis der Irreversibilität der Inaktivierung der DP I durch GF-NHO-Bz	82
3.5.3	Bestimmung der Partitionierungskonstanten von GF-NHO-Bz für die DP I	83
3.5.4	Bestimmung der 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung der DP I durch verschiedene N-terminal geschützte und ungeschützte O-Acyl, N-Peptidyl-Hydroxylamine	84
3.5.5	Selektivität von GF-NHO-Bz	85

## ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

### EXPERIMENTELLER TEIL

5.1	Synthese	90
5.1.1	Analytische Methoden	90
5.1.2	Allgemeine Synthesevorschriften	91
5.1.3	Synthese der Aminosäurepyrrolidide und -thiazolidide	94
5.1.3.1	Boc-Aminosäurepyrrolidide und -thiazolidide	94
5.1.3.2	Aminosäurepyrrolidide und -thiazolidide	96
5.1.4	Synthese der Isoleucinderivate	97
5.1.5	Synthese der Aminosäurepyrrolidinomethylketone	97
5.1.6	Synthese der N-terminal verlängerten Aminosäurethiazolidide	98
5.1.7	Synthese der seitenkettensubstituierten Glutaminsäurethiazolidide	99

5.1.7.1	Seitenkettensubstituierte Boc-Glutaminsäurethiazolidide	99
5.1.7.2	Seitenkettenmodifizierte Glutaminsäurethiazolidide	100
5.1.8	Synthese des H-GF-NHO-Bz	101
5.2	Enzymkinetische Methoden	101
5.2.1	Bestimmung der kinetischen Konstanten der enzymkatalysierten Hydrolyse von Substraten	104
5.2.2	Untersuchung der Hemmung der DP IV und POP durch klassische kompetitive Inhibierung	104
5.2.3	Untersuchung der Freisetzung des Ile-Thia und His-Thia aus den <i>prodrugs</i> in Serum bzw. Heparin-Blut	Se- 104
5.2.4	Untersuchung der Hydrolyse der <i>prodrugs</i> Pyr-Ile-Thia, Pyr-His-Thia und Pro-Ile-Thia durch die PAP bzw. LAP	105
5.2.5	Untersuchung der Inaktivierung der DP I durch H-GF-NHO-Bz	105
5.2.6	Untersuchung der Inaktivierung der Cathepsine durch O-Acyl, N-Peptidyl-Hydroxylamine	106
5.2.7	Reversibilitätstest der Inaktivierung	106
5.2.8	Bestimmung der Partitionierungskonstanten der Inaktivierung der DP I durch H-GF-NHO-Bz	106
5.3	Stabilitätsuntersuchungen	107
5.3.1	Untersuchung des nichtenzymatischen Zerfalls der Aminosäurethiazolidide	107
5.3.2	Untersuchung der Stabilität der Aminosäurethiazolidide in biologischen Medien	107
5.3.3	Nichtenzymatischer Zerfall der Aminosäurepyrrolidiniummethylketone	108
5.3.4	Nichtenzymatischer Zerfall des H-GF-NHO-Bz	108
5.4	Tierexperimente	108
5.4.1	Tiere	109
5.4.2	Durchführung des OGTT und der Inhibitorapplikation	109
5.4.3	Blutentnahme	109
5.4.4	DP IV-Aktivitätsbestimmung in Plasma	109
5.4.5	Glukosebestimmung in Plasma	110
5.4.6	Insulinbestimmung in Plasma	110
5.4.7	Statistische Analyse	110
<b>LITERATUR</b>		111
<b>ANHANG</b>		129

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

$\alpha^2_D$	Drehwert
ACE	Acetylcholinesterase
ACN	Acetonitril
ADA	Adenosindeaminase
APM	Aminopeptidase M
APP	Aminopeptidase P
AUC	integrierte Fläche unter der Kurve
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl-
Bz	Benzyl-
CAIBE	Chlorameisensäureisobutylester
CD26 (45, 4)	<i>Cluster of differentiation 26 (45, 4)</i>
d	Duplett
DC	Dünnschichtchromatografie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	doppeltes Duplett
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DHAP	2',6'-Dihydroxyacetophenon
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP I	Dipeptidylpeptidase I
DP II	Dipeptidylpeptidase II
DP IV	Dipeptidylpeptidase IV
DTE	1,4-Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	effektive Konzentration bei halbmaximaler Wirkung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
EE	Essigsäureethylester
EG	Enteroglukagon

ESI-MS	Elektrospray-Massenspektrometrie	
$F_p$	Schmelzpunkt	
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure	
G-AUC	AUC der Glukosekonzentration	
GIP	<i>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>	
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>	
GLP-2	<i>Glucagon-like peptide-2</i>	
gp120	Glykoprotein 120	
GRF	<i>Growth hormone-releasing factor</i>	
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium	hexafluorophosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazine-N'-(2-Ethansulfonsäure)	
HIV-1	<i>Human immuno deficiency virus</i>	
HOSu	N-Hydroxysuccinimid	
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie	
Hyp	Hydroxyprolin	
I	Inhibitor	
i. Vak.	im Vakuum	
I-AUC	AUC der Insulinkonzentration	
IE	Internationale Einheiten	
$k, k_{obs}, k_{app}$	Geschwindigkeitskonstante	
$k_{cat}$	Geschwindigkeitskonstante enzymatischer Reaktion	
KG	Körpergewicht	
$K_i$	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes	
$k_{inact}$	Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung	
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante	
LAP	Leucinaminopeptidase	
LC-MS	Flüssigchromatografie-Massenspektrometrie	
LM	Lösungsmittel	
m	Multipllett	
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>	
MDC	<i>Macrophage-derived chemokine</i>	
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	

MPGF	<i>Major proglucagon fragment</i>
$M_r$	relative Molekülmasse
MW	Molekulargewicht
n. b.	nicht bestimmt
NK-Zellen	<i>Natural killer-Zellen</i>
NMM	N-Methylmorpholin
NP Y	Neuropeptid Y
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
PAP	Pyroglutamylaminopeptidase
PBS	<i>Phosphate buffered salt</i>
PEG	Polyethylenglycol
PG	Proglukagon
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	p-Nitroanilin
POP	Prolylloleptidase
PP	<i>Pancreatic polypeptide</i>
Pyr	Pyroglutaminsäure
Pyrr	Pyrrolidin
PYY	Peptid YY
r	Partitionierungskonstante
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted</i>
RT	Raumtemperatur
$R_t$	Retentionszeit
$R_f$	Retentionsfaktor
s	Singulett
SDF	<i>Stromal derived factor</i>
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$t_R$	Migrationszeit
TBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat
<i>tBu</i>	<i>t</i> -Butyl-
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	<i>Tumor growth factor</i>
THF	Tetrahydrofuran

Thia	Thiazolidin
TMS	Trimethylsilan
TRH	<i>Thyreotropin releasing hormone</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXA2	Thromboxan A2-Rezeptor
v	Geschwindigkeit
$v_i$	Geschwindigkeit bei Anwesenheit eines Inhibitors
$v_o$	Initialgeschwindigkeit
$\lambda$	Wellenlänge
Xaa, Yaa	beliebige proteinogene Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl



# 1 Einleitung

Die Dipeptidylpeptidase IV ist ein multifunktionelles Enzym, das als Peptidase am Katabolismus von Nahrungsproteinen, der Regulation der biologischen Aktivität von Peptiden und als T-Zell-Oberflächenmarker an immunologischen Prozessen beteiligt ist. 1993 wurde von Mentlein und Gallwitz erstmals beschrieben, daß die DP IV die Inkretine GIP (*glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) und GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) *in vitro* abbaut und dadurch deren biologische Aktivität limitiert. Die Inkretine GIP und GLP-1 sind gastrointestinale Peptidhormone, die in strikter Abhängigkeit von der Blutglukosekonzentration die Insulinausschüttung des Pankreas stimulieren. Dieser Zusammenhang warf die Frage auf, ob die Modulation der Aktivität der DP IV mittels Inhibitoren des Enzyms ein geeignetes Konzept zur Therapie des Diabetes Typ 2 des Menschen sein könnte.

Die Hemmung der Serum-Dipeptidylpeptidase IV und die damit verbundene Beeinflussung der Glukosetoleranz über die Verlängerung der biologischen Halbwertszeiten der DP IV-Substrate GIP und GLP-1 sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Deshalb soll in diesem Kapitel ein kurzer Überblick über das Enzym sowie über die mechanistischen Zusammenhänge dieses Konzepts vermittelt werden.

## 1.1 Die Dipeptidylpeptidase IV

Die Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26, ADAp, EC 3.4.14.5) ist eine prolinspezifische Exopeptidase, die 1966 von Hopsu-Havu und Glenner erstmals aus Rattenleber und später auch aus Bakterien, Hefe, Insekten und Pflanzen isoliert worden ist (Yoshimoto, Tsuru et al., 1982; Zevaco, Monnet et al., 1990; Bordallo, Schwenke et al., 1984; Kreil, Haiml et al., 1980; Stano, Kovacs et al., 1994). In Säugern konnte das Enzym in einer ganzen Reihe von unterschiedlichsten Geweben nachgewiesen werden, so vor allem in humaner Plazenta, Niere, Leber, Pankreas und Serum. Die höchsten Aktivitäten wurden in den Bürstensaummembranen des Verdauungstraktes und der proximalen Tubuli der Niere gefunden (Yaron & Naider, 1993).

Das Enzym ist ein homodimeres Membranprotein und gehört zur Klasse der Typ II integralen Membranproteine (Hong & Doyle, 1990). Jede der beiden identischen Untereinheiten hat, in

Abhängigkeit von der Quelle und vom Glykosylierungsgrad des Enzyms, ein Molekulargewicht von 100 000-130 000 (Yaron & Naider, 1993) sowie je ein unabhängiges aktives Zentrum (Küllertz, Fischer et al., 1978). DNA-Vergleiche zeigten innerhalb eukaryotischer Systeme Sequenzhomologien von 85-92% (Reutter, Baum et al., 1995; Misumi, Hayashi et al., 1992; Darmoul, Lacasa et al., 1992). Die Tertiärstruktur des Proteins besteht aus fünf distinkten funktionellen Domänen. N-terminal befindet sich der aus 6 hochkonservierten Aminoacylresten bestehende cytosolische Teil, gefolgt von einer 22 Aminosäuren langen Transmembranregion (Reutter, Baum et al., 1995). Der sich anschließende 738 Aminosäuren umfassende extrazelluläre Teil wird nach Marguet und Bernard (1992) in weitere 3 Domänen unterteilt: eine Glykosylierungsregion mit 9 potentiellen Glykosylierungsstellen, eine cysteinreiche Region und die C-terminale Region, in der sich das aktive Zentrum befindet.

Neben dem membrangebundenen Enzym konnten auch lösliche Formen der DP IV aus humanem Urin (Chikuma, Hama et al., 1990) und Serum (Hino, Nagatsu et al., 1975) isoliert werden. Über die Herkunft der DP IV-Aktivität im Serum wird kontrovers diskutiert. Nach Duke-Cohan und Morimoto (1995, 1996) handelt es sich um ein DP IV-ähnliches Protein (DPPT-L/Attractin), das nach Stimulation von T-Zellen freigesetzt wird und ein Molekulargewicht von 175 000 hat. Dagegen wurde von Durinx und Lambeir (2000) gezeigt, daß 95% der DP IV-Aktivität im Serum aufgrund ihrer biochemischen, enzymatischen und antigenischen Eigenschaften dem CD26 zuzuordnen sind.

Die DP IV ist eine Serinprotease und als solche durch die klassischen Serinprotease-Inhibitoren Diisopropylfluorophosphat und Phenylmethylsulfonylfluorid inaktivierbar (Heins, 1989). Allerdings unterscheidet sie sich in der Anordnung der katalytischen Triade (Ser, Asp, His) und dem Katalysemechanismus von den klassischen Serinprotease-Familien der Subtilisine (Asp, His, Ser) und Chymotrypsine (His, Asp, Ser; Brandt, Thondorf et al., 1996; Rawlings, Polgar et al., 1991). Aufgrund der Sequenzhomologie um den Serylrest im aktiven Zentrum, der Anordnung der katalytischen Triade und der Strukturhomologie im C-terminalen Teil wird die DP IV zusammen mit der Prolyloligopeptidase (EC 3.4.21.26) und der Acylaminoacylpeptidase (EC 3.4.19.1) in die Prolyloligopeptidase-Familie (S9) eingeordnet (Rawlings, Polgar et al., 1991).

## 1.2 Substratspezifität der DP IV

Die DP IV spaltet Dipeptide vom N-Terminus von Peptiden ab, die aus drei oder mehr Aminosäuren bestehen, wenn deren N-terminal vorletzte Position von einem Pro besetzt wird. Es werden auch Ala, Hyp, Ser, Gly, Val und Leu an dieser Stelle akzeptiert, allerdings mit abnehmenden Spezifitätskonstanten (Demuth & Heins, 1995). In der P<sub>2</sub>-Position\* werden alle proteinogenen Aminosäuren toleriert, wobei Aminosäuren mit einer hydrophoben Seitenkette den K<sub>m</sub>-Wert der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse verbessern. Voraussetzung für eine Substraterkennung ist, daß die Aminosäure in der P<sub>1</sub>-Position in der L-Konfiguration vorliegt. Diese Bedingung gilt auch für die P<sub>2</sub>-Position, wenn der S<sub>1</sub>-Bindungsort von einem Pro besetzt wird. Steht ein Ala am S<sub>1</sub>-Bindungsort, werden an der P<sub>2</sub>-Position auch Aminosäuren in der D-Konfiguration toleriert, allerdings nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit ab (Demuth & Heins, 1995). In der P<sub>1</sub>'-Position akzeptiert die DP IV alle proteinogenen Aminosäuren außer Pro, Hyp, N-alkylierten und D-Aminosäuren.

Ein ungeschützter protonierter N-Terminus ist notwendig für die Substraterkennung durch das Enzym (Demuth & Heins, 1995). Eine weitere Voraussetzung für eine Substrathydrolyse durch die DP IV ist das Vorliegen der Xaa-Pro-Peptidbindung in der *trans*-Konformation (Fischer, Heins et al., 1983).

## 1.3 Inhibitoren der DP IV

Die DP IV wird irreversibel aber unspezifisch von den klassischen Serinproteaseinhibitoren DFP, Diethylpyrokarbonat und PMSF gehemmt (Heins, 1989). Neben den Xaa-Pro-Dipeptiden sind das HIV-1 Tat-Protein (Wrenger, Hoffmann et al., 1997) und der N-Terminus des TXA<sub>2</sub>-Rezeptors (Wrenger, Faust et al., 2000) die einzigen bekannten natürlichen Inhibitoren der DP IV. Ihre inhibitorische Wirkung ist auf die N-terminale Xaa-Yaa-Pro-Sequenz zurückzuführen.

Die Hydrolyseprodukte (Xaa-Pro-Dipeptide) des Enzyms sind kompetitive Inhibitoren mit K<sub>i</sub>-Werten zwischen 5 und 100 µM (Rahfeld, 1989; Yaron & Naider, 1993). Entfernt man von diesen Dipeptiden die Carboxylgruppe, so erhält man Aminosäurepyrrolidide, deren Hemmkonstanten um ca. eine Größenordnung besser sind (Rahfeld, 1989; Born, Faust et al., 1994).

---

\*Die Bezeichnung der Aminosäurereste erfolgt nach der Nomenklatur von Schechter & Berger (1967). Danach befindet sich die Aminosäure, deren Carbonylgruppe an der zu hydrolysierenden Peptidbindung beteiligt ist, in der P<sub>1</sub>-Position. Die mit ihrer Aminogruppe an dieser Bindung beteiligte Aminosäure befindet sich in der P<sub>1</sub>'-Position. In N-terminaler Richtung wird die Nummerierung mit P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>...P<sub>n</sub> und in C-terminaler Richtung mit P<sub>1</sub>', P<sub>2</sub>'...P<sub>n</sub>' fortgesetzt. Die entsprechenden Bindungsstellen im Enzym werden mit S<sub>n</sub> bezeichnet.

Weitere Strukturmodifikationen am Pyrrolidinring führen zu einer Abnahme der Affinität der DP IV zu den Verbindungen (Augustyns, Lambeir et al., 1996).

Bei den von Steinmetzer (1991) beschriebenen Aminosäurethiazolididen kommt es zu einer Verbesserung des  $K_i$ -Wertes im Vergleich zu den Aminosäurepyrrolididen um den Faktor 2-5. Aminosäurepyrrolidin-2-nitrile und -2-cyanothiazolidide haben Hemmkonstanten im mikromolaren bis nanomolaren Bereich (Li, Wilk et al., 1995; Ashworth, Atrash et al., 1996).

Substratanaloge Chlormethylketone sind irreversible Inhibitoren der DP IV (Demuth, 1988). Peptidylammoniummethylketone inhibieren die DP IV nach einem *slow-binding*-Mechanismus im mikromolaren Bereich (Steinmetzer, 1991). Durch intramolekulare Reaktionen, induziert durch den freien N-Terminus, existieren Vertreter dieser Verbindungsklassen in wässriger Lösung nur wenige Minuten.

Peptidylboronsäuren sind potente und spezifische reversible Inhibitoren der DP IV. Das ProboroPro ist ein *tight-binding*-Inhibitor des Enzyms und mit einer Hemmkonstante von 16 pM der effektivste aller bekannten Inhibitoren (Gutheil & Bachovchin, 1993). Allerdings sind diese Verbindungen in wässriger Lösung bei neutralem pH-Wert instabil, da sie auch zur Zyklisierung neigen (Sudmeier, Gunther et al., 1994; Kelly, Adams et al., 1993).

Peptidyl-( $\alpha$ -aminoalkyl) Phosphonatester und Diphenylphosphonatester sind stabile und spezifische irreversible DP IV-Inhibitoren mit Inaktivierungskonstanten 2. Ordnung von maximal  $50 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Bodusek, Oleksyszyn et al., 1994; Lambeir, Borloo et al., 1996).

## 1.4 Biologische Bedeutung der DP IV

Die Fähigkeit der DP IV, die den meisten Proteasen unzugängliche Yaa-Pro-Xaa-Bindung zu spalten, macht das Enzym zu einem wichtigen Faktor des Proteinabbaus und der Regulation der Wirksamkeit von biologisch aktiven Peptiden. Außerdem scheint die DP IV durch ihre spezifischen Bindungseigenschaften in immunologische Prozesse involviert zu sein.

### *Die DP IV als Bindungsprotein*

Die DP IV ist identisch mit dem Zelloberflächen-Glykoprotein CD26 auf T-Lymphozyten, aktivierten B-Lymphozyten und NK-Zellen. Es wurde gezeigt, daß das Enzym eine wichtige Rolle bei der Regulation von Differenzierung und Proliferation der Lymphozyten spielt (Fleischer, 1994). Der genaue Mechanismus der kostimulatorischen Aktivität von CD26 ist nicht bekannt. Möglicherweise ist das Enzym durch die Interaktion mit anderen T-Zellantigenen (z.B. CD45, eine Protein-Tyrosin Phosphatase) an der Transduktion von Aktivierungssignalen beteiligt (Toromoto, Dang et al., 1991). Inwieweit die katalytische Aktivität der DP IV bei

diesem Mechanismus eine Rolle spielt, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. So berichteten Tanaka und Kameoka (1993), daß CD26<sup>+</sup> (DP IV<sup>-</sup>)-Jurkat-Zellen eine verringerte Aktivierungsreaktion nach Stimulation zeigten als CD26<sup>+</sup> (DP IV<sup>+</sup>)-Jurkat-Zellen. Dieses Ergebnis konnte von Steeg und Hartwig (1995) nicht bestätigt werden. Auch die Untersuchung des Einflusses von DP IV-Inhibitoren auf die T-Zell-Aktivierung führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. Hegen und Mittrücker (1993) fanden keine Beeinflussung der T-Zell-Aktivierung durch kompetitive und irreversible Inhibitoren der DP IV. Dagegen wurde von Bristol und Bachovchin (1995) ein kostimulatorischer Effekt des DP IV-Inhibitors ProboroPro auf hämatopoetische Zellen beschrieben. Kähne und Lendeckel (1999) zeigten, daß die kompetitiven DP IV-Inhibitoren Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-Thia und Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-Pyrr die mitogen und alloantigeninduzierte T-Zellproliferation, die B-Zelldifferentiation und die Immunglobulinsekretion unterdrückten. Die Freisetzung von immunosuppressivem TGF-β1 wurde stimuliert. Kürzlich beschrieben Wrenger und Faust (2000), daß eine Interaktion der DP IV mit dem TXA<sub>2</sub>-Rezeptor auf Monozyten (Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptor; N-terminale Xaa-Yaa-Pro-Sequenz) zu einer TGF-β1-vermittelten Unterdrückung der T-Zellaktivierung führen könnte.

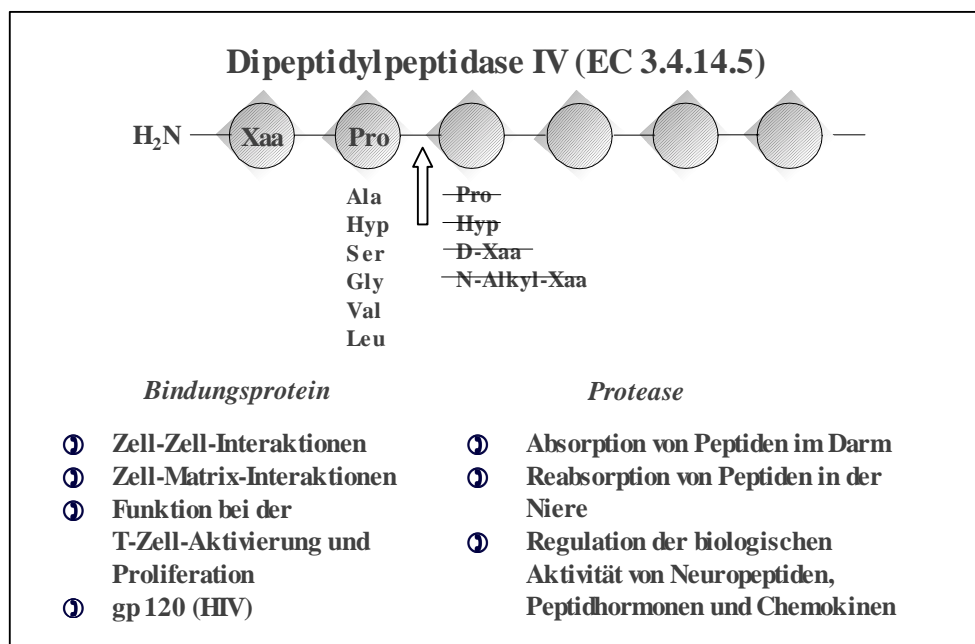


Abbildung 1 Übersicht über Spaltspezifität und physiologische Funktionen der DP IV

Zusammenfassend werden die vorliegenden Daten so interpretiert, daß die enzymatische Aktivität wichtig, aber nicht essentiell notwendig für die kostimulatorische Aktivität von CD26 ist (Fleischer, 1994). Eine Beeinflussung von Funktionen der DP IV im Immunsystem durch kleine Inhibitormoleküle wird von Bonin und Hühn (1998) als wenig wahrscheinlich betrachtet .

Duke-Cohan et al (1998) postulierten, daß auch die lösliche Serum-DP IV kostimulatorisch an der antigenvermittelten T-Zellaktivierung beteiligt und ein wichtiger Immunoregulator ist. Die Hemmung der Enzymaktivität im Serum könnte ein Mittel sein, unerwünschte Autoimmunreaktionen zu reduzieren. Diese These wird von einer Arbeit von Tanaka und Murakami (1997) unterstützt, die zeigen konnten, daß verschiedene oral und subkutan verabreichte DP IV-Inhibitoren die Ausprägung einer Arthritis in einem Tiermodell verhinderten.

An der T-Zell-Oberfläche ist die DP IV mit der Adenosin Deaminase (ADA) assoziiert und wird deshalb auch als ADA-Bindungsprotein bezeichnet (ADAbp; Kameoka, Tanaka et al., 1993; DeMeester, Vanham et al., 1994). Die enzymatische Aktivität beider Enzyme wird durch diese Bindung nicht beeinflußt. Eine Funktion der ADA bei der T-Zellaktivierung im Zusammenhang mit ihrer CD26-Bindungseigenschaft wird kontrovers diskutiert (Martin, Huguet et al., 1995; Richard, Arredondo-Vega et al., 2000).

Eine Beteiligung der DP IV an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen wurde beschrieben. Für Kollagen und Fibronectin konnten zwei separate Bindungsstellen an der DP IV nachgewiesen werden. Kollagen bindet in einer Cystein-reichen Region zwischen den Aminosäuren 238-495, während Fibronectin im Bereich der Aminosäuren 469-479 bindet (DeMeester, Korom et al., 1999). Es wird postuliert, daß die DP IV eine Rolle bei der Tumormetastasierung spielt. Cheng und Abdel-Ghany (1998) zeigten, daß die DP IV der Lungenendothelzellen Rezeptor für metastasierende Brustkrebszellen in der Ratte ist. Ligand ist das Tumorzelloberflächen-assoziierte Fibronectin.

Gegenstand kontroverser Debatten ist eine mögliche Beteiligung der DP IV als Kofaktor von CD4 am Eintritt des HI-Virus in die T-Zellen. Das virale Hüllprotein gp120, verantwortlich für die Bindung des Virus an CD4, trägt im sogenannten V3 *loop* ein stark konserviertes Arg-Pro-, Lys-Pro- und Gly-Pro-Motiv. Dieser Fakt führte zu Hypothesen über eine mögliche Beteiligung der DP IV an der HIV-Infektion. Callebaut und Krust zeigten 1993, daß DP IV-Inhibitoren und gegen die DP IV gerichtete Antikörper die Virusexpression in T-Zellen inhibieren können. Eine Spaltung des gp120 wurde allerdings in keinem Stadium des HIV-Eintritts in die Zelle nachgewiesen. Morimoto und Lord konnten 1994 in ihren Experimenten eine essentielle Rolle der DP IV beim Eintritt des HI-Virus in Zellen nicht bestätigen. Wahrscheinlicher ist eine indirekte Beteiligung der DP IV an der HIV-Infektion durch die proteolytische Modifikation des Chemokines RANTES. Das durch DP IV-katalysierte Hydrolyse entstehende RANTES<sub>3-68</sub> bindet hochaffin an den CCR5-Rezeptor. Dieser Rezeptor wird neben CD4 als Kofaktor vom HI-Virus für den Eintritt in die Wirtszelle genutzt. RANTES<sub>3-68</sub> kompetitiert mit HIV-1 um die Bindung an CCR5 und hemmt somit den viralen Infektionsmecha-

nismus (Schols, Proost et al., 1998; DeMeester, Korom et al., 1999; Ohtsuki, Tsuda et al., 2000). Möglicherweise ist die DP IV auch für die immunosuppressive Wirkung von Tat verantwortlich. Das HIV-1-Tat-Protein ist für die Transaktivierung und Replikation der viralen Gene notwendig. Es konnte gezeigt werden, daß Tat an CD26 bindet und die DP IV-Aktivität und die antigenstimulierte Lymphozytenproliferation hemmt (Wrenger, Hoffmann et al., 1997; Gutheil, Subramanyam et al., 1994).

#### *Die DP IV als Protease*

Vor allem Peptide mit Pro an der dem N-Terminus benachbarten Sequenzposition können durch die DP IV als Stickstoffquelle für den Organismus verfügbar gemacht oder ihre biologische Aktivität reguliert werden.

Als membranständiges Enzym der Endothelzellen der Bürstensaummembran in Niere und Darm ist die DP IV gemeinsam mit anderen Peptidasen zum einen für die Reabsorption von Peptiden (Niere) und zum anderen für die Absorption von Nahrungsproteinen (Darm) verantwortlich. Das Enzym stellt vor allem Xaa-Pro- und Xaa-Ala-Dipeptide bereit, die anschließend über spezifische Peptidtransporter aus dem Lumen in die Zellen aufgenommen werden können (Brandsch, Ganapathy et al., 1995).

Zahlreiche Peptidhormone, Neuropeptide und Chemokine besitzen prolinreiche Regionen oder einen Prolylrest an einer für die Regulation der biologischen Aktivität dieser Polypeptide entscheidenden Position. Da nur wenige Proteasen in der Lage sind, diese Prolin-Peptidbindungen zu hydrolysieren, sind diese Peptide somit vor dem proteolytischen Abbau durch unspezifische Proteasen geschützt. Bisher wurde eine große Anzahl von biologisch aktiven Peptiden, die natürliche Substrate der DP IV *in vitro* darstellen, gefunden. Für viele dieser Peptidhormone (GLP-1, GIP, GRF), Neuropeptide (Enterostatin, NPY, Substanz P, PP, PYY) und Chemokine (RANTES, MDC, SDF) konnte gezeigt werden, daß ein intakter N-Terminus essentielle Voraussetzung für die Bindung an spezifische Rezeptoren und die Auslösung ihrer biologischen Antwort *in vitro* ist (Siegel, Gallwitz et al., 1999; Yip & Wolf, 2000; Frohmans, Downs et al., 1989; DeMeester, Korom et al., 1999; Bouras, Huneau et al., 1995; Ahmad, Wang et al., 1992; Mentlein, Dahms et al., 1993; Heymann & Mentlein, 1978). Inwieweit die DP IV auch *in vivo* die Bioaktivität dieser Peptide reguliert, ist meist noch ungeklärt.

Einen enormen Wissenszuwachs gab es in den letzten Jahren bezüglich der *in vivo*-Bedeutung der DP IV-Substrateigenschaften der Inkretine GIP (*glucose-dependent insulinotropic polypeptide*, Sequenz siehe *Abbildung 2*) und GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*, Sequenz siehe *Abbildung 3*). Die biologisch aktiven Peptide GIP<sub>1-42</sub> und GLP-1<sub>7-36</sub>amid sind zwei gastrointesti-

nale Hormone, die in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Blut die Insulinausschüttung an den  $\beta$ -Zellen des Pankreas stimulieren. Beide Hormone haben eine N-terminale Xaa-Ala-Sequenz und sind Substrate der DP IV. Mentlein und Gallwitz zeigten 1993 erstmals, daß die Peptide *in vitro* von humaner gereinigter Plazenta-DP IV zu den entsprechenden biologisch inaktiven Spaltprodukten GIP<sub>3-42</sub> und GLP-1<sub>9-36</sub> abgebaut werden. Aus der Inkubation der Peptide mit humanem Serum resultierten die gleichen Spaltprodukte, deren Bildung durch spezifische DP IV-Inhibitoren verhindert werden konnte. Diese Ergebnisse führten zu der Schlußfolgerung, daß die Inaktivierung der Inkretine GIP und GLP-1 durch DP IV auch *in vivo* von physiologischer Bedeutung sein könnte.

Deacon und Nauck (1995) konnten diese These unterstützen, indem sie nach intravenöser Verabreichung von exogenem GLP-1<sub>7-36</sub> am Menschen den inaktiven Metaboliten GLP-1<sub>9-36</sub> nachwiesen. Kiefer und McIntosh (1995) untersuchten die biologische Halbwertszeit der Inkretine mittels HPLC und unter Verwendung von [<sup>125</sup>I]-GIP bzw. [<sup>125</sup>I]-GLP-1 in Ratten. Sie konnten zeigen, daß bereits nach 2 min mehr als 50 % der Peptide in ihrer inaktiven Form vorlagen. Dagegen wurde nach Inkubation der Inkretine mit dem Serum von DP IV-negativen Ratten nach 20 min nur intaktes Peptid gefunden. Die DP IV konnte damit als eine die Bioaktivität der Inkretine GIP und GLP-1 limitierende Peptidase identifiziert werden.

## 1.5 Das Inkretinkonzept

Schon sehr zeitig wurde erkannt, daß die Sekretion einiger Pankreashormone von aus dem Darm stammenden Faktoren beeinflusst wird. Unger und Eisentraut prägten 1969 für diesen Zusammenhang den Begriff der „Enteroinsular-Achse“. Bestandteil dieser Enteroinsular-Achse ist der sogenannte Inkretineffekt. Dieser beschreibt nach Creutzfeldt (1979) das Phänomen, daß oral verabreichte Glukose zu einer stärkeren Insulinausschüttung führt, als eine intravenöse Glukoseinfusion, die den gleichen glykämischen Effekt zeigt. Bis zu 60% (Mensch) der Insulinsekretion nach einem oralen Glukosetoleranztest (OGTT) sind nicht auf die unmittelbare Einwirkung von Glukose auf die  $\beta$ -Zellen der Langerhansschen Inseln, sondern auf die nahrungstimulierte Sekretion und insulinotrope Wirkung von Darmhormonen zurückzuführen (Nauck, Homberger et al., 1986; Perley, Kipnis et al., 1967). Heute ist allgemein anerkannt, daß für diesen Effekt die beiden gastrointestinalen Peptide GIP und GLP-1 verantwortlich sind (Fehmann, Göke et al., 1989).



### 1.5.1 *Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)*

GIP (ursprünglich *gastric inhibitory polypeptide*) wurde 1970 erstmals von Brown und Pederson als ein die Sekretion der Magensäure inhibierendes Peptid isoliert. Kurz darauf konnte von Dupre und Ross (1973) die glukoseabhängige insulintrope Wirkung dieser Substanz nachgewiesen werden, was zu einer Umbenennung in *glucose-dependent insulintropic polypeptide* führte.

Immunozytochemische Untersuchungen haben ergeben, daß GIP von den K-Zellen der Mucosa des proximalen Bereichs des gastrointestinalen Trakts (Duodenum und Jejunum) sezerniert wird (Polak, Bloom et al., 1973; Buchan, Polak et al., 1978). Die GIP-Sekretion wird durch Kohlenhydrate über einen noch nicht näher bekannten Mechanismus stimuliert. Auch von langkettigen Triglyzeriden, Fettsäuren und einigen Aminosäuren konnte gezeigt werden, daß sie potente Stimulatoren der GIP-Freisetzung sind (O'Dorisio, Cataland et al., 1976; Ohneda, Koayashi et al., 1984; Kwasowski, Flatt et al., 1985; Schulz, Jorde et al., 1982).

Neben seiner pankreatischen Wirkung wird auch ein extrapancreatischer Effekt des GIP diskutiert.

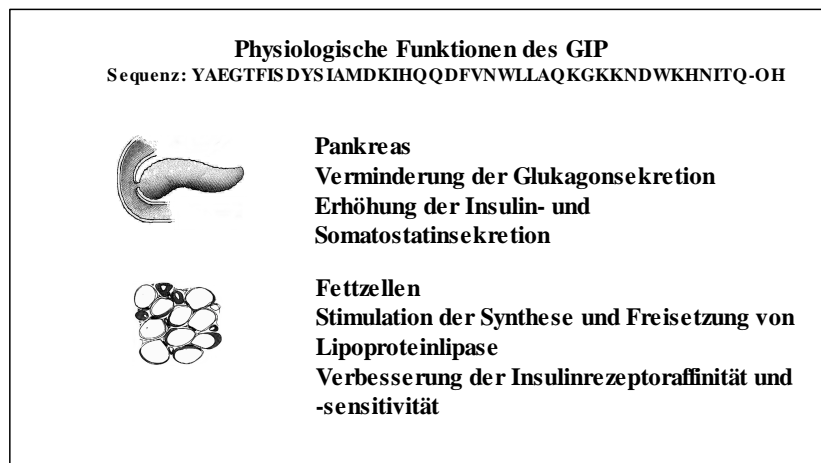


Abbildung 2 Übersicht über die physiologischen Funktionen des GIP (*glucose-dependent insulintropic polypeptide*)

#### *Pankreatische Wirkung*

GIP zeigt eine strikt glukoseabhängige insulintrope Wirkung an den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Es verstärkt die Insulinfreisetzung und stimuliert die Proinsulin-Genexpression. Außerdem wird ihm ein schwacher positiver Effekt auf die Somatostatinfreisetzung aus den  $\delta$ -Zellen des Pankreas zugeschrieben (Fehmann, Göke et al., 1995). Möglicherweise ist die inhibitorische Wirkung des GIP auf die Magensäuresekretion ein indirektes Ergebnis dieser Stimulation der Somatostatinfreisetzung (McIntosh, Pederson et al., 1981). Eine ganze Reihe von Forschern

haben den Effekt von GIP auf die  $\alpha$ -Zellen der Langerhans Inseln und eine direkte Beeinflussung der Glukagonfreisetzung untersucht. In Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen und den verwendeten Tiermodellen kamen sie zu unterschiedlichen Ergebnissen (Pederson, Brown et al., 1978; Elahi, Andersen et al., 1979; Opara, Go et al., 1991). Nachdem von Moens und Heimberg (1996) GIP-Rezeptoren auf den  $\alpha$ -Zellen identifiziert worden sind, ist ein direkter Einfluß von GIP auf die Glukagonsekretion denkbar, bedarf aber noch der experimentellen Bestätigung.

#### *Extrapankreatische Wirkung*

Die GIP-Rezeptorexpression wurde außer in pankreatischen Zellen auch in verschiedenen anderen Geweben (Herz, Fettgewebe, Gehirn, Dünndarm und Magen) nachgewiesen (Morgan, 1996).

Seit bekannt ist, daß Produkte des Fettstoffwechsels die Sekretion von GIP stimulieren, wird GIP eine Rolle im Fettmetabolismus zugesprochen. Die von Eckel und Fujimoto (1979) gefundene Stimulierung der Synthese und Freisetzung der Lipoprotein-Lipase in Preadipozyten konnte *in vivo* bestätigt werden (Wasada, McCorkle et al., 1981; Ebert, Nauck et al., 1991). Von einer fettreichen Diät wurde gezeigt, daß sie sowohl zu einer erhöhten nahrungstimulierten GIP-Sekretion, als auch zu einer vermehrten GIP-mRNA-Expression führte (Higashimoto, Opara et al., 1995).

Kontrovers diskutiert wird der direkte Einfluß von GIP auf die Blutglukosekonzentration unabhängig von der insulinotropen Wirkung des Hormons. Es konnte gezeigt werden, daß GIP die hepatische Glukoseproduktion reduziert (Andersen, Sun et al., 1984; Hartmann, Ebert et al., 1986). Da in Leberzellen kein GIP-Rezeptor nachgewiesen worden ist, ist dieser Effekt wahrscheinlich auf die Modulation der Glukagonsekretion durch das GIP an den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas zurückzuführen (Morgan, 1996). An isolierten Rattenadipozyten fördert GIP durch Verbesserung der Insulinrezeptoraffinität und -sensitivität den insulinstimulierten Glukosetransport (Starich, Bar et al., 1985).

#### **1.5.2 *Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)***

GLP-1 wurde, anders als GIP, durch molekularbiologische Techniken entdeckt, bevor seine biologische Bedeutung bekannt war. GLP-1 ist ein Produkt des Proglukagons (PG<sub>1-160</sub>), welches sowohl von den  $\alpha$ -Zellen der Langerhansschen Inseln, als auch von den L-Zellen der Mukosa des distalen Bereichs des gastrointestinalen Trakts (Ileum, Kolon, Rektum) exprimiert wird (Bell, Santerre et al., 1983; Orskov, Rabenhoi et al., 1994). In Abhängigkeit vom

Expressionsort wird  $PG_{1-160}$  zu unterschiedlichen Produkten prozessiert. In den  $\alpha$ -Zellen entsteht hauptsächlich Glukagon und ein Fragment ( $PG_{72-158}$ , auch MPGF - *major proglucagon fragment*), dessen biologische Funktion nicht näher bekannt ist. In den L-Zellen des distalen gastrointestinalen Trakts sind die Hauptprodukte der posttranslationalen Prozession des  $PG_{1-160}$  das Enteroglukagon ( $EG_{1-69}$ , auch Glicentin), GLP-1 und GLP-2 (Orskov, Holst et al., 1987). Die biologisch aktive Form des von den L-Zellen produzierten GLP-1 ist das N-terminal verkürzte  $GLP-1_{7-36}$ , welches als C-terminal amidiertes Peptid vorliegt (Holst, Orskov et al., 1987). In geringem Umfang wird es auch als nichtamidiertes  $GLP-1_{7-37}$  freigesetzt, das hinsichtlich seiner insulinotropen Wirkung mit  $GLP-1_{7-36}$  vergleichbar ist (Orskov, Wettergreen et al., 1993). Im folgenden ist mit dem Inkretin GLP-1 immer das  $GLP-1_{7-36}$  amid gemeint.

Die Sekretion von GLP-1 durch die L-Zellen des distalen gastrointestinalen Trakts (Ileum) wird durch Kohlenhydrate und Fettkomponenten in der Nahrung stimuliert. Die GLP-1-Sekretion beginnt unmittelbar nach der Nahrungsaufnahme (5-10 min), wenn es im unteren Abschnitt des gastrointestinalen Trakts noch keinen Kontakt mit den Nahrungsbestandteilen gegeben haben kann. Deshalb nimmt man an, daß neuronale Signale und Darmhormone aus dem proximalen Darmabschnitt für die GLP-1-Freisetzung verantwortlich sind (Herrmann, Göke et al., 1995). So konnte von Neurotransmittern des enteralen Nervensystems und Darmpeptiden (Bethanecol, Bombesin, CGRP-*calcitonin gene related peptide*, GRP-*gastrin releasing peptide*) gezeigt werden, daß sie die GLP-1-Sekretion stimulieren (Brubaker, 1991). Ein weiterer potenter Stimulus der GLP-1-Sekretion in Nagetieren ist das GIP (Roberge, Brubaker et al., 1993). Dieser Zusammenhang konnte jedoch im Menschen nicht nachgewiesen werden (Nauck, 1998).

Der GLP-1-Rezeptor gehört zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembranregionen (Thorens, 1992). Er wird von den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Zellen (Fehmann & Haberner et al., 1991; Heller, Kieffer et al., 1997) der Langerhans Inseln, in Lunge, Herz, Magen und in bestimmten Bereichen des Gehirns exprimiert (Wei & Mojsov, 1995). Seine Existenz in Leber, Skelettmuskeln und Fettgewebe ist umstritten. Der Rezeptor ist spezifisch für GLP-1, und es konnten bisher nur zwei Peptide in der Echse *Heloderma suspectum* gefunden werden, die antagonistisch (Exendin<sub>9-39</sub>) und agonistisch (Exendin-4) auf den GLP-1-Rezeptor wirken (Thorens, Porret et al., 1993).

Ähnlich wie bei GIP werden für GLP-1 eine pankreatische und eine extrapancreatische Wirkung diskutiert.

### *Pankreatische Wirkung*

Neben seiner glukoseabhängigen insulinotropen Wirkung nach Nahrungsaufnahme, beeinflußt das GLP-1 auch die Sekretion anderer Inselzellhormone. Die Glukagonsekretion wird durch GLP-1 inhibiert, die Somatostatinausschüttung aktiviert (Orskov, Holst et al., 1988). Die inhibitorische Wirkung des GLP-1 auf die Glukagonausschüttung (glukagonostatischer Effekt) wurde bisher als sekundärer Effekt der Stimulation der Insulin- und Somatostatinausschüttung betrachtet. Nachdem Heller und Kieffer 1997 der Nachweis des GLP-1-Rezeptors auf  $\alpha$ -Zellen gelungen ist, erscheint ein direkter Einfluß des GLP-1 auf die Glukagonsekretion als wahrscheinlich.

Jüngste Untersuchungen zeigen, daß GLP-1 im Pankreas auch die Funktion eines Wachstumsfaktors hat. So stimuliert der GLP-1-Agonist Exendin-4 die Neogenese und Proliferation von  $\beta$ -Zellen (Xu, Stoffers et al., 1999). Stoffers und Kieffer (2000) gelang der Nachweis, daß GLP-1 direkt die Expression von IDX-1 stimuliert. IDX-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Entwicklung des Pankreasgewebes und die Regulation der Transkription des Insulingens notwendig ist.

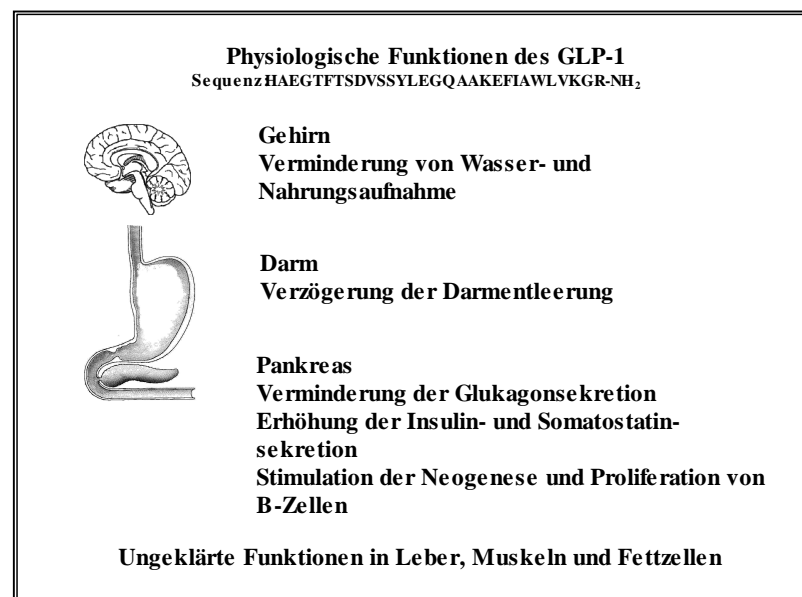


Abbildung 3 Übersicht über die physiologischen Funktionen des GLP-1 (glucagon-like peptide-1)

### *Extrapankreatische Wirkung*

Es konnte gezeigt werden, daß GLP-1 die Darmentleerung verlangsamt und infolge dessen die Sekretion von Darm- und Pankreasenzymen inhibiert wird. Möglicherweise hat das GLP-1 einen endokrinen Effekt auf die Motilität des proximalen gastrointestinalen Trakts. Dadurch wird die Geschwindigkeit der Darmpassage verringert, nachdem der Nahrungsbrei das Ileum erreicht hat (*ileal brake*, Ahrén, 1998).

Tang-Cristensen und Larsen (1996) zeigten, daß durch eine intrazerebroventrikuläre Injektion von GLP-1 in Ratten deren Nahrungsaufnahme inhibitorisch beeinflußt wird. Dieser Effekt konnte durch den GLP-1-Rezeptorantagonisten Exendin<sub>9-39</sub> verhindert werden. Da sowohl der GLP-1-Rezeptor im Hypothalamus als auch die Expression von PG<sub>1-160</sub> bzw. GLP-1 in bestimmten Bereichen des Gehirns nachgewiesen worden sind, ist eine zentrale Beteiligung von GLP-1 an der Regulation von Appetit und Nahrungsaufnahme sehr wahrscheinlich (Orskov, Tang-Christensen et al., 1996).

Ebenso kontrovers wie im Falle des GIP wird der direkte Einfluß des GLP-1 auf die Blutglukosekonzentration unabhängig von seiner insulinotropen Wirkung diskutiert (Freyse, Knospe et al., 1999; Sandhu, Wiesenthal et al., 1999; Forbes, Elliott et al., 1998). Von Gutniak und Holst (1992) wurde ein direkter Effekt von GLP-1 auf die Insulinsensitivität in Patienten mit Diabetes Typ 1 beschrieben. Diese Ergebnisse konnten von der gleichen Arbeitsgruppe an gesunden Menschen und an Patienten mit Diabetes Typ 2 nicht bestätigt werden (Orskov, Holst et al., 1996; Ahrén, Larsson et al., 1997). Auch ein Einfluß des GLP-1 auf die Glukoseeffektivität konnte nicht nachgewiesen werden (Vella, Shah et al., 2000). Allgemein akzeptiert ist, daß GLP-1 die Blutglukosekonzentration durch Modulation der Insulin/Glukagon-Rate beeinflußt. Ein direkter peripherer insulinunabhängiger Effekt kann nicht ausgeschlossen werden, bedarf aber umfassender Bestätigung durch den schlüssigen Rezeptor- bzw. Mechanismusnachweis in den entsprechenden Geweben.

## **1.6 Inkretine und Diabetes Mellitus Typ 2**

Nachdem man das Potential der Inkretine bezüglich ihres glukoseabhängigen insulinotropen Effekts erkannt hatte, stellte sich die Frage, inwieweit sich diese Peptide therapeutisch zur Behandlung von Diabetes nutzen lassen. Dabei konzentriert man sich hauptsächlich auf das GLP-1, da die Kombination seiner glukagonostatischen mit seiner insulinotropen Wirkung einen größeren Anteil am Inkretineffekt impliziert.

Die Verfügbarkeit von endogenem Insulin ist Voraussetzung dafür, daß die insulinotrope Wirkung des GLP-1 nach der Nahrungsaufnahme zum Tragen kommen kann. Damit sind Patienten mit Diabetes Typ 2 primäre Zielgruppe für eine potentielle Behandlung mit GLP-1. Für den Diabetes Typ 2, auch Altersdiabetes, sind eine erhöhte Insulinresistenz und/oder das verminderte und verzögerte Ansprechen der  $\beta$ -Zellen der Langerhans Inseln des Pankreas charakteristisch (Gross, Schölmerich et al., 1994).

Abnorme zirkulierende GIP- und GLP-1-Konzentrationen könnten zur Pathophysiologie und Dysfunktion der Insulinsekretion beim Diabetes Typ 2 des Menschen beitragen. Eine ganze

Reihe von widersprüchlichen Ergebnissen wurden dazu veröffentlicht (Coxe, O'Dorisio et al., 1981; Osei, Falko et al., 1986; Nauck, Stöckmann et al., 1986; Mazzaferri, Starich et al., 1985; Villsboll, Krarup et al., 2001A). Wahrscheinlich ist eine verringerte GLP-1-Sekretion in Patienten mit Diabetes Typ 2 eine Folge des Diabetes. So konnte gezeigt werden, daß Personen mit gestörter Glukosetoleranz ohne Anzeichen, aber mit einer Prädisposition zur Ausbildung eines manifesten Diabetes, nur eine leichte Abnahme der GLP-1-Sekretion im Vergleich zu Gesunden zeigten. Dagegen findet man im manifesten Typ 2-Diabetiker eine deutlich verminderte GLP-1-Ausschüttung (Holst & Deacon, 1998). Durch Untersuchungen an eineiigen Zwillingen, die diskordant für Diabetes Typ 2 sind, konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Vaag, Holst et al., 1996). Allerdings könnte eine gestörte Inkretinfunktion auch eine primäre Ursache für die Ausbildung eines Diabetes Typ 2 sein. So wurde in einigen Personen eine verminderte oder sogar fehlende insulinotrope Wirkung von GIP nachgewiesen, obwohl die GIP-Sekretion normal oder sogar erhöht war (Nauck, Heimesaat et al., 1993). Diese Störung wird auf eine fehlerhafte GIP-Rezeptorexpression zurückgeführt (Holst, Gromada et al., 1997).

Obwohl es nach wie vor umstritten ist, ob abnorme zirkulierende Inkretinkonzentrationen zur Ätiologie von Diabetes Typ 2 beitragen oder ob es sich um kompensatorische Mechanismen handelt, konnte in den letzten 10 Jahren gezeigt werden, daß die Gabe von exogenem GLP-1 das Potential zum Therapeutikum von Diabetes Typ 2 des Menschen hat. Intravenöse und subkutane Injektionen von GLP-1 führten zu einer Erniedrigung von postprandialen und basalen Blutglukosekonzentrationen bei Typ 2-Diabetikern und damit zu einer Verbesserung der Glukosetoleranz (Nauck, Heimesaat et al., 1993; Nathan, Schreiber et al., 1992; Gutniak, Holst et al., 1992; Rachman, Gribble et al., 1996; Ritzel, Schulte et al., 2001). Dieser Effekt konnte auch über einen Zeitraum von 7 Tagen ohne Anzeichen von Tachyphylaxie aufrecht erhalten werden (Larsen, Jallad et al., 1996).

Da die insulinotrope und wahrscheinlich auch die glukagonostatische Wirkung des GLP-1 streng glukoseabhängig sind, konnte bei Typ 2-Diabetikern nach subkutaner Gabe von GLP-1 kein Eintritt eines hypoglykämischen Zustandes beobachtet werden (Villsboll, Krarup et al., 2001B). Lediglich nach teilweiser Magenresektion und dem damit verbundenen schnellen Eintritt der Nahrung in den Dünndarm (*dumping syndrom*) wurde eine abnorm hohe GLP-1-Sekretion beobachtet, deren hyperinsulinämische Wirkung zur Hypoglykämie führte (Toft-Nielsen, Madsbad et al., 1998). Damit würde eine Therapie des Diabetes Typ 2 mit GLP-1 einen wesentlichen Vorteil gegenüber den bisher verwendeten, die Plasmainsulinkonzentration erhöhenden Therapeutika aufweisen. Diese Therapeutika (Insulin, Sulfonylharnstoffe wie

Glibenclamid) wirken unabhängig vom Blutglukosespiegel des Patienten und bergen deshalb das Risiko der Ausbildung eines hypoglykämischen Zustandes in sich.

Obwohl Patienten mit Diabetes Typ 1 über kein endogenes Insulin verfügen, verringert GLP-1 ihren postprandialen Blutglukosespiegel (Dupre, Behme et al., 1995). Dieser Effekt ist auf die Verringerung der Plasmaglukagonkonzentration und die Verzögerung der Darmentleerung zurückzuführen (Creutzfeldt & Kleine, 1996). Vella und Shah (2001) zeigten kürzlich, daß GLP-1 während eines hyperglykämischen und hyperinsulinämischen Zustandes die totale Glukoseaufnahme bei Typ 1-Diabetikern erhöht. Damit ist GLP-1 in Kombination mit exogenem Insulin auch ein potentielles Therapeutikum des Diabetes Typ 1. Nähere Untersuchungen dazu und inwieweit GLP-1 als Wachstumsfaktor in der Lage ist, defekte Pankreasfunktionen in Typ-1-Diabetikern zu regenerieren, sind jedoch notwendig.

Trotz der erwiesenen Wirksamkeit von GLP-1 bei der Verbesserung der Glukosetoleranz in Patienten mit Diabetes Typ 2 gibt es bisher noch kein Therapeutikum auf GLP-1-Basis. Einerseits sind die Herstellungskosten eines entsprechenden Therapeutikums sehr hoch, da nur die nahezu vollständige Sequenz des GLP-1 wirksam ist (Parker, Andrews et al., 1998). Andererseits ist die Applikation des Peptids bisher nur subkutan oder intravenös möglich und bietet somit keinen Vorteil zur Insulintherapie. Die extrem kurze Halbwertszeit des Peptides nach intravenöser Injektion (ca. 4 min) schränkt die therapeutische Effizienz des GLP-1 ebenfalls stark ein. Das Peptid wird sehr rasch von der DP IV zum inaktiven GLP-1<sub>9-36</sub> abgebaut. Deshalb gehen die Bemühungen derzeit dahin, zum einen Vehikel für GLP-1 zu entwickeln, die zu einer konstanten und langsamen Freisetzung nach einmaliger Gabe der Substanz führen. Zum anderen wird versucht, durch Variation der N-terminal vorletzten Aminosäure des GLP-1 abbaustabile Derivate zu synthetisieren (Deacon, Knudsen et al., 1998; Knudsen, Nielsen et al., 2000). Burcelin und Dolci (1999) konnten zeigen, daß die Affinität von GLP-1-Gly<sub>8</sub> zum GLP-1-Rezeptor zwar leicht vermindert ist, aber das Peptid in diabetischen Mäusen eine verbesserte insulinotrope Wirkung im Vergleich zum Wildtyp-GLP-1 zeigt. Von dem GLP-1-Rezeptoragonisten Exendin-4 konnte ebenfalls ein positiver Einfluß auf die postprandiale Blutglukosekonzentration nachgewiesen werden (Young, Gedulin et al., 1999). Ein zusätzlicher Vorteil der Verabreichung von abbaustabilen GLP-1-Analoga ist die Verhinderung der Bildung von GLP-1<sub>9-36</sub>. Dieses Produkt der DP IV-katalysierten Hydrolyse des GLP-1<sub>7-36</sub> ist ein Antagonist des GLP-1-Rezeptors (Knudsen & Pridal, 1996) und damit der insulinotropen Wirkung des GLP-1 entgegen gerichtet.

Ein anderer Weg, die Abbaustabilität der Inkretine *in vivo* zu erhöhen, wird seit 3 Jahren von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit R. Pederson in Vancouver, Kanada verfolgt.

Nachdem bekannt war, daß der rasche Abbau der Inkretine im Serum durch die DP IV die biologische Aktivität der Peptide limitiert, lag es nahe, die Verfügbarkeit an endogenem GLP-1 und auch GIP durch Hemmung dieses Enzyms zu erhöhen. Pauly und Demuth (1999) konnten in HPLC-Studien zeigen, daß exogenes [<sup>125</sup>I]-GLP-1<sub>7-36</sub> in Ratten bei vorheriger intravenöser Injektion des DP IV-Inhibitors Ile-Thiazolidid innerhalb von 5 Minuten keinem N-terminalen Abbau unterliegt. Dagegen wurde in Kontrolltieren ohne Inhibitorinjektion das verabreichte [<sup>125</sup>I]-GLP-1<sub>7-36</sub> nahezu vollständig zum GLP-1<sub>9-36</sub> metabolisiert. Zusätzlich wurde der Einfluß von Ile-Thiazolidid (intravenöse Injektion) auf Plasmaglukose- und –insulinkonzentration nach einer intraduodenalen oder intravenösen Glukoseapplikation untersucht. Nach intravenöser Glukoseapplikation wurden keine Unterschiede in den Glukose- und Insulinprofilen zwischen inhibitorbehandelten und Kontrolltieren gefunden. Nach der duodenalen Glukoseapplikation änderte sich die Gesamtmenge des sezernierten Insulins nicht, allerdings war das Insulinmaximum unter Ile-Thiazolidid-Einfluß zeitlich um etwa 10 min vorverlegt. Im Glukoseprofil zeigte sich, daß nach einem initial vergleichbaren Anstieg die Glukosekonzentration bei den inhibitorbehandelten Tieren schneller als bei den Kontrolltieren abfiel. Die maximale Plasmaglukosekonzentration und der integrierte Glukosewert waren kleiner.

## 1.7 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Die in der Einleitung vorgestellten Untersuchungsergebnisse waren ein erster Hinweis darauf, daß die Inhibierung der Serum-DP IV ein wirksames Mittel sein könnte, die Stabilität der Inkretine GIP und GLP-1 *in vivo* zu erhöhen. Dieser Zusammenhang könnte für ein neuartiges Therapiekonzept des Diabetes Typ 2 genutzt werden. Deshalb sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit an einem Tiermodell des Diabetes Typ 2 untersucht werden, ob oral verfügbare kompetitive Inhibitoren der DP IV die Glukosetoleranz nach einem oralen Glukosetoleranztest (OGTT) positiv beeinflussen.

Die DP IV als ubiquitär verteiltes Enzym ist in eine ganze Reihe von physiologischen Prozessen involviert (siehe 1.4). In zahlreichen Geweben und Organen wurden natürliche Substrate des Enzyms nachgewiesen. Eine ungerichtete und dauerhafte Inhibierung des Enzyms *in vivo* könnte daher zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Deshalb sollte versucht werden, durch geringfügige Strukturänderungen an Aminosäurepyrrolididen und –thiazolididen, deren Stabilität unter physiologischen Bedingungen zu verringern.



---

Um instabile potentielle DP IV-Inhibitoren besser handhaben zu können, braucht man geeignete Methoden, derartige Verbindungen präapplikativ zu stabilisieren. Deshalb sollten Vorläufermoleküle (*prodrugs*) entwickelt werden, aus denen der wirksame DP IV-Inhibitor erst nach der oralen Einnahme freigesetzt wird.

Die DP IV ist eine im Blut und im Lumen des Dünndarms lokalisierte Peptidase. In beiden Kompartimenten befinden sich interessante natürliche Substrate des Enzyms. Deshalb sollte nach Möglichkeiten gesucht werden, DP IV-Inhibitoren zu synthetisieren, die eine kompartmentgerichtete Inhibierung des Enzyms möglich machen.

Nach der kinetischen Charakterisierung der synthetisierten Inhibitoren sollten mit ausgewählten Verbindungen folgende Experimente *in vivo* an der Ratte durchgeführt werden:

- Untersuchung der oralen Bioverfügbarkeit von DP IV-Inhibitoren
- Untersuchung des Einflusses von DP IV-Inhibitoren auf die Glukosetoleranz nach OGTT in Tieren mit gesundem Stoffwechsel (Wistar-Ratten)
- Untersuchung des Einflusses von DP IV-Inhibitoren auf die Glukosetoleranz nach OGTT in einem Tiermodell des Diabetes Typ 2 (Zucker-Ratten).

Neben Insulin ist auch Glukagon ein wichtiges Hormon der Regulation der Glukosehomöostase im Blut. Bisher wurde angenommen, daß die DP I (Cathepsin C) in der Leber für die Inaktivierung des Glukagons verantwortlich ist. In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, daß das Glukagon ein natürliches Substrat der DP IV darstellt. Mittels eines selektiven DP I-Inhibitors sollte eine Beteiligung der DP I an der Inaktivierung von Glukagon im Serum ausgeschlossen werden. Deshalb sollte ein spezifischer und irreversibler Inhibitor der DP I synthetisiert und umfassend kinetisch charakterisiert werden.

## 2 Synthese der untersuchten Verbindungen

Alle Peptidsynthesen wurden, wenn nicht anders erwähnt, entsprechend den in der Peptidchemie allgemein üblichen Methoden ausgeführt (siehe 5.1.2; Houben-Weyl, 1974).

### 2.1 Aminosäurepyrrolidide und -thiazolidide

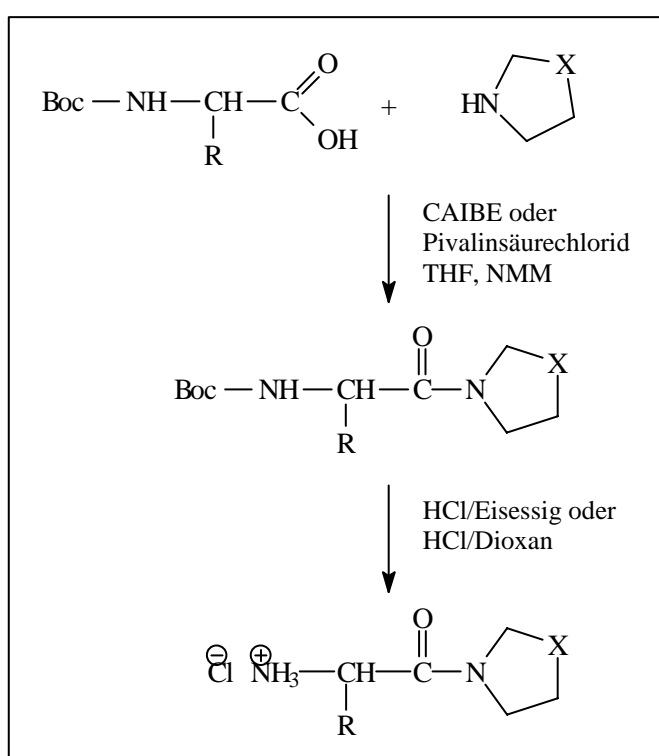


Abbildung 4 Allgemeines Syntheschema der Darstellung von Aminosäurepyrrolididen ( $X = \text{CH}_2$ ) und -thiazolididen ( $X = \text{S}$ )

Die Boc-geschützten Derivate von Isoleucin und Prolin wurden nach dem Mischanhydridverfahren nach Aktivierung mit Chlorameisensäureisobutylester mit Pyrrolidin bzw. Thiazolidin gemäß *Abbildung 4* zu den gewünschten Aminosäurethiazolididen und -pyrrolididen umgesetzt. Zweifach Boc-geschütztes Histidin sowie die Boc-geschützten  $\omega$ -Methylester von Glutaminsäure und Asparaginsäure wurden ebenfalls unter Verwendung von Chlorameisensäureisobutylester umgesetzt. Für die Synthese der entsprechenden Asparaginderivate kam als Aktivierungsreagenz Pivalinsäurechlorid zur Anwendung. In diesem Fall konnte auf eine Blockierung der Amidseitenkettenfunktion des Asparagins verzichtet werden. Die Methylester

des N-terminal geschützten Glutaminsäure- und Asparaginsäurepyrrolidids und -thiazolidids wurden durch basische Hydrolyse entfernt. Durch acidolytische Abspaltung der Boc-Schutzgruppen wurden die entsprechenden N-terminal ungeschützten Aminosäurethiazolidide und -pyrrolidide als Hydrochloride erhalten. (Abschnitt 5.1.3 im experimentellen Teil).

## 2.2 Isoleucinderivate

Das Isoleucin wurde neben Pyrrolidin und Thiazolidin auch mit Azetidin und Piperidin als Aminokomponente umgesetzt. Hierbei kam ebenfalls das Mischanhydridverfahren mit Chlorameisensäureisobutylester als Aktivierungsreagenz zum Einsatz.

Die N-terminal ungeschützten Verbindungen wurden nach acidolytischer Abspaltung der Boc-Schutzgruppen erhalten (siehe 5.1.4 im experimentellen Teil).

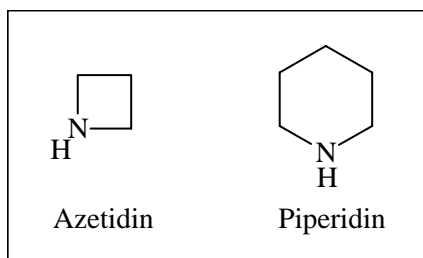


Abbildung 5 Strukturformeln von Azetidin und Piperidin

## 2.3 Aminosäurepyrrolidinomethylketone

Für die Darstellung der Aminosäurepyrrolidinomethylketone wurde ein von T. Steinmetzer (1991) beschriebenes Verfahren zur Herstellung von Peptidylammoniummethylketonen angewandt. Die Z-geschützten Derivate von Isoleucin und Prolin wurden nach Aktivierung mittels Mischanhydridverfahren unter Verwendung von Chlorameisensäureisobutylester als Aktivierungsreagenz durch Zugabe von Diazomethan in die Diazomethylketone überführt. Diese wurden ohne weitere Aufarbeitung durch Zugabe von HCl/Ether in die Chlormethylketone umgewandelt, und ließen sich anschließend mit Pyrrolidin zu den entsprechenden Aminosäurepyrrolidinomethylketonen umsetzen. Durch acidolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppen waren die N-terminal ungeschützten Verbindungen zugänglich (siehe 5.1.5 im experimentellen Teil).

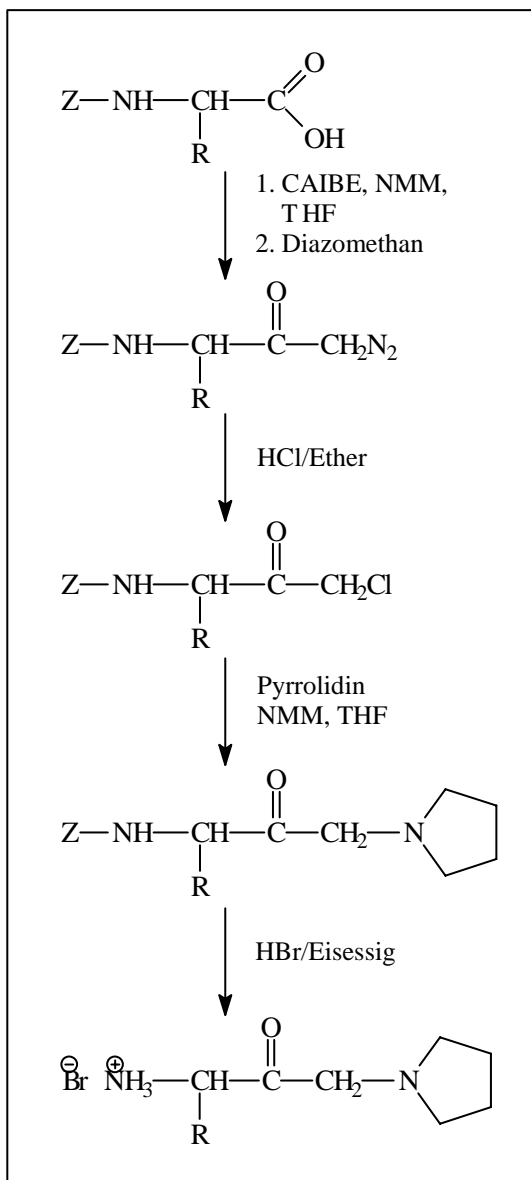


Abbildung 6 Allgemeines Syntheschema für die Darstellung der Aminosäurepyrrolidinomethylketone

## 2.4 N-terminal verlängerte Aminosäurethiazolidide – prodrugs

Die Salze der Verbindungen Isoleucin- und Histidinthiazolidid (siehe 2.1) wurden entsprechend *Abbildung 7* unter Anwendung der Mischanhydridmethode N-terminal verlängert. Dabei kam mit einer Ausnahme Chlorameisensäureisobutylester als Aktivierungsreagenz zum Einsatz. Die Kupplung des Boc-geschützten Pyroglutaminsäurederivats an Histidinthiazolidid erfolgte mit Pivalinsäurechlorid. Dadurch konnten Nebenreaktionen an der ungeschützten Imidazolfunktion minimiert, aber nicht vollständig ausgeschlossen werden, so daß eine anschließende Reinigung an einer Kieselgelsäule notwendig war. Die N-terminalen Boc-Schutzgruppen wurden acidolytisch entfernt (siehe 5.1.6 im experimentellen Teil).

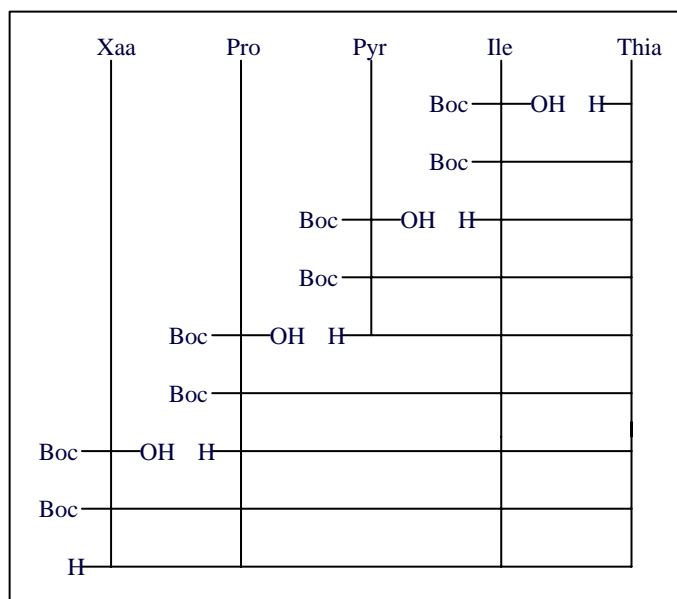


Abbildung 7 Allgemeines Syntheschema des schrittweisen Aufbaus der Peptidyl-Isoleucinthiazolidide, Xaa=Ile, Pro oder Gly

## 2.5 Seitenkettenmodifizierte Glutaminsäurethiazolidide

Die Verbindung Boc-Glutaminsäurethiazolidid (siehe 2.1) wurde an der  $\gamma$ -Carbonsäurefunktion durch Einführung verschieden großer Gruppen entsprechend **Tabelle 1** weiter modifiziert. Dabei kamen zwei verschiedene Kupplungsmethoden zum Einsatz. Zum einen wurde mit HBTU als Kupplungsreagenz der Aminopolyethylenglycolmethylether (Molekulargewicht  $\approx 8000$ ) bzw. unter Verwendung der Mischanhydridmethode mit Chlorameisensäureisobutylester als Aktivierungsreagenz der Glycyl-*tert.*-butylester eingeführt. Um die Polyglycinketten zu kuppeln, wurde das Boc-Glutaminsäurethiazolidid mittels Carbodiimidmethode in den Succinimidester überführt und anschließend in wässriger basischer Lösung mit den entsprechenden ungeschützten Glycinderivaten zu den gewünschten Verbindungen umgesetzt. Als letzter Schritt erfolgte die acidolytische Deblockierung der N-Termini. Im Falle des Boc-Glu(GlytBu)-Thiazolidids wurde hierbei auch gleichzeitig der

**Tabelle 1** Übersicht über die synthetisierten Glutaminsäurethiazolidid-Derivate als Inhibitoren der DP IV und POP

<i>Inhibitoren der DP IV</i>	<i>Inhibitoren der POP</i>
H-Glu(Gly)-Thia	Boc-Glu(GlytBu)-Thia
H-Glu(Gly <sub>3</sub> )-Thia	Boc-Glu(Gly <sub>3</sub> )-Thia
H-Glu(Gly <sub>5</sub> )-Thia	Boc-Glu(Gly <sub>5</sub> )-Thia
H-Glu(PEG)-Thia	Boc-Glu(PEG)-Thia

*t*-Butylester entfernt, so daß die vollständig ungeschützte Verbindung erhalten werden konnte (siehe 5.1.7 im experimentellen Teil).

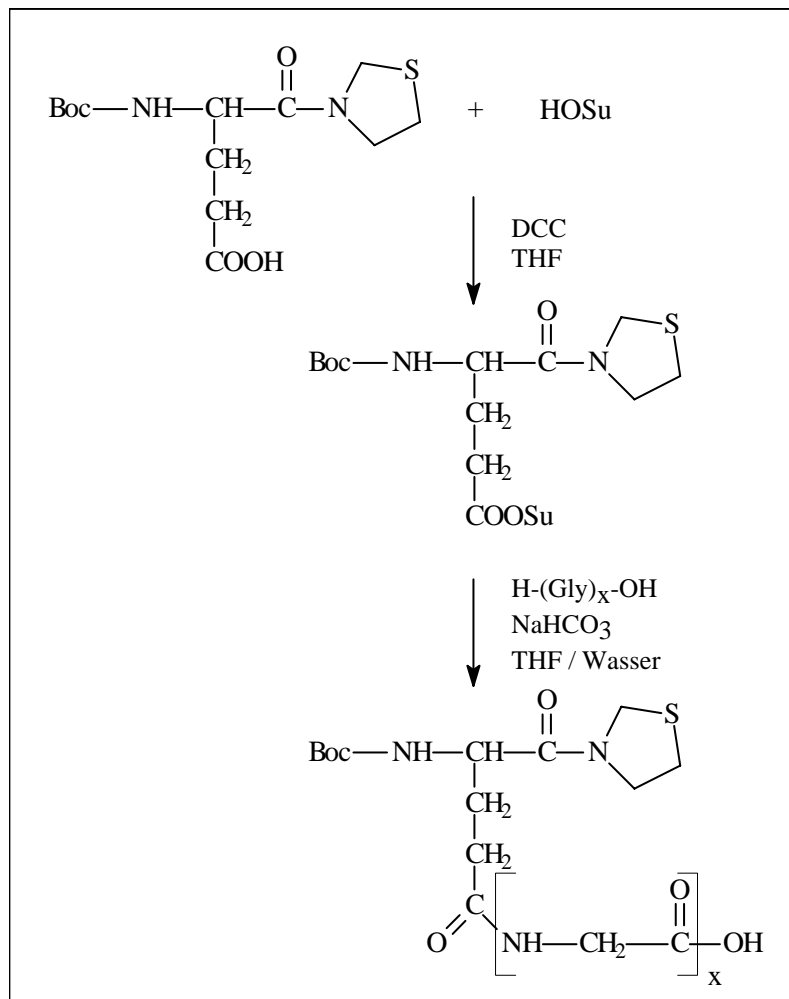


Abbildung 8 Allgemeines Syntheschema der Darstellung von mit Gly<sub>x</sub> modifiziertem Boc-Glutaminsäurethiazolidid,  $x = 1, 3$  und  $5$

## 2.6 Darstellung des O-Benzoyl, N-Glycylphenyl-Hydroxylamins

Als potentiell irreversibler Inhibitor der DPI wurde O-Benzoyl, N-Glycylphenyl-Hydroxylamin dargestellt. Dazu wurde das Boc-geschützte Glycinderivat mittels Carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid in den Aktivester überführt. Dieser reagierte mit Phenylalanin zum C-terminal ungeschützten Dipeptid, welches ebenso zum Boc-Gly-Phe-OSu umgesetzt wurde. Der Aktivester wurde mit Hydroxylamin in das N-Peptidyl-Hydroxylamin überführt und anschließend nach C. Schaper (1986) mit Benzoylchlorid O-acyliert (Abbildung 9). Das Produkt ließ sich durch acidolytische Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in die N-terminal ungeschützte Zielverbindung umwandeln (siehe 5.1.8 im experimentellen Teil).

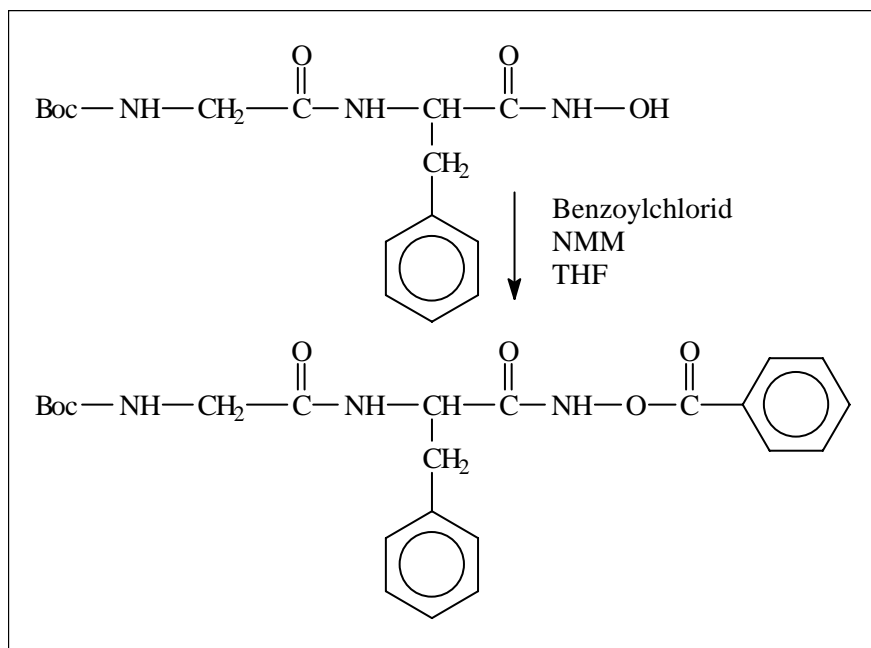


Abbildung 9 Acylierung des N-terminal geschützten N-Glycylphenyl-Hydroxylamins mit Benzoylchlorid zum Boc-geschützten O-Benzoyl, N-Glycylphenyl-Hydroxylamin

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Enzymkinetische Untersuchungen

Alle im Rahmen dieser Arbeit als potentielle Inhibitoren der DP IV synthetisierten Verbindungen (mit Ausnahme des Isoleucinazetidids und Isoleucinpiperidids) enthalten an der P<sub>1</sub>-Position einen Pyrrolidin- oder Thiazolidinrest. Sie sind also strukturelle Abkömmlinge der N-terminalen Spaltprodukte der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse, welche wiederum schwache kompetitive Inhibitoren des Enzyms sind. Die Entfernung des Carboxylterminus von diesen Peptiden führt zu einer Erhöhung der Affinität des Enzyms zu den resultierenden Aminosäurepyrrolididen. Die Verbesserung der Inhibierungskonstanten der Pyrrolidinderivate im Vergleich zu den Prolinverbindungen wird von Brandt und Lehmann (1995) nach theoretischen Konformationsstudien mit der energetischen Bevorzugung der cis-Konformation durch Xaa-Pro-Dipeptide erklärt. Diese Konformation entspricht nicht der Erkennungskonformation der DP IV (Fischer, Heins et al., 1983).

Die hier vorgestellten Substanzen sind als potentielle kompetitive Inhibitoren der DP IV anzusehen. Die N-terminal geschützten Synthesestufen der DP IV-Inhibitoren sind potentielle Inhibitoren der Prolylolylopeptidase (auch Prolylendopeptidase, POP, PEP, EC 3.4.21.26). Deshalb wurde die Inhibierung der POP-katalysierten Substrathydrolyse durch diese Verbindungen ebenfalls untersucht. Die Prolylolylopeptidase ist eine Endopeptidase und gehört wie die Dipeptidylpeptidase IV zu den prolylinspezifischen Enzymen. Sie ist ein zytosolisches ubiquitär verteiltes Enzym und konnte in Mikroorganismen, Pilzen, Insekten, Pflanzen und in einer Vielzahl von Säugern nachgewiesen werden. Die Prolylolylopeptidase ist ein monomeres Enzym mit einem Molekulargewicht von 62 000-77 000 und gehört wie die DP IV zur Klasse der Serinproteasen und zur Familie der Prolylolylopeptidasen (S9). Die POP hydrolysiert Peptidbindungen C-terminal von Prolin oder Alanin, benötigt aber im Gegensatz zur DP IV eine besetzte P<sub>3</sub>-Position. Aufgrund ihrer Spaltspezifität wird der POP eine Rolle bei der Metabolisierung von Neuropeptiden (Substanz P, NP Y, TRH, Oxytocin, Vasopressin) zugesprochen. Nachgewiesen werden konnte dies für die Neuropeptide Angiotensin und Bradykinin (Ferrario & Iyer, 1998; Dendorfer, Vordermark et al., 1997). Die Beteiligung der POP an Lern- und Gedächtnisprozessen (Yoshimoto, Kado et al., 1987; Huston, Ha-



senohrl et al., 1993; Shinode, Miyazaki et al., 1999; Uvnas-Moberg, Eklund et al., 2000) sowie ihre kontrovers diskutierte Rolle bei der Genese der Alzheimer'schen Krankheit (Toide, Shinoda et al., 1997; Shinoda, Toide et al., 1997; Johnston, Jensen et al., 1999) machen das Enzym und die Entwicklung von potenten Inhibitoren der POP zu einem interessanten Gegenstand der Forschung.

Im optischen Test mit GPpNA (DP IV) bzw. GPPpNA (POP) als Substrate wurde der Einfluß der synthetisierten Verbindungen auf die enzymkatalysierte Substrathydrolyse durch die DP IV und die POP untersucht. Dabei wurden 3 verschiedene Substratkonzentrationen mit mindestens 3 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen kombiniert. Die Hydrolysegeschwindigkeit der Substrate wurde UV/VIS-spektroskopisch anhand der Extinktionszunahme infolge der pNA-Freisetzung bei 390 nm oder 405 nm verfolgt. Die Auftragung der erhaltenen Daten in einem DIXON-Diagramm und die Berechnung mit einem linearen Regressionverfahren führte zu den entsprechenden Hemmkonstanten. Durch Sekundärauftragung der aus dem DIXON-PLOT abgeleiteten Anstiege gegen die reziproke Substratkonzentration (nach Bisswanger, 1994) konnte bei allen untersuchten Inhibitoren eine kompetitive Hemmung bestätigt werden

### **3.1.1 Inhibierung der DP IV und POP mit Aminosäurethiazolididen und -pyrrolididen sowie Isoleucinderivaten**

Die Aminosäurepyrrolidide und -thiazolidide sind als effektive kompetitive Inhibitoren der prolinspezifischen Peptidasen DP IV und POP schon seit längerem bekannt. Die Einführung eines Schwefelatoms in den Pyrrolidinring (Thiazolidin) führt zu einer Erhöhung der Affinität der Enzyme zu den Verbindungen um den Faktor 2-5 im Vergleich zu den entsprechenden Pyrrolidin-Derivaten. So wurden von Rahfeld (1990) für Ile-Pyrr als Inhibitor der DP IV aus Schweineniere ein  $K_i$  von 243 nM und von Steinmetzer (1990) für Ile-Thia ein  $K_i$  von 126 nM bestimmt. Als bisher bester kompetitiver Inhibitor der POP wurde Z-Thiopropio-Thia mit einem  $K_i$  von 0,36 nM (für POP aus Rinderhirn) von Tsuru und Yoshimoto (1988) beschrieben. Auch ist bekannt, daß ein großer hydrophober Rest in der Seitenkette der Aminosäure in P<sub>2</sub>-Position zu einer Verbesserung der Affinität der Enzyme zu den Verbindungen führt (Rahfeld, 1994). Das erklärt die sehr guten Hemmkonstanten des Ile-Thia im Vergleich zu anderen bisher untersuchten Thiazolidin-Derivaten (z. B. Ala-Thia 3,39 µM).

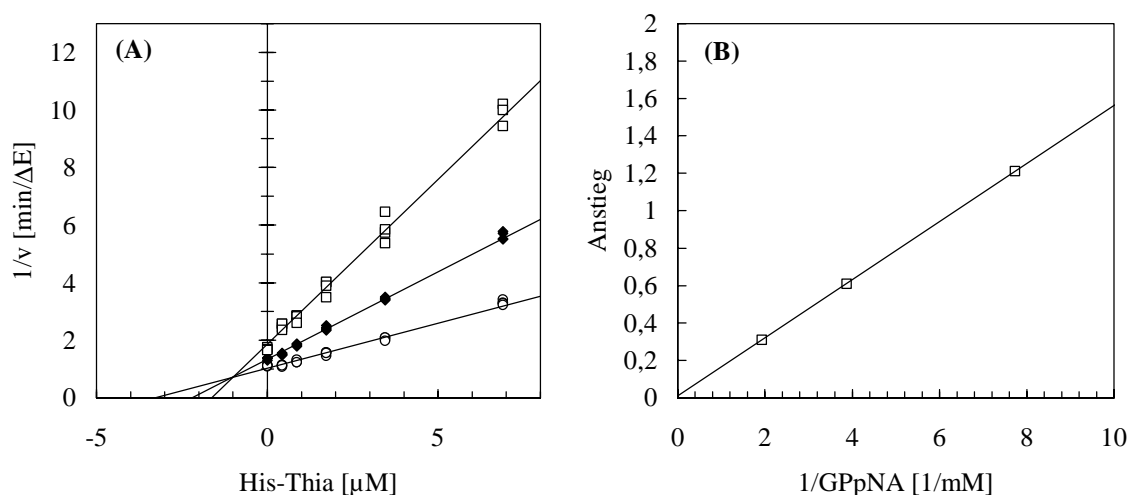
Im Rahmen der Entwicklung eines DP IV-Inhibitors als potentielles orales Therapeutikum zur Behandlung von Diabetes Typ 2 ist es sinnvoll, die Wirkung eines solchen Inhibitors auf den unmittelbaren Zeitraum der Nahrungsaufnahme zu beschränken. Da die DP IV ein multifunk-

tionelles Enzym ist, das unter anderem auch bei der Immunantwort eine Rolle spielen könnte, ist eine dauerhafte Blockierung ihrer Spaltfunktion im Hinblick auf mögliche Nebenwirkungen nicht erwünscht.

Die hier vorgestellten N-terminal freien Verbindungen sind mit dem Ziel synthetisiert worden, Strukturen zu finden, die sich in biologischen Systemen instabiler verhalten als die bisher bekannten Derivate (z. B. Ile-Thia, Val-Thia) und trotzdem effiziente Inhibitoren der DP IV darstellen. Mit gleichem Ziel wurden die an der P<sub>1</sub>-Position variierten Isoleucinderivate synthetisiert. Ursprünglich war eine umfangreichere Zahl von Variationen der Struktur an P<sub>1</sub>-Position geplant. Eine 1997 erschienene Arbeit von Augustyns und Lambeir beschreibt die Synthese von DP IV-Inhibitoren mit variierten Ringgröße und geöffneten Ringstrukturen in P<sub>1</sub>-Position. Sie zeigten, daß die entsprechenden Modifikationen zu einem Effektivitätsverlust im Vergleich zum Isoleucinthiazolidid führten. Deshalb wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Die beiden synthetisierten Isoleucinderivate mit variierten P<sub>1</sub>-Position sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

Die angestrebte Instabilität der Verbindungen sollte einerseits durch Einführung von Aminosäuren mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette in die P<sub>2</sub>-Position und eine damit eventuell intramolekular katalysierte Zerfallsreaktion erzielt werden. Andererseits sollte die Erhöhung der Ringspannung des Substituenten in P<sub>1</sub>-Position zu einer erhöhten Instabilität führen.

*Abbildung 10* Inhibierung der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GPPNA ( $\exists = 0,13 \text{ mM}$ ,  $\& = 0,26$



*mM*,  $I = 0,52 \text{ mM}$ ,  $\lambda = 390 \text{ nm}$ ) durch His-Thia bei  $37^\circ\text{C}$  und  $\text{pH } 7,6$  in  $40 \text{ mM}$  HEPES-Puffer ( $I = 0,125$ ), Enzymkonzentration =  $1,2 \text{ nM}$ , (A) DIXON-Auftragung ( $1/v$  gegen  $[I]$ ), (B) Sekundärauftragung der Anstiege aus der DIXON-Auftragung gegen die reziproke Substratkonzentration ( $r^2 = 1$ )

*Abbildung 10* zeigt als ausgewähltes Beispiel die Hemmung der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse durch His-Thia in der DIXON-Auftragung (A) und die Sekundärauftragung der

Anstiege aus dem DIXON-Diagramm als Funktion der reziproken Substratkonzentration (**B**). In dieser Sekundärauftragung verläuft die Gerade durch den Koordinatenursprung. Damit ist gezeigt, daß die Hemmung erwartungsgemäß einem kompetitiven Mechanismus folgt.

Für die mit einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette der Aminosäure in P<sub>2</sub>-Position synthetisierten Verbindungen sollten aufgrund der verringerten Hydrophobizität schlechtere Hemmeigenschaften als für Ile-Pyrr bzw. Ile-Thia zu erwarten sein. Das widerspiegeln auch die in **Tabelle 2** zusammengefaßten Ergebnisse der Hemmung der DP IV- und POP-katalysierten Substrathydrolyse durch die Aminosäurepyrrolidide und -thiazolidide bzw. deren Boc-geschützte Vorstufen. Der effektivste unter den neu dargestellten DP IV-Inhibitoren ist das Glu-Thia mit einem im Vergleich zum Ile-Thia um das 7fache erhöhten K<sub>i</sub>, gefolgt vom His-Thia mit einer um eine Größenordnung verschlechterten Hemmkonstante. Alle anderen Strukturen haben um mehr als eine Größenordnung schlechtere K<sub>i</sub>-Werte.

**Tabelle 2** Parameter der kompetitiven Inhibierung der DP IV aus Schweineniere und der rekombinanten POP von *Flavobacterium meningosepticum* durch Aminosäurepyrrolidide und -thiazolidide und Isoleucinderivate (für DP IV: X = H, die Verbindungen liegen als Salze vor, s. Tab. 20 und 21 im experimentellen Teil; für POP: X = Boc)

Verbindung	DP IV <sub>Schweineniere</sub> K <sub>i</sub> [µM]	rPOP <sub>Flavobacterium meningosepticum</sub> K <sub>i</sub> [µM]
X-Asn-Pyrr	12 ± 0,50	39,8 ± 4,1
X-Asn-Thia	3,5 ± 0,41	34,4 ± 3,1
X-His(X)-Pyrr	3,5 ± 0,16	59,1 ± 3,2
X-His(X)-Thia	0,84 ± 0,044	26,5 ± 2,3
X-Ile-Pyrr	0,21 ± 0,016	21,4 ± 1,6
X-Ile-Thia	0,08 ± 0,014	9,31 ± 0,5
X-Ile-Aze	3,1 ± 0,23	>1000
X-Ile-Pip	6,0 ± 0,44	>1000
X-Pro-Pyrr	4,1 ± 0,23	11,5 ± 0,9
X-Pro-Thia	1,2 ± 0,078	27,5 ± 4,2
X-Asp-Pyrr	14 ± 0,95	84,4 ± 3,5
X-Asp-Thia	2,9 ± 0,16	20,3 ± 4,2
X-Glu-Pyrr	2,2 ± 0,25	16,7 ± 0,9
X-Glu-Thia	0,61 ± 0,070	7,48 ± 0,3

Weniger dramatisch sind die Effekte im Falle der Hemmung der POP-katalysierten Substrathydrolyse durch die N-terminal geschützten Aminosäurepyrrolidide und –thiazolidide. Hier variieren die Hemmkonstanten um den Faktor 2-5, relativ unabhängig davon, ob sich eine funktionelle Gruppe in der Seitenkette oder sogar ein größerer hydrophober Rest wie im Falle des Boc-His(Boc)-Thia an P<sub>2</sub>-Position befindet. Allerdings sind die Aminosäurepyrrolidide und –thiazolidide schlechte kompetitive Inhibitoren der bakteriellen Prolylendopeptidase.

### 3.1.2 Inhibierung der DP IV und POP mit Aminosäurepyrrolidinomethylketonen

Von N-terminal ungeschützten Aminosäuremethylketonen und Dipeptidylmethylketonen ist bekannt, daß sie unter physiologischen Bedingungen einem schnellen Spontanzerfall mit Halbwertszeiten im Minutenbereich unterliegen (Silver & Laursen, 1974; Demuth, 1980). Auch die Substitution des Chloratoms durch einen Ammoniumrest beeinflusst die Geschwindigkeit des Spontanzerfalls nur wenig (Steinmetzer, 1991). Durch die Synthese von Aminosäurepyrrolidinomethylketonen sollten kompetitive Inhibitoren der DP IV entwickelt werden, die in ihrer inhibitorischen Potenz den Aminosäurepyrrolididen vergleichbar sind, aber eine Halbwertszeit von wenigen Minuten haben.

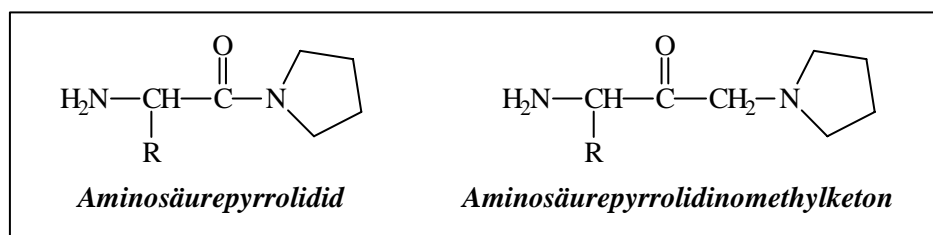


Abbildung 11 Allgemeine Strukturformeln von Aminosäurepyrrolididen und Aminosäurepyrrolidinomethylketonen

Annahme war, daß diese Strukturveränderung die Bindungseigenschaften der Substanzen zur DP IV nur unwesentlich beeinflusst. In Kapitel 3.2.2 wird beschrieben, daß sich die synthetisierten N-terminal freien Aminosäurepyrrolidinmethylketone bei pH 7,6 in wässriger Lösung instabil verhalten und vor allem Pro-CH<sub>2</sub>-Pyrr mit einer Halbwertszeit des nichtenzymatischen Zerfalls von 28 min bei Raumtemperatur die angestrebten Eigenschaften bezüglich der Stabilität erfüllt. Allerdings hatte die Strukturmodifikation einen unerwartet großen Einfluß auf die Hemmeigenschaften der Inhibitoren gegenüber der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse. Die Affinität der Substanzen zur DP IV verschlechterte sich um annähernd zwei Größenordnungen. Damit sind die Verbindungen im Rahmen der Entwicklung von potentiellen Therapeutika für Diabetes Typ 2 nicht interessant. Deshalb wurde auch auf die Darstellung der entsprechenden Thiazolidinderivate verzichtet.

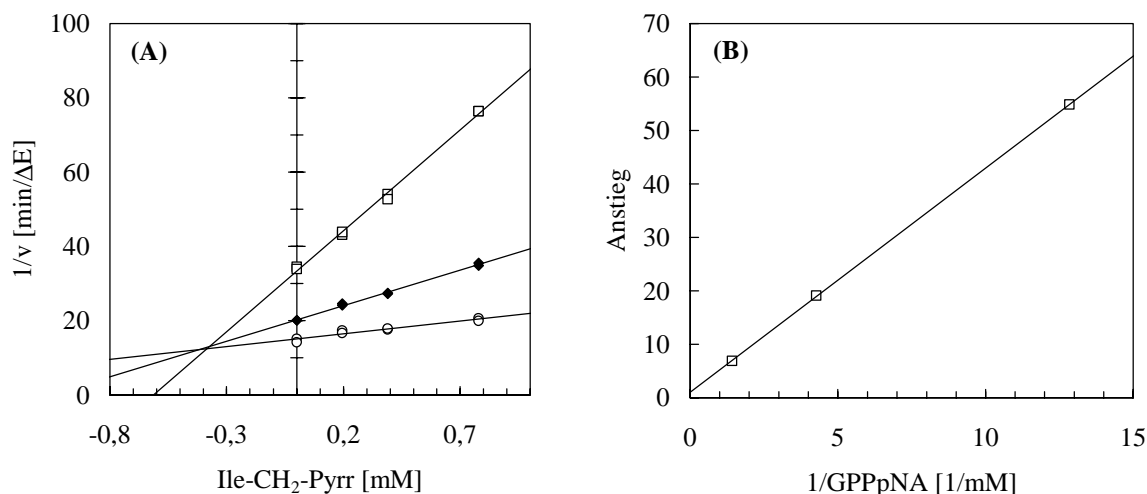


Abbildung 12 Inhibition der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GPpNA ( $\exists = 0,08 \text{ mM}$ ,  $\& = 0,23 \text{ mM}$ ,  $1 = 0,7 \text{ mM}$ ,  $\lambda = 390 \text{ nm}$ ) durch Ile-CH<sub>2</sub>-Pyrr bei 37°C und pH 7,6 in 40 mM HEPES-Puffer ( $I = 0,125$ ), Enzymkonzentration = 1,2 nM, (A) DIXON-Auftragung ( $1/v$  gegen  $[I]$ ), (B) Sekundärauftragung der Anstiege aus der DIXON-Auftragung gegen die reziproke Substratkonzentration ( $r^2 = 1$ )

Tabelle 3 Parameter der kompetitiven Inhibition der DP IV aus Schweineniere und der rekombinanten POP von *Flavobacterium meningosepticum* durch Aminosäurepyrrolidinomethylketone (für DP IV: X = H, die Verbindungen liegen als Salze vor, s. Tab. 22 im experimentellen Teil; für POP: X = Boc)

Verbindung	DP IV aus Schweineniere $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	rPOP <sub>Flavobacterium meningosepticum</sub> $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
X-Pro-CH <sub>2</sub> -Pyrr	$163,4 \pm 27,5$	$509,4 \pm 44,9$
X-Ile-CH <sub>2</sub> -Pyrr	$361,1 \pm 26,3$	$410,2 \pm 17,5$

Für die N-terminal Boc-geschützten Derivate als Inhibitoren der POP-katalysierten Substrathydrolyse wurden ebenfalls hohe  $K_i$ -Werte ermittelt.

### 3.1.3 Inhibition der DP IV und POP mit N-terminal verlängerten Aminosäurethiazolididen – *prodrugs*

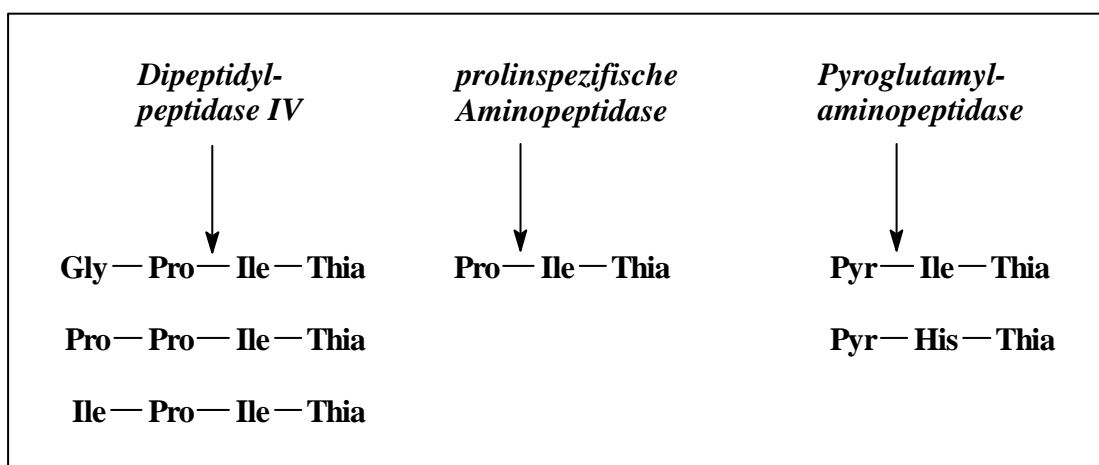
Die Etablierung von Vorläufermolekülen, sogenannte *prodrugs*, von therapeutisch wirksamen Verbindungen ist ein umfangreiches Gebiet in der Pharmaka-Entwicklung. Die pharmakologisch meist inaktiven *prodrugs* werden durch chemische oder enzymatische Prozesse zu der eigentlichen Wirksubstanz metabolisiert. Ziel der Anwendung einer solchen Strategie kann es sein, die Bioverfügbarkeit, Stabilität, Toxizität oder auch den Geschmack von Substanzen zu beeinflussen. Ein weiteres Ziel der Entwicklung von *prodrugs* kann es sein, durch funktionel-

le Strukturmodifikationen das Kompartiment der Wirkung des Therapeutikums zu bestimmen, um so unerwünschte Nebenwirkungen auszuschließen.

In den Abschnitten 3.1.3.1 und 3.1.3.2 werden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Substanzen vorgestellt, bei denen der effektive DP IV-Inhibitor Ile-Thia oder His-Thia nach der oralen Applikation *in vivo* durch Peptidasen freigesetzt werden kann. Ziel dieser Untersuchungen war es, *prodrug*-Formen zu finden, die es ermöglichen, die Stabilität von kurzlebigen DP IV-Inhibitoren präapplikativ zu verbessern, oder die Wirkung von DP IV-Inhibitoren auf die vaskuläre DP IV zu beschränken.

### 3.1.3.1 N-terminal verlängerte Aminosäurethiazolidide als maskierte Inhibitoren der DP IV

Die synthetisierten *prodrugs* als Vorläufermoleküle von Inhibitoren der DP IV lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe gehören Verbindungen, die Substrate der DP IV darstellen. Die DP IV ist gleichzeitig freisetzendes Enzym und Zielenzym des bei der Abspaltung der Dipeptide freiwerdenden Inhibitors. Die zweite Gruppe besteht aus Verbindungen, die Substrate verschiedener Aminopeptidasen sind. Nach Abspaltung der N-terminalen Aminosäure sollte der effektive kompetitive Inhibitor der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse, Ile-Thia bzw. His-Thia, freigesetzt werden (siehe *Abbildung 13*).



*Abbildung 13* Übersicht über die synthetisierten *prodrugs* und die den potentiellen DP IV-Inhibitor-freisetzenden Peptidasen

#### a) DP IV als Inhibitor-freisetzendes Enzym

Die DP IV ist gleichzeitig das Enzym, das die aktive Wirkform aus der *prodrug* freisetzt und das Zielenzym des dabei freiwerdenden Inhibitors. Dieses Prinzip der Selbstaktivierung einer *prodrug* durch das Zielenzym ist z. B. in dem Antiepileptikum Vigabatrin verwirklicht. Der Wirkstoff  $\gamma$ -Vinyl-GABA ist ein Substrat der GABA-Ketoglutarat-Transaminase, die den

Neurotransmitter GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) inaktiviert. Der resultierende Metabolit des  $\gamma$ -Vinyl-GABA ist wiederum ein irreversibler Inhibitor der Transaminase (Smith & Williams, 1998).

Die Michaelis-Menten-Konstanten der Hydrolyse der Verbindungen durch die DP IV wurden als Pseudo- $K_i$ -Werte im optischen Test mit GPPNA als Substrat ermittelt und sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Es handelte sich bei dieser Pseudoinhibierung um einen kompetitiven Typ, das heißt beide Substrate im Testansatz konkurrieren um die Substratbindungsstelle am Enzym. Die Initialgeschwindigkeit der Freisetzung von Gly-Pro aus GPPNA durch die DP IV-katalysierte Hydrolyse wurde als 1. Ableitung im Punkt  $t = 0$  ermittelt.

**Tabelle 4**  $K_m$ -Werte der *prodrugs*, gemessen als Pseudo- $K_i$ -Werte gegenüber der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse von GPPNA

Verbindung	$K_m$ [ $\mu$ M]
<b>Gly-Pro-Ile-Thia</b>	21,95 $\pm$ 1,61
<i>Pro-Pro-Ile-Thia</i>	12,27 $\pm$ 0,65
<b>Ile-Pro-Ile-Thia</b>	23,08 $\pm$ 3,06

Die Freisetzung des Ile-Thias wurde weiterhin in humanem Serum untersucht. Dazu wurden die Verbindungen bei 37°C mit Serum inkubiert und in definierten Zeitabständen die Restaktivität der endogenen Serum-DP IV gegenüber GPPNA ermittelt.

Die *Abbildung 14* zeigt, daß bei allen untersuchten Substanzen Ile-Thia im Serum rasch aus der *prodrug* freigesetzt wird und die endogene Serum-DP IV hemmt. Die Freisetzung von Ile-Thias aus PPITHia verläuft etwas langsamer als aus GPITHia und IPITHia. *In vivo* wird diese Freisetzung im Serum eher eine untergeordnete Rolle spielen. Zum einen ist unklar, ob die Verbindungen im intakten Zustand in der Lage sind, die Darmmukosa zu passieren. Bei Untersuchungen zu den Transporteigenschaften der Substanzen an dem Peptidtransporter PepT1 (siehe 3.3) konnte nur für IPITHia gezeigt werden, daß es ein Substrat des Peptidtransporters ist. Zum anderen ist die DP IV in der Darmschleimhaut des Dünndarms lokalisiert (Yaron & Naidier, 1993), so daß es wahrscheinlicher ist, daß Ile-Thia bereits im Darm freigesetzt wird. Denkbar wäre auch ein proteolytischer Abbau der *prodrugs* durch Aminopeptidase P (EC 3.4.11.9) und die Leucinaminopeptidase, die ebenfalls in der Bürstensaummembran des Dünndarms lokalisiert sind (Finlay & McCloud, 1990).

Im Abschnitt 3.4.6 wird gezeigt, daß GPITHia einen dem Ile-Thia vergleichbaren positiven Effekt auf die Glukosetoleranz nach OGTT im Tiermodell hat. Damit erweist sich das Prinzip der Maskierung eines potentiellen DP IV-Inhibitors mit durch die DP IV spaltbaren Dipepti-

den als geeignet, um Substanzen mit kurzer Halbwertszeit (z. B. Dipeptidylammoniummethylketone) in stabile, leichter handhabbare Verbindungen zu überführen. Durch ihre therapeutische Anwendung könnte das Risiko von Nebenwirkungen eingeschränkt werden, da die Wirkung des potentiellen DP IV-Inhibitors zeitlich begrenzt wäre.

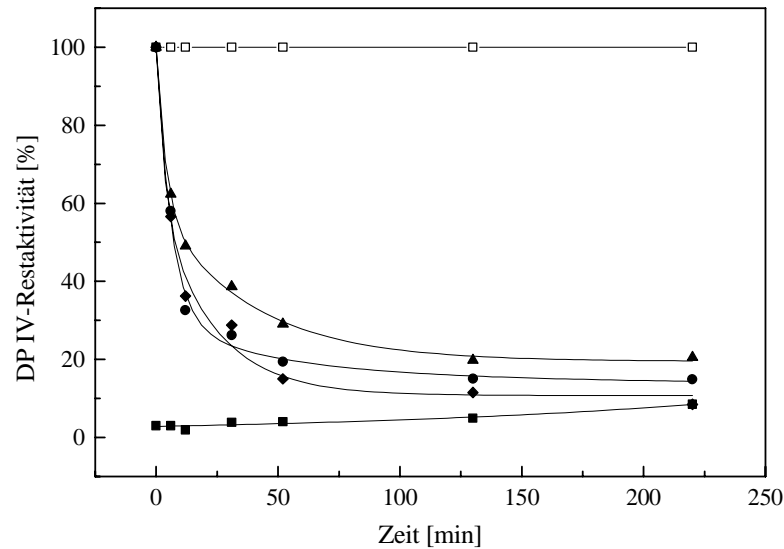


Abbildung 14 Freisetzung des Ile-Thias aus den prodrugs GPITHia (○), PPITHia (△) und IPITHia (●) durch Inkubation mit Serum bei 37°C, Konzentration der prodrugs im Serum 0,1 mM, Messung der DP IV-Restaktivität gegenüber GPpNA (0,4 mM) in HEPES-Puffer (40 mM, pH 7,6, I = 0,125). Dabei wurde das Serum und die in ihm enthaltenen Verbindungen 1:10 verdünnt. Die Restaktivitäten wurden als Prozent im Vergleich zu einer Kontrolle (□) aufgetragen. Die mit ■ markierte Kurve stellt den Verlauf der DP IV-Restaktivität bei direkter Zugabe von Ile-Thia zum Blut dar.

Eine Differenzierung zwischen luminaler und vaskulärer Wirkung des DP IV-Inhibitors kann mit diesen Verbindungen nicht erreicht werden. Deshalb sind *prodrugs* bei denen der wirksame DP IV-Inhibitor durch die DP IV selbst freigesetzt wird nicht geeignet, den Wirkort des Inhibitors auf das Blut zu beschränken.

#### b) Aminopeptidasen als Inhibitor-freisetzendes Enzym

Wie in Abbildung 13 dargestellt, kann aus PITHia Ile-Thia durch prolinspezifische Aminopeptidasen freigesetzt werden. Die Leucinaminopeptidase (EC 3.4.11.1) spaltet bevorzugt hydrophobe Aminosäuren vom N-Terminus von Peptiden ab (Hanson & Frohne, 1976). Damit sollte PITHia ein gutes Substrat der LAP darstellen, was auch qualitativ nachgewiesen werden konnte. Dazu wurde eine 0,5 mM Lösung PITHia in Tris-Puffer (50 mM, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8) mit aktivierter LAP aus Schweineniere inkubiert (siehe experimenteller Teil, Abschnitt 5.2.4).



Die Zunahme bzw. Abnahme der Signalflächen von Hydrolyseprodukt und Substrat wurden kapillarelektrophoretisch verfolgt.

Die LAP ist eine Metalloprotease, die u. a. in der Bürstensaummembran des Dünndarms lokalisiert ist (Finlay & McCloud, 1990). Die Untersuchung in Serum zeigte, daß Ile-Thia aus PITHia ähnlich schnell freigesetzt wird wie aus GP- IP- und PPITHia (Durchführung siehe 5.2.3) und die endogene DP IV hemmt. Aber auch in diesem Fall ist eine Freisetzung von Ile-Thia aus PITHia durch die intestinale LAP wahrscheinlicher. In Abschnitt 3.4.8.2 wird gezeigt, daß die orale Gabe des PITHia an Ratten kurz vor einem OGTT einen positiven Einfluß auf deren Glukosetoleranz hat. Die Verbindung PITHia ist also wie GP-, IP- und PPITHia geeignet, kurzlebige DP IV-Inhibitoren zu stabilisieren.

Die DP IV ist sowohl luminal in der Darmschleimhaut des Dünndarms als auch vaskulär im Blut lokalisiert. In beiden Kompartimenten sind natürliche Substrate des Enzyms an der Regulation physiologischer Prozesse beteiligt. Deshalb ist es interessant, Inhibitoren zu entwickeln, die entweder nur die luminalen oder nur die vaskuläre DP IV hemmen, um so zwischen den einzelnen Effekten differenzieren bzw. diese Effekte voneinander getrennt therapeutisch ausnutzen zu können oder auch unerwünschte Nebenwirkungen auszuschließen.

So ist die Stimulation des Na-abhängigen Glukosetransporters 1 (SGLT 1) in der apikalen Membran der Enterozyten des Dünndarms durch bei der Nahrungsaufnahme freigesetztes Enteroglukagon 37 (Oxyntomodulin, PG<sub>33-69</sub>) beschrieben worden (Stümpel, Scholtka et al., 1998). Im Rahmen der nachgewiesenen erweiterten Substratspezifität der DP IV kann angenommen werden, daß das Enteroglukagon 37 genau wie das pankreatische Glukagon (PG<sub>33-61</sub>) ein natürliches Substrat des Enzyms ist (Hinke, Pospisilik et al., 2000). Von GIP und GLP-2, zwei weiteren DP IV-Substraten, wurde gezeigt, daß sie den basolateralen Glukosetransport an Enterozyten, vermittelt über den Na-abhängigen Glukosetransporter GLUT-2, initial stimulieren können (Cheeseman & Tsang, 1996). Damit sind diese gastrointestinalen Hormone Regulatoren des Glukosetransports durch die Bürstensaummembran des Dünndarms. Eine ubiquitäre Hemmung der DP IV und die damit verbundene Verhinderung der Inaktivierung von GIP, GLP-2 und Enteroglukagon 37 in der direkten Nachbarschaft der Enterozyten könnte somit auch eine akzellerierende Wirkung auf die Glukoseaufnahme haben, was im Rahmen der Therapie von Diabetes Typ 2 ein unerwünschter Nebeneffekt wäre. Dieses Problem sollte mit einer *prodrug*-Struktur, aus der der wirksame DP IV-Inhibitor erst auf vaskulärerer Seite freigesetzt und während dieses Prozesses in Richtung Vena Porta abtransportiert wird, umgangen werden.

Die Freisetzung des DP IV-Inhibitors aus den *prodrugs* durch die DP IV und prolinspezifische Aminopeptidasen führt nicht zur Beschränkung der Wirkung des Inhibitors auf die im Blut zirkulierende DP IV. Deshalb wurde nach einer geeigneten Peptidase gesucht, die nicht im Darm, sondern vaskulär lokalisiert ist. Außerdem sollte ihre Spezifität so sein, daß die sich aus diesen Anforderungen ergebenden Vorläufermoleküle synthetisch leicht zugänglich sind und die resultierenden Verbindungen eine ähnlich gute orale Bioverfügbarkeit wie Ile-Thia aufweisen. Die Pyroglutamylaminopeptidase (PAP) wurde als potentiell geeignetes Enzyme ausgewählt und die in *Abbildung 13* angeführten Tripeptid-Analoga Pyr-Ile-Thia und Pyr-His-Thia synthetisiert.

Beide Verbindungen sind Substrate der PAP I aus Kalbsleber. Mittels Kapillarelektrophorese konnte qualitativ nachgewiesen werden, daß nach Inkubation der Verbindungen (0,5 mM) mit dem Enzym aus Kalbsleber in Phosphatpuffer (50 mM, 10 mM EDTA, 5 mM DTE, 5 % Glycerol, pH 8) Ile-Thia bzw. His-Thia freigesetzt werden (siehe experimenteller Teil, Abschnitt 5.2.4). Außerdem wurde die Bildung der DP IV-Inhibitoren aus den *prodrugs* durch Inkubation der Verbindungen in Heparin-Blut bei 37°C und anschließende Bestimmung der Restaktivität der endogenen DP IV in Plasma untersucht.

Aus *Abbildung 15* ist ersichtlich, daß die Freisetzung der DP IV-Inhibitoren aus den Substraten der Pyroglutamylaminopeptidase in Heparin-Blut nur sehr langsam erfolgt. Es gibt nur geringfügige Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit zwischen den beiden Substraten, obwohl Pyr-His-Thia strukturell dem natürlichen Substrat der PAP (TRH = Pyr-His-Pro-NH<sub>2</sub>) am nächsten kommt. Die Unterschiede in der ermittelten DP IV-Restaktivität beim Vergleich der Freisetzung des Inhibitors aus PyrITHia und PyrHTh sind auf die unterschiedliche Hemmkapazität der freigesetzten DP IV-Inhibitoren Ile-Thia und His-Thia bei gleicher Konzentration zurückzuführen.

Generell sind drei verschiedene Formen der PAP bekannt. Die PAP I (EC 3.4.19.3) ist eine lösliche cytosolische Cysteinprotease, die ausschließlich N-terminales Pyroglutamin von Peptiden und Proteinen abspaltet (Browne & O`Cuinn, 1983). Die PAP II (EC 3.4.19.6) ist eine membrangebundene Metalloprotease und zeigt eine strenge Substratspezifität für TRH (McDonald & Barrett). Minimale strukturelle Veränderungen an der Struktur des TRH werden von der PAP II nicht akzeptiert oder führen zu einer drastischen Abnahme der Affinität des Enzyms zum Substrat (Bauer, Nowak et al., 1981). Die dritte bekannte Enzymform ist eine Serum-PAP, die ähnliche Eigenschaften wie die PAP II aufweist und wahrscheinlich eine lösliche Form dieses membrangebundenen Enzyms darstellt (Bauer, 1988). Auch dieses Enzym ist nicht in der Lage, geringe Strukturänderung am TRH zu akzeptieren. So können Pyr-

His-Pro-NHCH<sub>3</sub>, Pyr-His-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> und Pyr-Phe-Pro-NH<sub>2</sub> die TRH-Spaltung durch die Serum-PAP effektiv inhibieren, werden selbst aber nicht hydrolysiert (Bauer, Nowak et al., 1981).

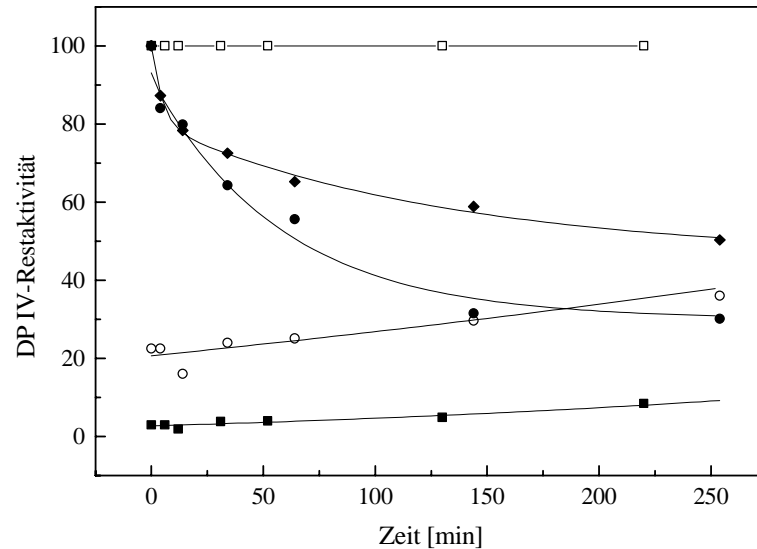


Abbildung 15 Freisetzung des Ile-Thias bzw. His-Thias aus den prodrugs PyrIThia ( ○ ) und PyrHThia ( & ) durch Inkubation mit Heparin-Blut (600 IE / 200 ml) bei 37°C, Konzentration der prodrugs im Blut 0,1 mM, Messung der DP IV-Restaktivität gegenüber GPPNA (0,4 mM) in HEPES-Puffer (40 mM, pH 7,6, I = 0,125). Dabei wurde das abzentrifugierte Plasmat und die in ihm enthaltenen Verbindungen 1:10 verdünnt. Die Restaktivitäten wurden als Prozent im Vergleich zu einer Kontrolle ( □ ) aufgetragen. Die mit ●, bzw. ◆ markierten Kurven stellen den Verlauf der DP IV-Restaktivität bei direkter Zugabe von Ile-Thia bzw. His-Thia zum Blut dar.

Über eine Lokalisation der PAP I in Blutzellen gibt es keine Hinweise in der Literatur, aber aufgrund der strengen Substratspezifität der PAP II ist die Freisetzung von Ile-Thia und His-Thia aus PyrIThia und PyrHThia durch PAP I eher wahrscheinlich. Das konnte auch durch den experimentellen Befund untermauert werden, daß sich die Freisetzung von Ile-Thia aus Pyr-Ile-Thia in Heparin-Blut durch Zugabe von Jodazetamid (0,1mM), einem spezifischen Inhibitor von Cysteinproteasen, verhindern ließ. Die Zugabe von EDTA (0,1 mM), einem spezifischen Inaktivator von Metalloproteasen, hatte keinen Effekt auf diese Freisetzung. Da in Serum ebenfalls keine Spaltung des PyrIThias beobachtet werden konnte, ist für die Ile-Thia- bzw. His-Thia-Freisetzung aus PyrIThia und PyrHThia möglicherweise eine im Cytosol von Blutzellen lokalisierte PAP I verantwortlich.

### 3.1.3.2 N-terminal verlängerte Aminosäurethiazolidide als Inhibitoren der POP

Die als *prodrugs* für die DP IV synthetisierten N-terminal verlängerten Isoleucinthiazolidide sind auch kompetitive Inhibitoren der POP, wie am Beispiel des Pro-Ile-Thia in *Abbildung 16* ersichtlich ist. PITHia ist mit einem  $K_i$  von  $0,92 \mu\text{M}$  der effektivste Inhibitor der bakteriellen Prolylolylopeptidase in dieser Reihe. Damit hat er im Vergleich zu dem N-terminal Boc-geschützten Ile-Thia eine um eine Größenordnung bessere Hemmkonstante. Der effektivste bisher bekannte kompetitive Inhibitor der POP ist Z-Thiopropylthiazolidid mit einem  $K_i$  von  $0,36 \text{ nM}$  ( $\text{POP}_{\text{Rind}}$ ; Tsuru, Yoshimoto et al., 1988). Ein Vorteil der hier vorgestellten Verbindungen gegenüber anderen POP-Inhibitoren liegt in ihren Löslichkeitseigenschaften. N-terminal geschützte Verbindungen, wie sie normalerweise als Inhibitoren der POP verwendet werden, sind in wässrigem Medium nur unvollständig löslich. Dieser Nachteil wird durch Besetzung der  $P_3$ -Position mit einer N-terminal freien Aminosäure oder einem Dipeptid aufgehoben. Die in diesem Abschnitt vorgestellten Inhibitoren sind gute kompetitive Inhibitoren der bakteriellen Prolylolylopeptidase.

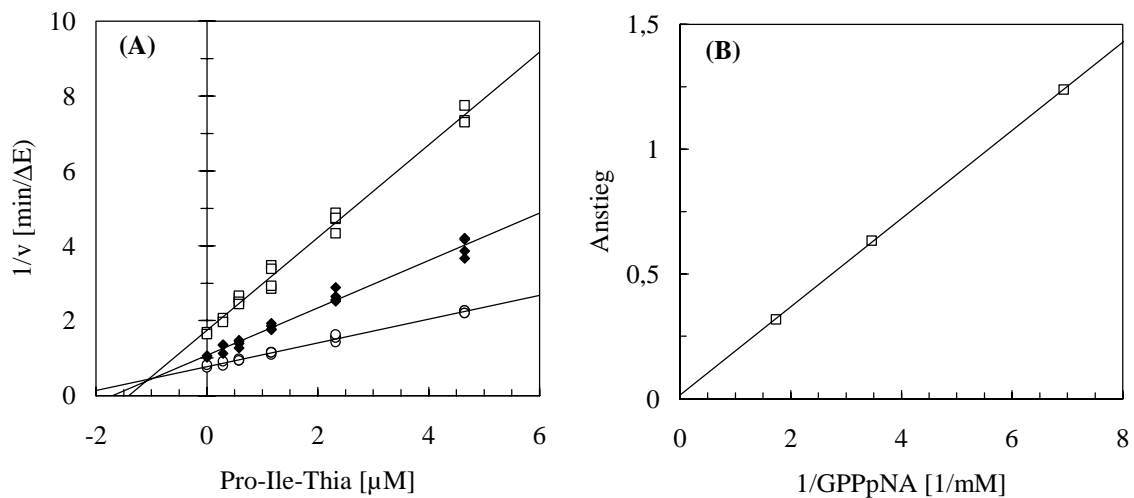


Abbildung 16 Inhibition der POP-katalysierten Hydrolyse von GPPpNA ( $\Xi = 0,14 \text{ mM}$ ,  $\& = 0,29 \text{ mM}$ ,  $1 = 0,58 \text{ mM}$ ,  $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) durch Pro-Ile-Thia bei  $37^\circ\text{C}$  und  $\text{pH } 7,6$  in  $40 \text{ mM}$  HEPESs-Puffer ( $I = 0,125$ ), Enzymkonzentration =  $5 \text{ nM}$ , (A) DIXON-Auftragung ( $1/v$  gegen  $[I]$ ), (B) Sekundärauftragung der Anstiege aus der DIXON-Auftragung gegen die reziproke Substratkonzentration ( $r^2 = 0,999$ )

**Tabelle 5** Parameter der kompetitiven Inhibierung der rPOP von *Flavobacterium meningosepticum* durch N-terminal verlängerte Isoleucinthiazolidide und Pyroglutaminsäurehistidinthiazolidid

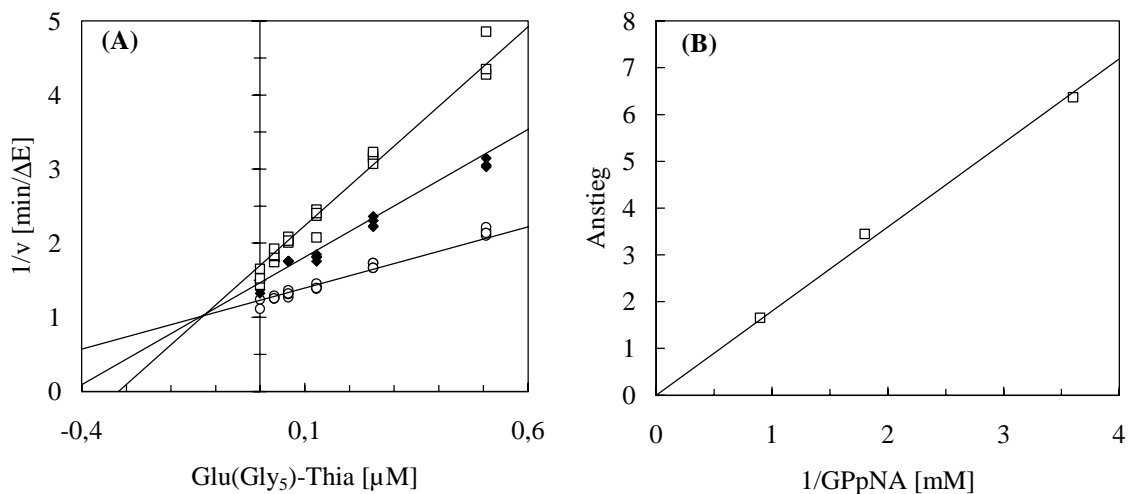
Verbindung	rPOP <sub>Flavobacterium meningosepticum</sub> K <sub>i</sub> [μM]
<b>Pro-Ile-Thia</b>	0,92 ± 0,051
<b>Pyr-Ile-Thia</b>	2,44 ± 0,11
<b>Pyr-His-Thia</b>	3,14 ± 0,16
<b>Pro-Pro-Ile-Thia</b>	1,41 ± 0,09
<b>Ile-Pro-Ile-Thia</b>	3,32 ± 0,12
<b>Gly-Pro-Ile-Thia</b>	4,46 ± 0,19

### 3.1.4 Inhibierung der DP IV und POP mit seitenkettenmodifizierten Glutaminsäurethiazolididen

Nachdem die N-terminal verlängerten Ile-Thia-Derivate als potentielle *prodrugs* zur Inhibierung der vaskulär lokalisierten DP IV und als Stabilisatoren von kurzlebigen Verbindungen untersucht worden waren, sollte durch Variation der Größe des DP IV-Inhibitors dessen Transportierbarkeit durch die Darmschleimhaut beeinflußt werden. Das heißt, es sollte eine nicht mehr transportable Struktur entwickelt werden, deren inhibitorische Wirkung nach oraler Applikation ausschließlich auf die luminal lokalisierte DP IV beschränkt bleibt. Solche Inhibitoren könnten dazu dienen, die physiologische Rolle der gastrointestinalen DP IV selektiv zu untersuchen. Zum anderen ist die gastrointestinale DP IV entscheidend an der Verwertung prolinhaltiger Nahrungsproteine (Tiruppathi, Miyamoto et al., 1993) sowie an der Inaktivierung des Enterostatins (Bouras, Huneau et al., 1996; Mei, Erlanson et al., 1996), eines appetitshemmenden gastrointestinalen Peptidhormons, beteiligt. Die gastrointestinale DP IV stellt somit ein potentielles Target für die Behandlung von Adipositas dar.

Als Grundstruktur wurde Glu-Thia (K<sub>i</sub> = 0,61 μM) ausgewählt, da es im Vergleich zu Ile-Thia eine relativ gute Hemmkonstante für die DP IV-katalysierte Substrathydrolyse aufweist und mit seiner funktionellen Gruppe in der Seitenkette der P<sub>2</sub>-Aminosäure die Möglichkeit bietet, durch die Variation von Substituenten die Größe und die hydrophilen Eigenschaften des Gesamtmoleküls zu beeinflussen. Die Lipophilie der Verbindung sollte durch die Modifikation nicht wesentlich erhöht werden, da dadurch die Fähigkeit der Verbindung zur passiven Diffusion durch die Endothelzellen der Darmschleimhaut verbessert worden wäre.

Es wurden verschieden lange Gly-Ketten (Gly, Gly<sub>3</sub>, Gly<sub>5</sub>) sowie ein Polyethylenglycolrest mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 8000 Da eingeführt. Die entsprechenden Boc-geschützten Synthesestufen wurden auch als Inhibitoren der POP-katalysierten Substrathydrolyse untersucht. Der Einfluß der Seitenkettenmodifikationen an P<sub>2</sub>-Position auf die Hemmeigenschaften der Verbindungen gegenüber der DP IV- und POP-katalysierten Substrathydrolyse ist in **Tabelle 6** zusammenfassend dargestellt. *Abbildung 17* zeigt am Beispiel der Hemmung der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse durch Glu(Gly<sub>5</sub>)-Thia, daß es sich jeweils um einen kompetitiven Hemmtyp handelt.



*Abbildung 17* Inhibition der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GPpNA ( $[E] = 0,28$  mM,  $[S] = 0,56$  mM,  $[I] = 1,1$  mM,  $\lambda = 405$  nm) durch Glu(Gly<sub>5</sub>)-Thia bei 37°C und pH 7,6 in 40 mM Hepes-Puffer ( $I = 0,125$ ), Enzymkonzentration = 1,2 nM, (A) DIXON-Auftragung ( $1/v$  gegen  $[I]$ ), (B) Sekundärauftragung der Anstiege aus der DIXON-Auftragung gegen die reziproke Substratkonzentration ( $r^2 = 0,995$ )

Wie bereits erwähnt, ist von beiden untersuchten Enzymen bekannt, daß ein großer hydrophober Rest in der Seitenkette der Aminosäure in P<sub>2</sub>-Position die Affinität der Enzyme zu den Inhibitoren erhöht. So ist z. B. Lys(Z)-Pyrr ein besserer Inhibitor der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse als Lys-Pyrr (Rahfeld, 1989). Eine Modifikation der Seitenkette des Glu-Thia mit einem Gly-Rest verbessert die Affinität des Inhibitors zur DP IV um den Faktor 6. Damit ist diese Verbindung in ihren Hemmeigenschaften gegenüber der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse Ile-Thiazolidid vergleichbar. Eine Verlängerung der Seitenkette um weitere 2 oder 4 Gly-Einheiten führt zu gleichbleibend guter Affinität der entsprechenden Substanzen zur DP IV. Durch Einführung des PEG-Restes mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 8000 in die Seitenkette der P<sub>2</sub>-Aminosäure des Inhibitors wird die Hemmung wieder schlechter, zeigt mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 3,11  $\mu mol$  aber immer noch gute Bindungseigen-

schaften. Als bisher größte bekannte Substrate der DP IV sind Chemokine mit einem Molekulargewicht von etwa 7000 beschrieben worden (Proost, DeMeester et al., 1998).

**Tabelle 6** Parameter der kompetitiven Inhibierung der DP IV aus Schweineniere und der rekombinanten POP von *Flavobacterium meningosepticum* durch seitenkettenmodifizierte Glutaminsäurethiazolidide (für DP IV: X = H, Y = OH, die Verbindungen liegen als Salze vor, s. Tab. 25 im experimentellen Teil; für POP: X = Boc, Y = OtBu)

Verbindung	DP IV aus Schweineniere $K_i$ [ $\mu$ M]	rPOP <sub>Flavobacterium meningosepticum</sub> $K_i$ [ $\mu$ M]
<i>X-Glu-Thia</i>	0,652 $\pm$ 0,073	7,48 $\pm$ 0,29
<b>X-Glu(GlyY)-Thia</b>	0,107 $\pm$ 0,007	106 $\pm$ 12,3
<b>X-Glu(Gly<sub>3</sub>)-Thia</b>	0,192 $\pm$ 0,016	2,02 $\pm$ 0,13
<b>X-Glu(Gly<sub>5</sub>)-Thia</b>	0,099 $\pm$ 0,011	16,7 $\pm$ 0,9
<b>X-Glu(PEG)-Thia</b>	3,11 $\pm$ 0,39	keine Inhibierung

Im Gegensatz dazu ist die bakterielle POP nicht mehr in der Lage, ein Molekül dieser Größe zu binden. Das korreliert mit Ergebnissen von Moriyama und Nakanashi (1988), wonach das Enzym Peptide mit einem Molekulargewicht  $>3000$  nicht spalten kann. Die Einführung eines Gly-*t*Bu-Restes in die Seitenkette der P<sub>2</sub>-Aminosäure des Inhibitors führt zu einer Verschlechterung der Hemmung im Vergleich zum Boc-Glu-Thia, obwohl es sich um einen hydrophoben Rest handelt. Möglicherweise kommt es durch die Größe des *t*-Butylrestes zu sterischen Hinderungen. Eine Verlängerung der Gly-Kette um weitere 2 oder 4 Gly-Reste verbessert die Hemmeigenschaften der Verbindungen wieder. Alle seitenkettenmodifizierten Boc-Glu-Thia-Derivate zeigen schlechtere Hemmeigenschaften gegenüber der POP-katalysierten Substrat-hydrolyse als die Ausgangsverbindung. Aus der Literatur ist bekannt, daß im Gegensatz zu anderen Endopeptidasen die POP N-terminal verlängerte Peptide mit abnehmenden Spezifitätskonstanten spaltet (Polgar, 1992). Offensichtlich ist die Substratbindungsstelle der POP auf N-terminaler Seite von Substraten räumlich limitiert. Polgar (1992) machte dafür das mögliche Vorhandensein einer Klappe über der Substratbindungstasche verantwortlich. Diese Hypothese konnte nach Aufklärung der Kristallstruktur der POP aus Schweinemuskel 1998 bestätigt werden (Fülöp, Bocskei et al., 1998).

### 3.1.5 Selektivität von Isoleucinthiazolidid

**Tabelle 7** Ermittelte Restaktivitäten verschiedener Proteasen gegenüber ihren Substraten in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  oder 1  $\mu\text{M}$  Ile-Thia (Meßbedingungen siehe Experimenteller Teil)

Enzym	$K_i$ von Ile-Thia	verwendetes Substrat / $K_m$	Restaktivität bei	
			10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$ Ile-Thia
<b>Aminopeptidasen</b>				
<i>prolinspezifische Aminopeptidasen</i>				
APP <sub>E. coli</sub>	4,14 mM <sup>d</sup>	GP-pNA <sup>a</sup> / 2,23 mM	100%	
<i>andere Aminopeptidasen</i>				
LAP <sub>Schweineniere</sub>		L-pNA <sup>a</sup> / 1,05 mM	100%	
APM <sub>Schweineniere</sub>		A-pNA <sup>a</sup> / 0,235 mM	100%	
PAP <sub>Kalbsleber</sub>		Pyr- $\beta$ NA <sup>e</sup>	100%	
<b>Dipeptidylpeptidasen</b>				
<i>prolinspezifische Dipeptidylpeptidasen</i>				
DPIV <sub>Schweineniere</sub>	0,08 $\mu\text{M}$	GP-pNA <sup>a</sup> / 0,15 mM	3%	32%
DPII <sub>hum. Placenta</sub>	8 $\mu\text{M}$ <sup>d</sup>	GP-pNA <sup>a</sup> / 0,25 mM	71%	96%
<i>andere Dipeptidylpeptidasen</i>				
DPI <sub>hum. Niere</sub>		GR-pNA <sup>a</sup> / 1,5 mM	96%	100%
<b>Endopeptidasen</b>				
<i>prolinspezifische Endopeptidasen</i>				
PEP <sub>Flavo</sub>		GPP-pNA <sup>a</sup> / 0,15 mM	94%	100%
<i>andere Endopeptidasen</i>				
Subtilisin <sub>Bacillus subtilis</sub>		Succ-AAA-pNA <sup>b</sup>	100%	
Elastase <sub>Schweinepankreas</sub>		Succ-AAA-pNA <sup>b</sup>	100%	
$\alpha$ -Chymotrypsin <sub>Schweinepankreas</sub>		SuccAAPF-pNA <sup>b</sup>	100%	
Trypsin <sub>Schwein</sub>		Succ-AAPF-pNA <sup>c</sup>	100%	

a verwendete Substratkonzentration entsprach  $2 \cdot K_m$

b verwendete Substratkonzentration 1,96 mM

c verwendete Substratkonzentration 1,31 mM

d nach Stöckel (1997), Die Restaktivitäten bei jeweiliger Substratkonzentration wurde

berechnet nach 
$$v = \frac{v_{\max} S_0}{S_0 + K_m \left( 1 + \frac{I_0}{K_i} \right)}$$

e verwendete Substratkonzentration 0,284 mM



Die Hemmeigenschaften von Ile-Thia gegenüber der Substrathydrolyse einiger ausgewählter Proteasen und Peptidasen wurden untersucht (**Tabelle 7**). Bezüglich einer potentiellen Anwendung von Ile-Thia als Therapeutikum von Diabetes Typ 2 sollten damit erste Rückschlüsse auf eventuell zu erwartende Nebeneffekte infolge einer inhibitorischen Wirkung der Substanz auf andere Peptidasen gezogen werden.

Wie zu erwarten war, wird bei allen untersuchten nichtprolinspezifischen Proteasen die Geschwindigkeit der Substrathydrolyse durch Ile-Thia in den verwendeten Konzentrationen nicht beeinflusst. Eine geringfügige Inhibierung der enzymkatalysierten Substrathydrolyse der PEP und der DP I bei einer Ile-Thia-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  dürfte physiologisch kaum relevant sein. Die DP II (EC 3.4.14.2) zeigt bei dieser Konzentration eine Restaktivität von 71% gegenüber 0,25 mM GPpNA. Dieses Enzym ist eine lysosomal lokalisierte prolinspezifische Dipeptidylpeptidase, deren Substratspezifität der der DP IV ähnelt. Sie spaltet ebenfalls N-terminale Dipeptide der Sequenz Xaa-Pro und Xaa-Ala von Peptiden ab, besitzt allerdings im Gegensatz zur DP IV ein pH-Optimum im sauren Bereich. Inwieweit ein Einfluß des Ile-Thias auf die DP II-katalysierte Substrathydrolyse zu physiologischen Effekten führen könnte, kann erst nach weiteren Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* beurteilt werden.

## 3.2 Stabilitätsuntersuchungen

Um die Stabilität der synthetisierten Verbindungen untersuchen zu können, wurden in Abhängigkeit von den jeweiligen Eigenschaften der Substanzen verschiedene Detektionsmethoden angewendet.

### 3.2.1 Stabilität der Aminosäurethiazolidide

Diese Klasse von DP IV-Inhibitoren wurde synthetisiert, um durch die Verwendung von Aminosäuren mit funktionellen Seitenketten in P<sub>2</sub>-Position die Stabilitätseigenschaften der resultierenden Verbindungen im Vergleich zu Ile-Thia zu verändern. Ziel dieser Strategie war es, die Wirkung eines oral verfügbaren DP IV-Inhibitors im Blut auf den unmittelbaren Zeitraum der Nahrungsaufnahme zu beschränken und so eventuelle Nebenwirkungen durch Langzeitinhibierung der DP IV auszuschließen. Bezüglich der angestrebten Etablierung eines neuen Wirkstoffs zur Behandlung von Diabetes Typ 2 sollte eine Halbwertszeit des Inhibitors von etwa 30 min ausreichen, um die mit der Nahrungsaufnahme ausgeschütteten Inkretine vor

einem schnellen Abbau durch die DP IV zu schützen und so ihre insulinotrope Wirkung zur Normalisierung des Blutglukosespiegels zu verstärken.

Die Instabilität der Verbindungen sollte zum einen durch Einführung von Aminosäuren mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette in P<sub>2</sub>-Position der Aminosäurethiazolidide und eine damit eventuell intramolekular katalysierte Zerfallsreaktion erzielt werden. Zum anderen sollte die Erhöhung der Ringspannung des Substituenten in P<sub>1</sub>-Position zu einer erhöhten Instabilität der Verbindungen führen. Die geplanten Synthesen mit Ringgrößen < 4 und > 6 Atomen wurden, wie schon erwähnt, nicht durchgeführt, da aus einer 1997 von Augustyns und Lambear veröffentlichten Arbeit die sehr schlechten Hemmeigenschaften der resultierenden Verbindungen ersichtlich waren.

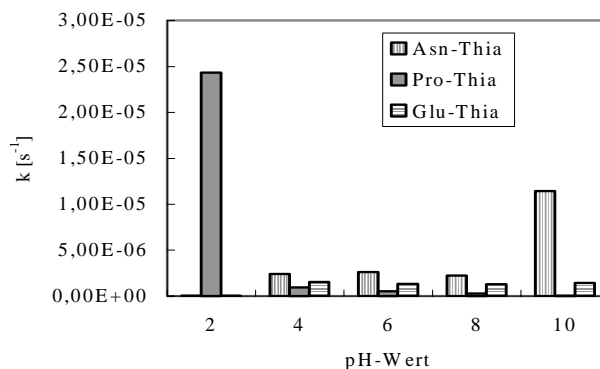
Folgende Inhibitoren wurden auf ihren nichtenzymatischen Zerfall sowie auf ihre Stabilität in biologischen Medien hin untersucht: Ile-Pyrr, Ile-Thia, Ile-Aze, Ile-Pip, Asn-Thia, His-Thia, Pro-Thia, Glu-Thia und Asp-Thia.

#### *Nichtenzymatischer Zerfall der Aminosäurethiazolidide*

Um die Stabilität der Verbindungen in Puffer bei verschiedenen pH-Werten (jeweils pH 2, 4, 6, 8 und 10) zu untersuchen, wurde aus Inkubationsansätzen (0,1 mM, 37°C) periodisch eine Probe mittels Kapillarelektrophorese unter Verwendung eines internen Standards analysiert. Die integrierten relativen Peakflächen der Substanzen im Elektropherogramm wurden anschließend entsprechend einer Reaktion Pseudo-1. Ordnung ausgewertet. Bis auf Asn-Thia, Pro-Thia und Glu-Thia erwiesen sich alle untersuchten Verbindungen als stabil im pH-Bereich von 2-10 bei 37°C über einen Zeitraum von 4 Tagen.

In *Abbildung 18* sind die Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls von Asn-Thia, Pro-Thia und Glu-Thia in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers dargestellt. Das Pro-Thia zerfällt bei einem pH-Wert von 2 mit einer Halbwertszeit von 9 Stunden und ist bei basischem pH-Wert stabil. Dagegen sind Asn-Thia und Glu-Thia im sauren Milieu stabil und zerfallen im basischen Milieu. Bei pH-10 hat Asn-Thia eine Halbwertszeit von 17 Stunden. Bei allen anderen untersuchten pH-Werten betragen die Halbwertszeiten dieser Substanzen etwa 140 Stunden (nach Gleichung 1). Damit konnte zwar gezeigt werden, daß durch Wahl bestimmter Aminosäuren in P<sub>2</sub>-Position die Stabilität der Aminosäurethiazolidide zu beeinflussen ist, allerdings sind die erzielten Halbwertszeiten des nichtenzymatischen Zerfalls bei annähernd physiologischem pH-Wert des Blutes (7,8) hinsichtlich der formulierten Zielstellung zu lang.

pH-Wert	k [s <sup>-1</sup> ]		
	Asn-Thia	Pro-Thia	Glu-Thia
2	2,70E-08	2,43E-05	2,90E-08
4	2,42E-06	9,44E-07	1,53E-06
6	2,61E-06	5,56E-07	1,33E-06
8	2,25E-06	2,80E-07	1,28E-06
10	1,14E-05	2,40E-08	1,44E-06



**Abbildung 18** Geschwindigkeitskonstanten des nichtenzymatischen Zerfalls von Asn-Thia, Pro-Thia und Glu-Thia in Puffern verschiedener pH-Werte (pH 2, 4, 6 Citrat-Puffer nach Sørensen, pH 8 und 10 Boratpuffer nach Sørensen und Clark),  $T = 37^{\circ}\text{C}$ , Konzentration der Verbindungen 0,1 mM, Detektion des nichtenzymatischen Zerfalls mittels Kapillarelektrophorese, siehe experimenteller Teil 5.3.

#### Zerfall der Aminosäurethiazolidide in biologischen Medien

Um erste Anhaltspunkte über die enzymatische Stabilität der Verbindungen in biologischen Medien zu erhalten, wurden die Substanzen mit humanem EDTA-Blut, Serum, Nieren- und Leberrohhomogenat (Schwein) bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Periodisch wurde die endogene DP IV-Restaktivität gegenüber GPpNA in den Inkubationsansätzen ermittelt, und deren Zunahme bzw. Konstanz als Maß für die Stabilität der Inhibitoren ausgewertet. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 19* am Beispiel der Abbaustabilität von Ile-Thia, Asn-Thia und His-Thia in Serum dargestellt. Es konnte gezeigt werden, daß mit Ausnahme von Asn-Thia die untersuchten Verbindungen in allen getesteten biologischen Medien innerhalb von 4 Tagen stabil sind. Das Asn-Thia zerfällt mit einer Geschwindigkeitskonstanten von  $2,8 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 68 \text{ h}$ ), was mit dem bereits ermittelten nichtenzymatischen Zerfall der Verbindung bei entsprechendem pH-Wert korreliert. Zusammenfassend kann geschlußfolgert werden, daß unter den verwendeten Versuchsbedingungen keine Hinweise auf eine enzymatische Beeinflussung der untersuchten Verbindungen, die mit einer Veränderung ihrer Hemmkapazität einhergehen, gefunden werden konnten. Dieses Ergebnis kann jedoch nur als Richtwert betrachtet werden, da beim Aufschluß der entsprechenden biologischen Medien enzymatische Aktivitäten verloren gehen und die Homogenate nur sehr unvollständig den *in vivo*-Bedingungen entsprechen.

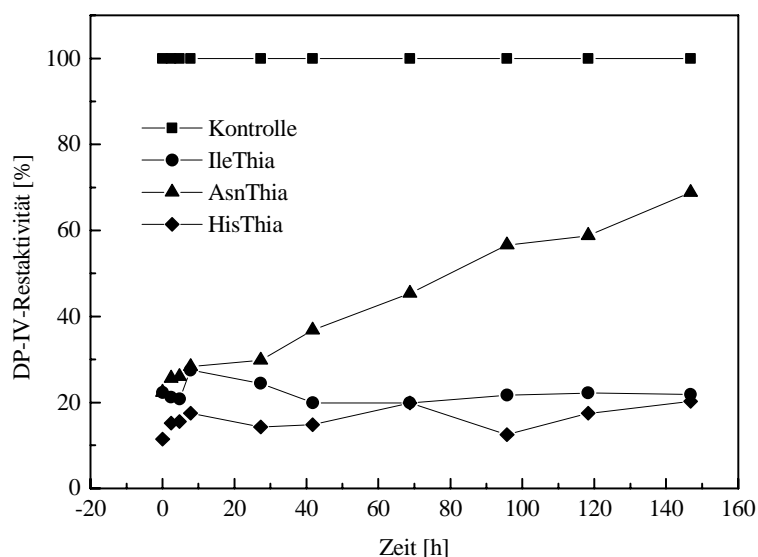


Abbildung 19 Restaktivität der DP IV in Serum bei Inkubation mit verschiedenen Aminosäurethiazolidide bei  $T = 37^{\circ}\text{C}$ , Die DP IV-Restaktivität wurde in einem Standardansatz mit GPpNA als Substrat ermittelt und in % im Vergleich zu einer Kontrolle aufgetragen.

### 3.2.2 Nichtenzymatischer Zerfall der Aminosäurepyrrolidinomethylketone

Durch Strukturmodifikation der Imidbindung der Aminosäurepyrrolidide sollte die Stabilität der Verbindungen mit gleicher Zielstellung wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, beeinflusst werden. Die Geschwindigkeitskonstanten des nichtenzymatischen Zerfalls wurden durch Verfolgung der Abnahme des entsprechenden Massesignals mittels Elektrospray-Massenspektrometer bestimmt. Die Möglichkeit der Quantifizierung von kinetischen Prozessen mittels Massenspektrometrie ist von Pauly und Demuth (1999) beschrieben worden. Aus einer  $10\ \mu\text{molaren}$  Lösung der entsprechenden Verbindung in Ammoniumacetatpuffer pH 7,6 bei Raumtemperatur wurde periodisch eine Probe über ESI-MS analysiert und quantifiziert. Zuvor war der Konzentrationsbereich ermittelt worden, in dem die Signalfläche der Konzentration der untersuchten Verbindungen proportional ist. Die Abnahme der Signalfläche des Massesignals während des Zerfalls wurde durch nichtlineare Regression entsprechend einer Reaktion Pseudo-1.Ordnung ausgewertet. Aus den so ermittelten Geschwindigkeitskonstanten des nichtenzymatischen Zerfalls wurde nach der Gleichung 1 die Halbwertszeit der Verbindungen bestimmt (Tabelle 9).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Gleichung 1

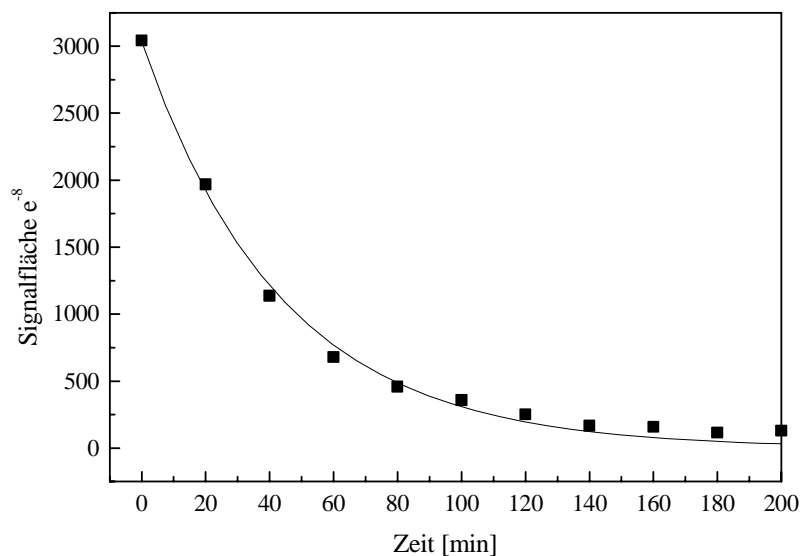


Abbildung 20 Ermittlung der nichtenzymatischen Zerfallsgeschwindigkeit mittels ESI-MS, Abnahme der Signalfläche einer Lösung von Pro-CH<sub>2</sub>-Pyrr (10 μM), gelöst in 20mM Ammoniumacetatpuffer bei pH 7,6 und RT in Abhängigkeit von der Zeit bei Analyse durch Elektrospray-Massenspektrometrie

Tabelle 9 Geschwindigkeitskonstanten Pseudo-1. Ordnung und Halbwertszeiten des nichtenzymatischen Zerfalls der Aminosäurepyrrolidinomethylketone in Ammoniumacetatpuffer pH 7,6 (20mM) bei RT; Hemmkonstanten der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse durch Aminosäurepyrrolidinomethylketone

Verbindung	k [s <sup>-1</sup> ]	t <sub>1/2</sub> [min]	K <sub>i</sub> [μM] (DP IV aus Schweineiere)
Ile-CH <sub>2</sub> -Pyrr	2,2e <sup>-5</sup>	533,2	361,1 ± 26,3
Pro-CH <sub>2</sub> -Pyrr	4,1e <sup>-4</sup>	27,95	163,4 ± 27,5

Mit einer Halbwertszeit des nichtenzymatischen Zerfalls von 28 min entspricht das Pro-CH<sub>2</sub>-Pyrr den in der Zielstellung formulierten Anforderungen an einen DP IV-Inhibitor als potentielles Therapeutikum zur Behandlung von Diabetes Typ 2 hinsichtlich seiner Stabilitätseigenschaften. Andererseits zeigt die Verbindungsklasse der Aminosäurepyrrolidinomethylketone sehr schlechte Hemmeigenschaften gegenüber der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse (Tabelle 9) und kommt für weiterführende Experimente nicht in Betracht, weshalb auf die Untersuchung ihrer Stabilitätseigenschaften in biologischen Medien verzichtet wurde.

### 3.2.3 Nichtenzymatischer Zerfall des O-Benzoyl, N-Glycylphenyl-Hydroxylamins

Diacylhydroxylamine der allgemeinen Struktur  $H-X_{aa}-Y_{aa}-NHO-CO-R$  zerfallen nach Bruch der N-O-Bindung in die entsprechende Säure und die N-Peptidyl-Hydroxamsäure (Demuth, Fischer et al., 1989). Um eine Beeinflussung der kinetischen Analyse der Inaktivierung der DP I durch die nichtenzymatische Zerfallsreaktion des Inhibitors auszuschließen, wurde die Stabilität der Verbindung unter Meßbedingungen untersucht.

Der nichtenzymatische Zerfall des H-GF-NHO-Bz wurde spektrophotometrisch durch Verfolgung der Extinktionsabnahme der Verbindung in MES-Puffer (pH 5,6) bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstante Pseudo-1. Ordnung wurde mittels nichtlinearer Regression nach Auftragung der Extinktionen bei 268 nm als Funktion der Zeit ermittelt und nach Gleichung 1 die Halbwertszeit der Zerfallsreaktion berechnet. Diese beträgt für das H-GF-NHO-Bz 18,4 Stunden. Damit kann eine Beeinflussung der durchgeführten kinetischen Untersuchungen durch den nichtenzymatischen Zerfall des Inhibitors ausgeschlossen werden.

## 3.3 Transportstudien an PepT1

Die wichtigsten biologischen Barrieren, die die orale Verfügbarkeit von Peptiden und peptidähnlichen Strukturen limitieren, sind das proteolytische Milieu des Verdauungstraktes, die Darmschleimhaut als Transportbarriere und die Leber mit ihrer Entgiftungsfunktion.

Zwei verschiedene Mechanismen zur Überwindung der physikalischen Barriere Darmmukosa und dem damit verbundenen Übergang von Substanzen aus dem gastrointestinalen Trakt in das Blut werden für Peptide diskutiert. Diese im folgenden näher beschriebenen Transportvarianten führen je nach physikalischen und chemischen Eigenschaften der applizierten Substanz zu einer guten oder schlechten Absorption von oral verabreichten Peptiden bzw. Peptidomimetica.

- *parazellulärer Transportweg*

Der parazelluläre Transportweg ist ein extrazellulärer passiver Diffusionsprozeß durch die *tight junctions* der Epithelzellen, die die äußerste Begrenzung der Darmmukosa darstellen. Die treibende Kraft kann ein Konzentrationsgradient, ein elektrisches Potential oder ein hydrostatischer Druck zwischen den beiden Seiten des Epithels sein. Die ionischen Gruppen der Proteine in den *tight junctions* weisen eine negative Nettoladung auf und beeinflussen so wahrscheinlich den parazellulären Fluß durch Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen. Diese

Form des passiven Transports ist ein besonders für kleine hydrophile ( $\leq$ Tripeptide) und positiv geladene Moleküle bevorzugter Absorptionsmechanismus. Es wird angenommen, daß er eine Rolle bei der Aufnahme von Thyreotropin-freisetzendem Hormon und 1-Deamino-8-D-Arginine Vasopressin, einem potenten Vasopressinanalogen, spielt (Gangwar, Pauletti et al., 1997).

- *transzellulärer Transport*

Der transzelluläre Transport beschreibt die Bewegung von Stoffen durch die apikale Zellmembran von Epithelzellen infolge von aktiven oder passiven Prozessen.

Die passive Diffusion von Peptiden durch die Zellmembran ist sicherlich infolge des überwiegend hydrophilen Charakters von Peptiden als geringfügig zu erachten, kann aber durch Erhöhung der Lipophilie eines Moleküls relevant werden.

Der aktive Transport von Peptiden durch Zellmembranen erfolgt entweder über vesikuläre Transportmechanismen oder über spezifische Transportproteine.

*vesikulärer Transport*

Peptide, die zu groß für eine Absorption mittels Peptidtransporter oder über die *tight junctions* sind, können über unspezifische (Pinocytose) oder rezeptorvermittelte Endocytose, welche eine primäre Bindung des Peptides an die Plasmamembran erfordert, in die Epithelzellen aufgenommen und zum Teil auch in Endosomen hindurchtransportiert werden (Gangwar, Pauletti et al., 1997).

*Peptidtransporter* (Daniel, 1997)

Bisher sind zwei spezifische Peptidtransporter in Säugern identifiziert und nach erfolgreicher Klonierung umfangreich untersucht worden. Sie zeigen Homologien zu Peptidtransportern, die aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen isoliert wurden und gehören zur sogenannten PTR-Familie der protonenabhängigen Peptidtransporter. Beide unterscheiden sich in ihrer molekularen Masse, im Glykosylierungsmuster, in funktionellen Eigenschaften und vor allem im Ort ihrer Exprimierung. PepT1 ist ein Transporter mit geringer Affinität zu seinen Substraten aber hoher Transportkapazität. Er ist überwiegend in der apikalen Membran von Epithelzellen des Darmtraktes lokalisiert und vor allem verantwortlich für die Absorption von durch proteolytischen Aufschluß aus Nahrungsproteinen freigewordenen Di- und Tripeptiden. PepT2 dagegen ist ein Peptidtransporter mit großer Affinität und geringer maximaler Transportkapazität. Er befindet sich vor allem in den Epithelzellen der Bürstensaummembran der Nierentubuli (Döring, Walter et al., 1998). Dort sorgt er für die Reabsorption von Di- und Tripeptiden aus dem Primärharn, der durch Filtration des Blutes in den Glomeruli entsteht. Bei beiden Transportern ist der Substrateinstrom an einen Protonen-Cotransport gebunden, dessen Antrieb ein

negatives elektrisches Membranpotential ist. Eine weitere Eigenschaft beider Transporter ist ihre Fähigkeit, eine enorme Menge an Di- und Tripeptiden (etwa 400 Dipeptide und 8000 Tripeptide zirkulieren im Plasma) sowie Peptidomimetica sequenzunabhängig zu binden und zu transportieren. Es wurde gezeigt, daß pharmakologisch aktive Verbindungen mit Peptid-Rückgrat, z. B.  $\beta$ -Laktamantibiotika, ACE-Inhibitoren wie Captopril und Peptidase-Inhibitoren wie Bestatin (Döring, Will et al., 1998), Substrate des intestinalen und renalen Peptidtransporters sind (Daniel, 1996). Am besten sind die Anforderungen an ein Substrat, um optimal gebunden und transportiert zu werden, für den renalen Peptidtransporter PepT2 untersucht worden und sollen im folgenden kurz dargestellt werden (Adibi, 1997).

- Eine Blockierung entweder der Aminogruppe oder der Carboxygruppe der Peptide verringert die Affinität dieser Substrate zum PepT2 um eine bis drei Größenordnungen. Außerdem muß sich die Aminogruppe am N-Terminus in  $\alpha$ -Stellung befinden. So ist die Affinität von Ala-Gly um das 200fache größer als die von  $\beta$ -Ala-Gly. Eine starke Hydrophobizität der Seitenketten führt ebenfalls zu einer Verbesserung der Affinität von Substraten zum PepT2.
- Die Konformation der Peptidbindung muß in der trans-Form vorliegen. Peptide mit den Aminosäuren Prolin oder Sarkosin am N-Terminus, bei denen die freie Drehbarkeit um die  $C_{\alpha}$ -NH-Bindung stark eingeschränkt ist, zeigen signifikant verringerte Affinitäten zum Transporter.
- Das Transportsystem zeigt eine starke Stereospezifität für Aminosäuren in der L-Konfiguration. Sind D-Aminosäuren in Peptiden enthalten, so verringert sich die Affinität der Substrate zum PepT2. Peptide mit D-Isomeren an N-terminaler Position können ihre hohe Affinität zum Teil durch eine hydrophobe Seitenkette wiedererlangen.
- Der Transporter ist ein Di- und Tripeptidtransporter. Tetrapeptide und Aminosäuren sind keine Substrate des PepT2.

Das Vorliegen von trans-Peptidbindungen im potentiellen Substrat ist auch Notwendigkeit, um durch PepT1 gebunden und transportiert zu werden (Brandsch, Thuncke et al., 1998). Außerdem wurde von Döring und Will (1998) gezeigt, daß zwei ionische Kopfgruppen, die durch mindestens vier  $CH_2$ -Gruppen (Carboxylgruppe und Aminogruppe mit einem Abstand von  $> 500 \text{ pm} < 630 \text{ pm}$ ) voneinander getrennt sind, das Minimum der Anforderungen für die Substraterkennung durch PepT1 darstellen. Das Vorhandensein einer Peptidbindung im Substrat ist hierfür keine strukturelle Notwendigkeit. Nach dem Ersatz der Peptidbindung durch eine Ketomethylen- oder Thioxofunktion bleibt die Affinität solcher Peptidomimetics zu PepT1 erhalten. Es konnte gezeigt werden, daß  $\omega$ -Aminofettsäuren gute Substrate des PepT1



sind. Die Entfernung entweder der Amino- oder der Carboxylgruppe von  $\omega$ -Aminofettsäuren beeinflusst nicht ihre Affinität zum Transporter, hebt allerdings die Fähigkeit zum Transport auf (Döring, Will et al., 1998).

### 3.3.1 Inhibitionsstudien mit den synthetisierten Verbindungen an PepT1 exprimierenden *Pichia pastoris*-Zellen

Alle Versuche zu den Transporteigenschaften der synthetisierten Verbindungen an dem intestinalen  $H^+$ /Peptid-Symporter PepT1 wurden von der Arbeitsgruppe der Fr. Prof. Daniel am Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Giessen, durchgeführt.

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob die Verbindungen in der Lage sind, den Transport von  $^3H$ -D-Phe-Ala aus dem extrazellulären in den intrazellulären Raum von PepT1<sub>Kaninchen</sub> exprimierenden *P. pastoris*-Zellen zu inhibieren. Dazu wurden die Zellen bei pH 6,5 mit 5 mM der Testverbindung und 80  $\mu$ M des Substrats  $^3H$ -D-Phe-Ala für 30 min inkubiert. Für Substanzen, die bei diesen Untersuchungen mehr als 50% Hemmung der Aufnahme des  $^3H$ -D-Phe-Ala im Vergleich zur Kontrolle zeigten, wurden danach Verdrängungsstudien mit Konzentrationen ( $n=3$ ) der Testsubstanzen zwischen 0,1 und 7,5 mM durchgeführt. Da die Konzentrationen des  $^3H$ -D-Phe-Ala im Experiment weit unterhalb des  $K_m$  des Substrates lagen, entsprechen die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte im Verdrängungsexperiment dem  $K_i$  der Testsubstanzen. Ein ermittelter  $K_i < 10$ mM weist auf eine Bindung der entsprechenden Substanzen an den Transporter hin, ist allerdings noch kein Beweis dafür, daß eine tatsächliche Translokation der Verbindungen in das Zellinnere erfolgt.

In **Tabelle 10** sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefaßt.

Erwartungsgemäß zeigen alle N-terminal geschützten Verbindungen keine Affinität zum intestinalen Peptidtransporter PepT1. Allerdings sind die N-terminal freien Thiazolidide trotz des fehlenden freien Carboxylrestes zum Teil gute Substrate des PepT1 (siehe nächster Abschnitt). Das korreliert mit Befunden von Daniel und Adibi (1994), daß 4-Nitroanilid-Analoga von Dipeptiden trotz fehlender COOH-Gruppe hochaffine Substrate für die Bindung an PepT2 sind. Sie schlußfolgern anhand dieses Ergebnisses, daß das Vorhandensein einer freien Carboxylgruppe nicht essentiell für die Substraterkennung ist. Auch von bestimmten anderen Gruppen, wie sie zum Beispiel der pNA-Rest darstellt, können die strukturellen Anforderungen des Transporters erfüllt werden. Offensichtlich sind auch der Pyrrolidin- und Thiazolidinrest solche Strukturen, wobei die Thiazolidinderivate etwa 5-10 mal besser gebunden werden als die entsprechenden Pyrrolidide.

**Tabelle 10** Effektive Konzentrationen der Verbindungen, die die Bindung von  $^3\text{H-D-Phe-Ala}$  ( $80 \mu\text{M}$ ) an PepT1-exprimierende *P. pastoris*-Zellen um 50% inhibieren ( $\text{EC}_{50}$ -Werte)

Verbindung	$\text{EC}_{50}$ [mM] X = H	$\text{EC}_{50}$ [mM] X = Boc
<b>Aminosäurepyrrolidide und Thiazolidide</b>		
X-Asn-Pyrr	3,01	>10
X-Asn-Thia	0,5	>10
X-His(X)-Pyrr	5,34	>10
X-His(X)-Thia	0,57	>10
X-Ile-Pyrr	2,66	>10
X-Ile-Thia	0,98	>10
X-Asp-Pyrr	>10	>10
X-Asp-Thia	>10	>10
X-Glu-Pyrr	>10	>10
X-Glu-Thia	1,1	>10
<b>N-terminal verlängerte Isoleucinthiazolidide</b>		
H-Pro-Ile-Thia	>10	
H-Pyr-Ile-Thia	>10	
H-Pyr-His-Thia	>10	
H-Gly-Pro-Ile-Thia	>10	
H-Pro-Pro-Ile-Thia	>10	
H-Ile-Pro-Ile-Thia	0,2	
<b>Seitenkettenmodifizierte Glutaminsäurethiazolidide</b>		
H-Glu(Gly)-Thia	3,18	
H-Glu(Gly <sub>3</sub> )-Thia	8,54	
H-Glu(Gly <sub>5</sub> )-Thia	>10	
H-Glu(PEG)-Thia	>10	

Die Verbindungen mit den Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure haben beim untersuchten pH 6,5 mit einer Ausnahme aufgrund ihrer anionischen Seitenkette nur geringe Affinität zum PepT1. Ungewöhnlich ist die relativ gute Bindungskonstante für das Glu-Thia. Prinzipiell ist PepT1 nach Amasheh und Wenzel (1997) in der Lage, alle Di- und Tripeptidsubstrate mit unterschiedlicher Nettoladung zu transportieren. Dabei ist der  $K_m$ -Wert von zwitterionischen Peptiden für PepT1 nur leicht durch Änderungen im pH-Wert oder im Membranpotential zu beeinflussen, wohingegen die Affinität von Substraten mit einer Netto-

ladung stark von beiden Parametern (pH-Wert und Membranpotential) abhängt. So erhöht sich die Affinität von PepT1 zu anionischen Substraten mit niedrigeren pH-Werten. Amasheh und Wenzel (1997) machen dafür zwei Faktoren verantwortlich, zum einen das Ansteigen des Anteils an neutral vorliegendem Substrat mit Erniedrigung des pH-Wertes, zum anderen die Sättigung von Protonenbindungsstellen am Transporter selbst.

Die N-terminal verlängerten Isoleucinthiazolidide und Pyr-His-Thia sind ebenfalls mit einer Ausnahme keine Substrate des intestinalen Peptidtransporters. Für die Tetrapeptide entspricht das der bereits bekannten Tatsache, daß Peptide mit mehr als 3 Aminosäuren vom Peptidtransporter nicht transportiert werden. Bei den Tripeptiden handelt es sich in allen Fällen um Verbindungen mit den Aminosäuren Prolin bzw. Pyroglutamat an N-terminaler Position, also Aminosäuren mit eingeschränkter Drehbarkeit um die C<sub>α</sub>-NH-Bindung.

Die gute Bindungseigenschaft des IPITHias, die wie im nächsten Abschnitt dargestellt, auch mit einer guten Transportierbarkeit durch PepT1 einhergeht, ist überraschend. Möglicherweise werden Nachteile hinsichtlich der Substrateigenschaften infolge der Größe des Moleküls durch den weitgehend hydrophoben Charakter der Seitenketten der Aminosäuren des gesamten Moleküls aufgehoben.

Die seitenkettensubstituierten Glutaminsäurethiazolidide zeigen zum Teil moderate Bindungseigenschaften, die mit zunehmender Kettenlänge des Substituenten schlechter werden. Ab einer Kettenlänge von 5 Gly-Einheiten ist keine effektive Bindung der Substanzen an den intestinalen Transporter zu verzeichnen.

### **3.3.2 Elektrophysiologische Analyse des Transportverhaltens ausgewählter Verbindungen in PepT1 exprimierenden *Xenopus leavis* Oozyten**

Die aus den Untersuchungen in Hefen hervorgegangenen Verbindungen, die eine Affinität zu PepT1 zeigten, wurden mit der klassischen Zwei-Elektroden-Spannungscamp-Methode (Boll, Herget et al. 1995) auf ihre Transportierbarkeit durch den intestinalen Peptidtransporter geprüft. Dazu wurden PepT1<sub>human</sub> exprimierende Oocyten von *X. leavis* mit den Verbindungen in einer Konzentration von 2,5 mM bei einem pH von 6,0 perfundiert. Das Membranpotential des Oocyten wurde bei -60 mV konstant gehalten und der durch den Substrattransport induzierte Einwärtsstrom in den Zellen registriert. Substanzen, die mehr als 20 nA generieren können, sind als Substrate des Transporters PepT1 anzusehen. Das Dipeptid Glycyl-L-Glutamin diente als Standard. Die maximalen Ströme, die durch den Transport von Gly-Gln erzeugt werden können, liegen bei durchschnittlich 200 nA.

Die in **Tabelle 11** dargestellten Ergebnisse zeigen, daß lediglich das Asn-Thia eine gute (dem Aminocephalosporin vergleichbare) Verfügbarkeit gegenüber PepT1 aufweist. Die Verbindungen Ile-Pro-Ile-Thia, Ile-Thia und Glu-Thia zeigen mittlere Verfügbarkeit gegenüber PepT1 (vergleichbar mit Aminopenicillinen).

**Tabelle 11** Ergebnisse der Untersuchungen zum Transportverhalten von ausgewählten Verbindungen an PepT1-exprimierenden Oocyten von *X. leavis* - mittels Zwei-Elektroden-Spannungsclamp-Methode ermittelte, durch den Transport der Verbindungen generierte Einwärtsströme [nA]

Verbindung	$I_{\max}$ [nA]
H-Asn-Pyrr	$30 \pm 5$
H-Asn-Thia	$83 \pm 11$
H-His-Pyrr	$7 \pm 5$
H-His-Thia	$12 \pm 6$
H-Ile-Pyrr	$14 \pm 6$
H-Ile-Thia	$25 \pm 8$
H-Glu-Pyrr	$9 \pm 6$
H-Glu-Thia	$35 \pm 13$
Ile-Pro-Ile-Thia	$44 \pm 12$

Allein aus diesen Ergebnissen lassen sich noch keine endgültigen Rückschlüsse über die orale Bioverfügbarkeit von Ile-Thia und anderen DP IV-Inhibitoren als potentielle Pharmaka zur Beeinflussung der Glukosetoleranz bei Diabetes Typ 2 ziehen. Sie weisen aber darauf hin, daß Ile-Thia ein Substrat des intestinalen Peptidtransporters darstellt und prinzipiell die Darmschleimhaut kein unüberwindbares Hindernis sein sollte. Allerdings kann als möglicher Aufnahmemechanismus auch der parazelluläre Transport über die *tight junctions* diskutiert werden, da das Molekül optimal die Anforderungen für solch eine Transportform erfüllt.

### 3.4 Tierexperimentelle Untersuchungen

Durch erste tierexperimentelle Untersuchungen sollte geprüft werden, ob die Hemmung der Serum-DP IV nach oraler Applikation eines DP IV-Inhibitors und die damit verbundene Verlängerung der Halbwertszeit der endogenen Inkretine GLP und GIP ein neuer therapeutischer Ansatz sein könnte, um die gestörte Glukosetoleranz beim Diabetes Typ 2 positiv zu beeinflussen. An einen DP IV-Inhibitor als potentiell Pharmakon wurden folgende Anforderungen gestellt:

- Leichter synthetischer Zugang und natürliche Aminoacylreste als Bestandteile
- Effektive und reversible Inhibierung der DP IV
- Orale Bioverfügbarkeit

Diese Anforderungen werden sehr gut von dem DP IV-Inhibitor Isoleucinthiazolidid erfüllt. Mit einem  $K_i$ -Wert von  $0,08 \mu\text{M}$  ist er einer der besten kompetitiven Inhibitoren der DP IV-katalysierten Substrathydrolyse. Die orale Bioverfügbarkeit war nach in Abschnitt 3.3 dargestellten Transportstudien sehr wahrscheinlich und wurde von Schmidt (1997) nachgewiesen. Ile-Thia ist ein kleines Molekül, synthetisch leicht zugänglich und nach theoretischen Überlegungen sind biogene Stoffe als Abbauprodukte *in vivo* zu erwarten. Nachdem das S-Oxid des Isoleucinthiazolidids im Plasma von mit Ile-Thia behandelten Ratten nachgewiesen werden konnte, wird von uns als möglicher Abbauweg der in *Abbildung 21* dargestellte Mechanismus postuliert. Dabei wird das Ile-Thia zu den biogenen Stoffwechselprodukten Isoleucin und Taurin metabolisiert.

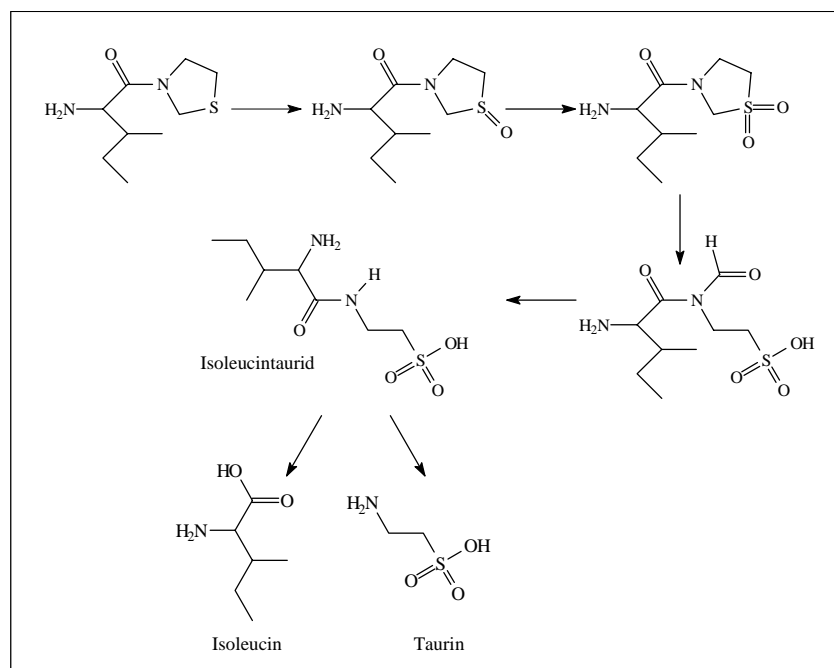


Abbildung 21 Ein theoretisch möglicher Abbauweg von Ile-Thia *in vivo*

Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente war es, Aussagen über die orale Verfügbarkeit von Ile-Thia zu gewinnen. Dazu mußte eine Methode zur Bestimmung der DP IV-Restaktivität im Plasma in Abhängigkeit von der Menge des oral applizierten Ile-Thiazolidids entwickelt werden. Des weiteren wurden der Einfluß von oral verabreichtem Ile-Thia sowie den *prodrugs* Pro-Ile-Thia und Gly-Pro-Ile-Thia auf die Plasmaglukose- und Plasmainsulinkonzentration nach einem oralen Glukose-Toleranztest an normoglykämischen und hyperglykämischen Ratten untersucht.

### 3.4.1 Ile-Thia-Konzentrationsbestimmung in Plasma

Voraussetzung für die pharmakokinetische Bewertung von potentiellen Therapeutika ist, daß Konzentration und dynamisches Verhalten eines Wirkstoffs am Zielort ermittelt werden können. Deshalb war es notwendig, eine geeignete Methode zu finden, die es ermöglicht, die Ile-Thia-Konzentration im Plasma nach oraler Verabreichung des Inhibitors an Versuchstieren zu bestimmen.

#### 3.4.1.1 Indirekte Bestimmung der Ile-Thia-Konzentration in Plasma über die DP IV-Restaktivität

Isoleucinthiazolidid ist ein kompetitiver Inhibitor der DP IV. Hemmstoff und Substrat konkurrieren um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum. Die Maximalgeschwindigkeit der Substratspaltung wird nicht beeinflußt, da das Substrat bei sehr großem Überschuß den Inhibitor vollständig verdrängt. Die Michaelis-Menten-Konstante wird scheinbar um den Faktor  $i$  ( $i = 1 + [I_0]/K_i$ ) vergrößert. Nach Einsetzen des Faktors  $i$  in die Michaelis-Menten-Gleichung zur Beschreibung von Enzym-Substrat-Reaktionen (Gleichung 2), erhält man Gleichung 3 zur Beschreibung einer kompetitiven Hemmung.

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S_0]}{[S_0] + K_m} \quad \text{Gleichung 2}$$

$$v_i = \frac{V_{\max}[S_0]}{[S_0] + K_m \left(1 + \frac{[I_0]}{K_i}\right)} \quad \text{Gleichung 3}$$

Wählt man ein Vielfaches von  $K_m$  als Substratkonzentration (in diesem Fall  $S_0 = 4 K_m$ ), so vereinfacht sich Gleichung 2 zu

$$V_{\max} = \frac{5}{4} v_0 \quad \text{Gleichung 4}$$

Gleichung 4 eingesetzt in Gleichung 3 führt nach Vereinfachung und Umstellung nach  $I_0$  zu Gleichung 5. Aus dieser Gleichung können mit den bekannten kinetischen Parametern der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GpNA sowie der kompetitiven Hemmung dieser Spaltung mit Ile-Thia (**Tabelle 12**) die gesuchten Inhibitorkonzentrationen anhand der ermittelten DP IV-Restaktivität (bestimmt in einem externen Meßansatz mit  $S = 4 K_m$ ) berechnet werden.

$$[I_0] = \left( \frac{5v_0}{v_i} - 5 \right) K_i \quad \text{Gleichung 5}$$

Ist die Inhibitorkonzentration im Meßansatz berechnet, muß dieser Wert noch mit dem Faktor, um den das Plasma im Ansatz verdünnt wurde, multipliziert werden, um die tatsächlich im Plasma vorliegende Inhibitorkonzentration zu erhalten.

**Tabelle 22** Kinetische Parameter der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GpNA sowie der kompetitiven Hemmung dieser Spaltung mit Ile-Thia durch DP IV aus Mensch, Ratte (ungereinigte Serumenzyme) und Schweineiere (gereinigt)

Parameter	DP IV <sub>Schwein</sub>	DP IV <sub>hum. Serum</sub>	DP IV <sub>Serum Ratte</sub>
<b>K<sub>m</sub> [µM] (GpNA)</b>	124,3 ± 10,8	150,2 ± 14,0	160,7 ± 14,9
<b>K<sub>i</sub> [nm] (Ile-Thia)</b>	82	120	120

Die Methode hat eine Reihe von Nachteilen. Bei der rechnerischen Bestimmung der Ile-Thia-Konzentration im Plasma über die Restaktivität der endogenen DP IV geht in die Gleichung als Substrat nur das exogen zugegebene GpNA ein. Endogen vorliegende Substrate, die bei der Hemmung der DP IV mit dem kompetitiven Inhibitor Ile-Thia ebenfalls um das aktive Zentrum konkurrieren, werden in dem Rechenansatz nicht berücksichtigt. Daraus könnte sich die in *Abbildung 22* dargestellten Differenzen zwischen berechneten und experimentell ermittelten DP IV-Restaktivitäten in Plasma ergeben. Auch physiologisch bedingte Änderungen der Konzentrationen dieser endogenen Substrate über einen längeren Versuchszeitraum, vielleicht sogar in Zusammenhang mit dem OGTT, bleiben unberücksichtigt. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, daß die im Aktivitätstest erfolgte Verdünnung des Plasmas zu einer im Vergleich zum hinzugefügten GpNA vernachlässigbaren Konzentration dieser natürlichen Substrate der DP IV führt und das Ergebnis durch sie nur geringfügig beeinflusst wird.

Ein weiterer Nachteil des beschriebenen Tests zur Bestimmung der Plasma-Ile-Thia-Konzentration ist die Abhängigkeit des Tests von der endogen im Plasma vorliegenden löslichen DP IV und damit auch von ihren individuellen und periodischen Schwankungen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse könnte dadurch negativ beeinflusst werden. Ebenso kann der physiologische Zustand und die damit verbundenen Änderungen in den Plasmabestandteilen von getesteten Individuen Einfluß auf die Resultate haben.

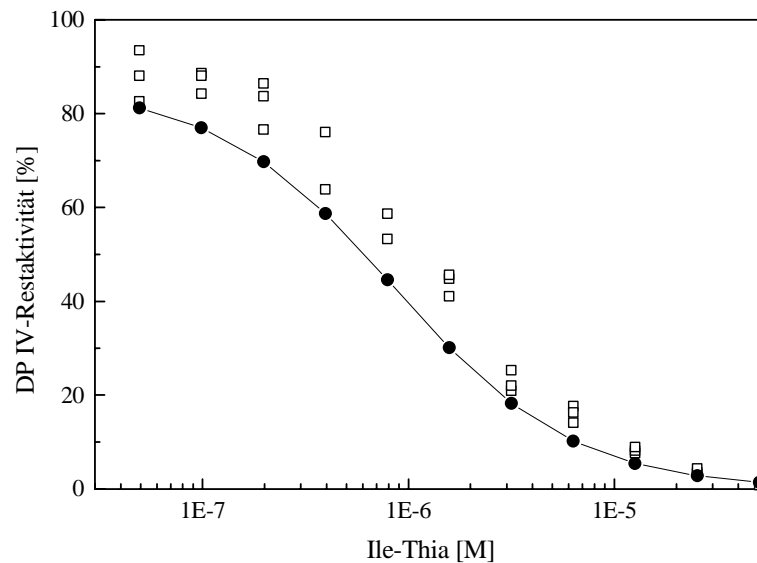


Abbildung 22 Darstellung der Übereinstimmung von berechneter DP IV-Restaktivität ( ) und durch Messung in humanem Plasma bestimmter DP IV-Restaktivität (  $\square$  ) nach Zugabe von Ile-Thia. Die Berechnung der theoretischen Restaktivität erfolgte nach Gleichung 5. Die tatsächliche Restaktivität wurde nach Methode 5.4.4 A ermittelt.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimente wurde der Test trotz seiner Nachteile zur Bestimmung der Ile-Thia-Plasmakonzentration nach oraler Gabe angewendet, da er relativ einfach und mit geringem Zeitaufwand durchzuführen ist. Um den generellen Einfluß der oralen Gabe von DP IV-Inhibitoren auf die Aktivität der Plasma-DP IV untersuchen zu können, sollte die Genauigkeit der beschriebenen Methode ausreichen. Für eine pharmakokinetische Bewertung von DP IV-Inhibitoren mit dem Ziel der Etablierung als neues Therapeutikum zur Behandlung von Diabetes Typ 2 ist es allerdings notwendig, einen Test zu entwickeln, der es zuläßt, die Inhibitorkonzentration im Plasma unabhängig von individuellen und periodischen Unterschieden in der endogenen DP IV-Aktivität der getesteten Individuen zu bestimmen.

Aus den genannten Gründen sollte versucht werden, die endogene DP IV im Plasma auszuschalten und die Ile-Thia-Konzentration mittels exogener DP IV definierter Aktivität und Menge zu bestimmen.



#### *Indirekte Bestimmung der Ile-Thia-Konzentration in Plasma über die Restaktivität exogener DP IV*

Im Rahmen einer Praktikumsarbeit wurde von Theresia Walter (1999) versucht, nach Inaktivierung der endogenen DP IV mit 4-(2-Aminoethyl-)benzylsulfonylfluorid, die Ile-Thia-Konzentration in humanem Plasma über die Restaktivität hinzugefügter gereinigter DP IV aus Schweineniere zu ermitteln. Trotz verschiedener Optimierungsversuche stellte sich auch hierbei heraus, daß verschiedene Plasmabestandteile sowohl die DP IV-Aktivität als auch das Vorliegen von ungebundenem Ile-Thia im Plasma beeinflussen. Diese Bestandteile unterliegen individuellen und periodischen Schwankungen, was zum einen zu Streuungen bei der Bestimmung der  $v_0$ -Werte der DP IV-Aktivität und zum anderen zu unterschiedlichen Verhältnissen von gebundenem zu freiem Ile-Thia führte.

#### **3.4.1.2 Versuch der Entwicklung eines verdünnungsunabhängigen DP IV-Aktivitätstests**

Die DP IV ist im Vollblut nicht nur als lösliches Enzym vorhanden, sondern auch als membrangebundenes Protein auf der Oberfläche von T-Lymphozyten lokalisiert. Um die Restaktivität der Gesamtheit der im Vollblut vorhandenen DP IV-Aktivität erfassen zu können, sollte ein Verfahren entwickelt werden, mit dem die Aktivität der DP IV direkt in Vollblut bestimmt werden kann. Dazu wurde Tyr-Pro an eine EAH-Sepharose mit einem 10 C-Atome langen Spacer gekoppelt und das Tyrosin mit  $J^{125}$  markiert. Dieses Substrat sollte anschließend mit konstanten Mengen Vollblut inkubiert werden in der Annahme, daß die DP IV das Tyr-Pro von der Sepharose spaltet. Die Reaktion wurde nach einem definierten Zeitraum abgestoppt, die Sepharose abzentrifugiert und die Radioaktivität im Überstand als potentielles Maß der DP IV-Restaktivität bestimmt. Bei Testversuchen mit gereinigter DP IV aus Schweineniere konnte keine Zunahme der Radioaktivität im Überstand im Vergleich zu einem Kontrollansatz ohne Enzym festgestellt werden. Offensichtlich ist die DP IV nicht in der Lage Substrate zu erkennen, die an hochmolekulare Träger gebunden sind. Das korreliert mit Ergebnissen von J. Rahfeld (persönliche Mitteilung), dessen Versuche, die DP IV durch Affinitätschromatografie mit an eine Matrix gebundenen kompetitiven Inhibitoren zu reinigen, nicht erfolgreich waren. Nachdem es 1998 (Fülöp, Bocskei et al.) gelang, die Kristallstruktur der POP aus Schweine-muskel aufzuklären, lassen erste Strukturanpassungen vermuten, daß das aktive Zentrum der DP IV wie bei der POP eine tiefe Tasche darstellt, die durch eine Art Klappe verdeckt wird (W. Brandt, persönliche Mitteilungen). Daraus könnte, ähnlich wie bei der POP, die Limitierung der Größe von potentiellen Substraten resultieren.

### 3.4.1.3 Direkte Bestimmung der Ile-Thia-Konzentration in Plasma mittels MS

Da die Genauigkeit der indirekten Bestimmung der Ile-Thia-Konzentration in Plasma über die DP IV-Restaktivität den Anforderungen einer pharmakokinetischen Studie zur Etablierung eines neuen Wirkstoffes als Pharmakon nicht ausreicht, wurde in der Arbeitsgruppe von F. Rosche eine Methode entwickelt, Ile-Thia im Plasma von Versuchstieren oder Probanden mittels MS-MS quantitativ zu bestimmen. Dazu wird das Plasma über Festphasenextraktion vorgereinigt, anschließend eingeengt und in 80% MeOH/H<sub>2</sub>O aufgenommen. Mittels LC-MS/MS wird das Produkt 86 (Immoniumion des Isoleucins) der Masse 203 (Ile-Thia) unter Verwendung eines internen Standards detektiert und quantifiziert.

### 3.4.2 Dosis-Wirkungskurve für die orale Applikation von Ile-Thia

Nachdem von Schmidt (1997) die generelle orale Verfügbarkeit von Ile-Thia im Plasma von Ratten erwähnt, aber nicht näher beschrieben worden ist, sollte dieser Versuch wiederholt und eine Abhängigkeit der im Plasma gefundenen Ile-Thia-Konzentration von der oral applizierten Menge des DP IV-Inhibitors ermittelt werden. Dazu erhielten jeweils 5 Wistar-Ratten 0, 5, 15, 30, 50 oder 100 µmol Ile-Thia pro 300 g Körpergewicht mittels einer Schlündelsonde. In definierten Zeitabständen wurde den Tieren Blut entnommen, dieses zentrifugiert und in den so gewonnenen Plasmaproben die DP IV-Restaktivität bestimmt. Aus den ermittelten Werten wurde nach unter 3.4.1.1 beschriebenem Verfahren die maximal im Plasma erreichte Ile-Thia-Konzentration berechnet.

Inzwischen ist in Zusammenarbeit mit J. Freyse vom Institut für Diabetesforschung Karlsburg gezeigt worden, daß eine Dosis von 5 µmol Ile-Thia / 300 g KG hinsichtlich ihrer positiven Wirkung auf die Glukosetoleranz nach OGTT optimal ist (Freyse, Knospe et al., 1999). Eine weitere Erhöhung der Dosis führte zu keiner zusätzlichen Verbesserung der Glukosetoleranz. Des weiteren konnte er zeigen, daß eine Gabe des Inhibitors einige Minuten vor dem OGTT ebenfalls zu einer Optimierung der Wirkung führte.

Beim damaligen Stand der Untersuchungen entschieden wir uns dafür, alle weiterführenden Experimente *in vivo* mit einer oralen Dosis von 20 µmol / 300 g Körpergewicht durchzuführen. Die damit erzielte Ile-Thia-Serumkonzentration von 5 µM verringert die DP IV-Restaktivität in einem Standardtestansatz (GppNA = 4 K<sub>m</sub>) auf 8,6 %. Diese Hemmung sollte ausreichen, die Spaltung von DP IV-Substraten *in vivo* nahezu vollständig zu blockieren.

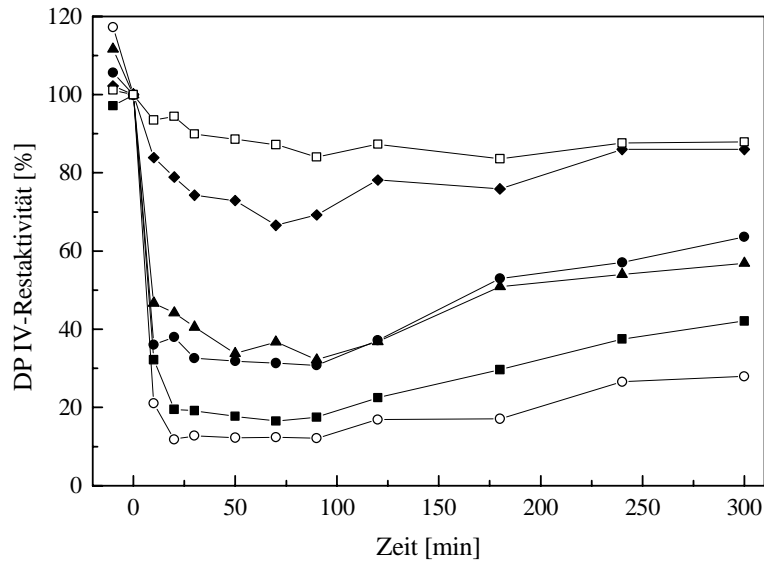


Abbildung 23 DP IV-Restaktivität im Plasma von Wistar-Ratten ( $n = 5$  für jede Gruppe) nach oraler Gabe verschiedener Dosen Ile-Thia (bezogen auf 300 g KG:  $\square$  Kontrolle,  $\bullet$  5  $\mu\text{mol}$ ,  $\circ$  15  $\mu\text{mol}$ ,  $\blacktriangle$  30  $\mu\text{mol}$ ,  $\blacksquare$  50  $\mu\text{mol}$ ,  $\blacklozenge$  100  $\mu\text{mol}$ ), DP IV-Aktivitäts-Bestimmung:  $S = 0,64$  mmol. Die DP IV-Aktivitäten zum Zeitpunkt 0 wurden 100 % gesetzt. Die darauffolgenden Meßwerte beziehen sich auf diese Werte.

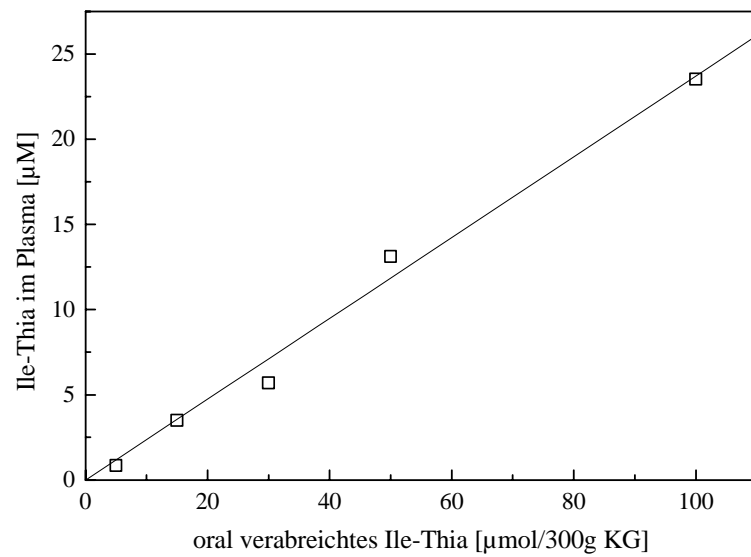
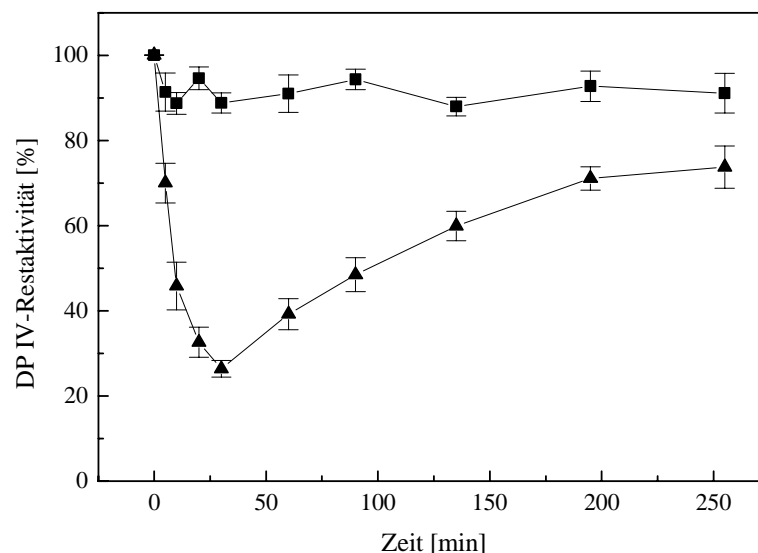


Abbildung 24 Darstellung der nach Gleichung 5 berechneten Ile-Thia-Konzentrationen im Plasma von Wistar-Ratten in Abhängigkeit von der Dosis des oral verabreichten Ile-Thia bei  $t = 50$  min (siehe Abbildung 23)

### 3.4.3 Reaktivierung der DP IV im Plasma nach einmaliger oraler Gabe von Ile-Thia

In *Abbildung 25* ist die Restaktivität der Plasma-DP IV nach einmaliger oraler Gabe von 20  $\mu\text{mol}$  Ile-Thia / 300 g KG an Wistar-Ratten dargestellt. Die Hemmung der DP IV erreicht nach 30 min ihren maximalen Wert. Zu beachten ist, daß im Assay zur Bestimmung der DP IV-Restaktivität die Ile-Thia-Konzentration verdünnt wird, so daß das Erreichen von 75 % DP IV-Aktivität nach 4 Stunden nicht dem real im Blut vorliegenden Wert entspricht. Nach Berechnung der im Plasma vorliegenden Ile-Thia-Konzentration 4 h nach der oralen Applikation (856 nM) ergibt sich eine DP IV-Restaktivität im unverdünnten Plasma gegenüber 0,64 mM GPPNA von 33 %. Es ist also davon auszugehen, daß die Plasma-DP IV über einen Zeitraum von mehreren Stunden stark gehemmt ist.



*Abbildung 25* DP IV-Restaktivität im Plasma nach einmaliger oraler Gabe von Ile-Thia (20  $\mu\text{mol}$  / 300 g KG) an Wistar-Ratten ( $n = 3$ ), Die im Assay verwendete Substratkonzentration entsprach 0,26 mM. Das Plasma wurde um den Faktor 10 verdünnt. Meßbedingungen siehe experimenteller Teil 5.4.4

### 3.4.4 Orale Gabe von Ile-Thia an Wistar-Ratten - Einfluß auf die Glukosetoleranz

Nachdem die orale Verfügbarkeit und schnelle Absorption von Ile-Thia in Ratten gezeigt worden ist, sollte untersucht werden, ob die Inhibierung der Plasma-DP IV einen Einfluß auf die Insulin- und Glukosekonzentration im Plasma von Ratten nach einem OGTT hat. Dazu wurde 6 Wistar-Ratten (nach Nahrungsentzug über Nacht) eine orale Dosis von 20  $\mu\text{mol}$  Ile-Thia pro 300 g Körpergewicht (0,1 M in destilliertem Wasser) gemeinsam mit einer Glukoseladung (1 g / kg KG) appliziert. In definierten Zeitabständen wurde von der Schwanzvene der

Tiere eine Blutprobe mit heparinisierten Röhrchen entnommen, diese zentrifugiert und das Plasma sofort auf die DP IV-Restaktivität und den Glukosegehalt hin untersucht.

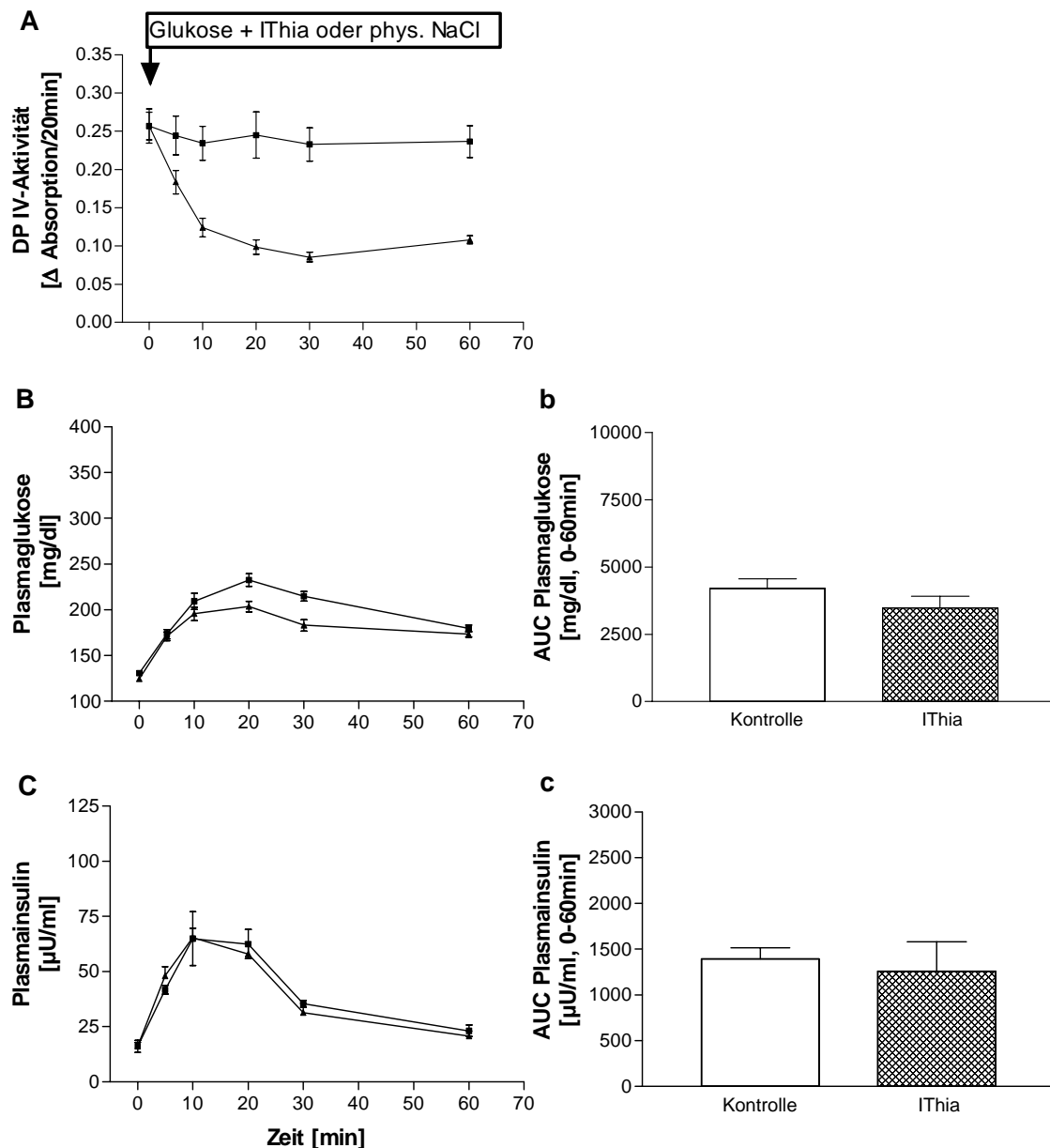


Abbildung 26 Einfluß der oralen Gabe von Ile-Thia ( $\approx 20 \mu\text{mol} / 300 \text{ g KG}$ , , Kontrolle) auf den Verlauf der Plasma-DP IV-Aktivität (A), Plasmaglukose- (B) und Plasmainsulinkonzentration (C), G-AUC<sub>0-60min</sub> (b) und I-AUC<sub>0-60min</sub> (c) nach OGTT (1 mg / 1 kg KG) bei Wistar-Ratten (n = 6 für jede Gruppe)

Die Insulinbestimmung erfolgte mittels eines RIA's (Pederson, Buchan et al., 1982). Einer Kontrollgruppe von ebenfalls 6 Tieren wurde anstelle des Inhibitors eine adäquate Menge einer physiologischen Kochsalzlösung verabreicht. Die Inhibierung der DP IV durch oral verabreichtes Ile-Thia führte im Falle der Wistar-Ratten zu keiner signifikanten Beeinflussung der Plasmainsulinkonzentration nach einem OGTT (Abbildung 26). Auch die von Pauly und Demuth (1999) gefundene zeitliche Verschiebung der maximalen Insulinkonzentration nach

intravenöser Inhibitorgabe konnte nicht reproduziert werden. Die Plasmaglukosekonzentration zeigt eine leichte Abnahme des Maximalwerts bei 20 min (von  $230 \pm 8$  auf  $185 \pm 2,3$  mg/dl) bei der inhibitorbehandelten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Insgesamt kommt es zu einer geringfügigen, aber nichtsignifikanten Abnahme der integrierten Glukosefläche ( $G-AUC_{0-60 \text{ min}}$ ) in den ersten 60 min nach OGTT bei der Ile-Thia-behandelten Gruppe. Der fehlende Effekt des Ile-Thias auf die Glukosetoleranz nach OGTT könnte darauf zurückzuführen sein, daß es sich bei den verwendeten Ratten um sehr junge und gesunde Tiere mit optimal funktionierenden Regulationsmechanismen gehandelt hat. Diese Tiere weisen von vornherein eine größere Glukosetoleranz auf als ältere Tiere. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden bei wiederholenden Experimenten von Dr. J Freyse am Diabetesinstitut in Greifswald ältere Tiere verwendet und außerdem der OGTT mit 2 g pro kg Körpergewicht durchgeführt. Dabei konnte eine signifikant verbesserte Glukosetoleranz nach Inhibitorapplikation nachgewiesen werden.

### **3.4.5 Die Zucker-Ratte – ein Tiermodell für den Diabetes Typ 2 des Menschen**

Die adipöse Zucker-Ratte (*Zucker fatty rat*) wurde 1961 erstmals von Zucker und Zucker beschrieben. Sie zeichnet sich durch Hyperphagie, Hyperlipidämie und eine milde Glukoseintoleranz aus (Bray & Yorck, 1972; Zucker & Zucker, 1962; Ionescu, Sauter et al., 1985). Die Adipositas wird ab einem Alter von 21 Tagen von einer Hyperinsulinämie begleitet (Zucker & Antoniades, 1972; Chan, Pederson et al., 1985). Die Zucker-Ratte dient als Modell des Diabetes Typ 2 des Menschen, da Glukoseintoleranz und Hyperinsulinämie das Frühstadium dieser Erkrankung charakterisieren.

Primäre Ursache der pathologischen Veränderungen in Zucker-Ratten ist die rezessive Vererbung einer Punktmutation (CAG  $\rightarrow$  CCG) im Leptinrezeptorgen (Fa) auf Chromosom 5. Diese Mutation führt zu einer Gln<sub>269</sub>  $\rightarrow$  Pro-Substitution in der extrazellulären Domäne des Leptinrezeptors und seinem Funktionsverlust (Phillips, Liu et al., 1996; Iida, Murakami et al., 1996). Leptin ist ein von Adipozyten synthetisiertes Peptidhormon, das eine Rolle bei der Regulation des Eßverhaltens und der Stoffwechselrate spielt (Zhang, Proenca et al., 1994).

Die Mechanismen, die zu einem erhöhten Insulinspiegel unter Fasten- und stimulierten Bedingungen führen, werden vielfältig diskutiert. Eine erhöhte parasympatische Stimulation des endokrinen Pankreas (Jeanrenaud, 1985), die Überaktivität der  $\beta$ -Zell-Glukokinase (Chan, 1995) sowie die Erniedrigung der Glukoseschwelle der insulinotropen Wirkung von GIP (Chan, Pederson et al., 1985) und GLP-1 (Jia, Elliott et al., 1995) sind als Ursache der Hyperinsulinämie in Zucker-Ratten vorgeschlagen worden. Außerdem zeigt die Leber von Zucker-

Ratten nach chronischer Exposition von hohen Insulinkonzentrationen eine verminderte Fähigkeit des Insulinabbaus (Jeanrenaud, 1985).

Nach intensiven Untersuchungen an einer Variante der adipösen Zucker-Ratte, die einen manifesten Diabetes entwickelt (ZDF-Ratte, Zucker *diabetic fatty rat*), schlagen Unger (1997) und Zhou (1998) als Mechanismus der Entwicklung von Hyperinsulinämie und Hyperglukagonämie die lipotoxische  $\beta$ -Zellschädigung nach der Überexpression von lipogenen Enzymen und der Akkumulation von Triglyceriden vor. Normalerweise wird der Triglyceridgehalt in den  $\beta$ -Zellen von Leptin limitiert (Shimabukuro, Koyama et al., 1997). Bei Dysfunktion des Leptinrezeptors ist dieser Regulationsmechanismus ausgeschaltet.

### **3.4.6 Orale Gabe von Ile-Thia an schlanke Zucker-Ratten - Einfluß auf die Glukosetoleranz**

Die phänotypisch normalen Zucker-Ratten haben im Gegensatz zu ihren adipösen Geschwistern (fa/fa-Typ) mindestens ein Allel für den Leptinrezeptor, das die Gln<sub>269</sub> → Pro-Mutation nicht trägt, deshalb die Bezeichnung Fa/? – Typ.

Die orale Gabe von Ile-Thia gemeinsam mit einer Glukoseladung an schlanke Zucker-Ratten führte zu einer Veränderung des Glukose- und Insulinprofils in den ersten 60 min im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (*Abbildung 27*). So war die maximale Insulinkonzentration zum Zeitpunkt 10 min in der inhibitorbehandelten Gruppe um 33% höher als bei den Kontrolltieren (89,5 gegenüber 59,4  $\mu$ U/ml). Der integrierte Insulinwert (I-AUC<sub>0-60 min</sub>) nach OGTT vergrößerte sich um 24% unter dem Einfluß von Ile-Thia (2337 gegenüber 1882  $\mu$ U/ml). Dieser Unterschied ist aufgrund der großen Fehlerabweichungen nicht signifikant. Dagegen ist die Abnahme des G-AUC<sub>0-60 min</sub> um 22% unter DP IV-Inhibitoreinfluß statistisch abgesichert (4913 gegenüber 6313 mg/dl,  $P < 0,05$ ). Die Maximalkonzentration der Plasmaglukose wird 20 min früher erreicht als in der Kontrollgruppe und ist um 16% erniedrigt (233 gegenüber 278 mg/dl).

Im Gegensatz zu den Wistar-Ratten konnte bei den schlanken Zucker-Ratten ein Einfluß des DP IV-Inhibitors Ile-Thia auf die Glukosetoleranz nach OGTT gezeigt werden. Die verwendeten Tiere waren älter als die Wistar-Ratten und ein Vergleich der integrierten Glukosewerte in den ersten 60 min nach OGTT der Kontrollgruppen (Wistar: 4249 mg/dl, Zucker: 6313 mg/dl) unterstützen die Annahme der größeren Glukosetoleranz bei jüngeren Ratten.

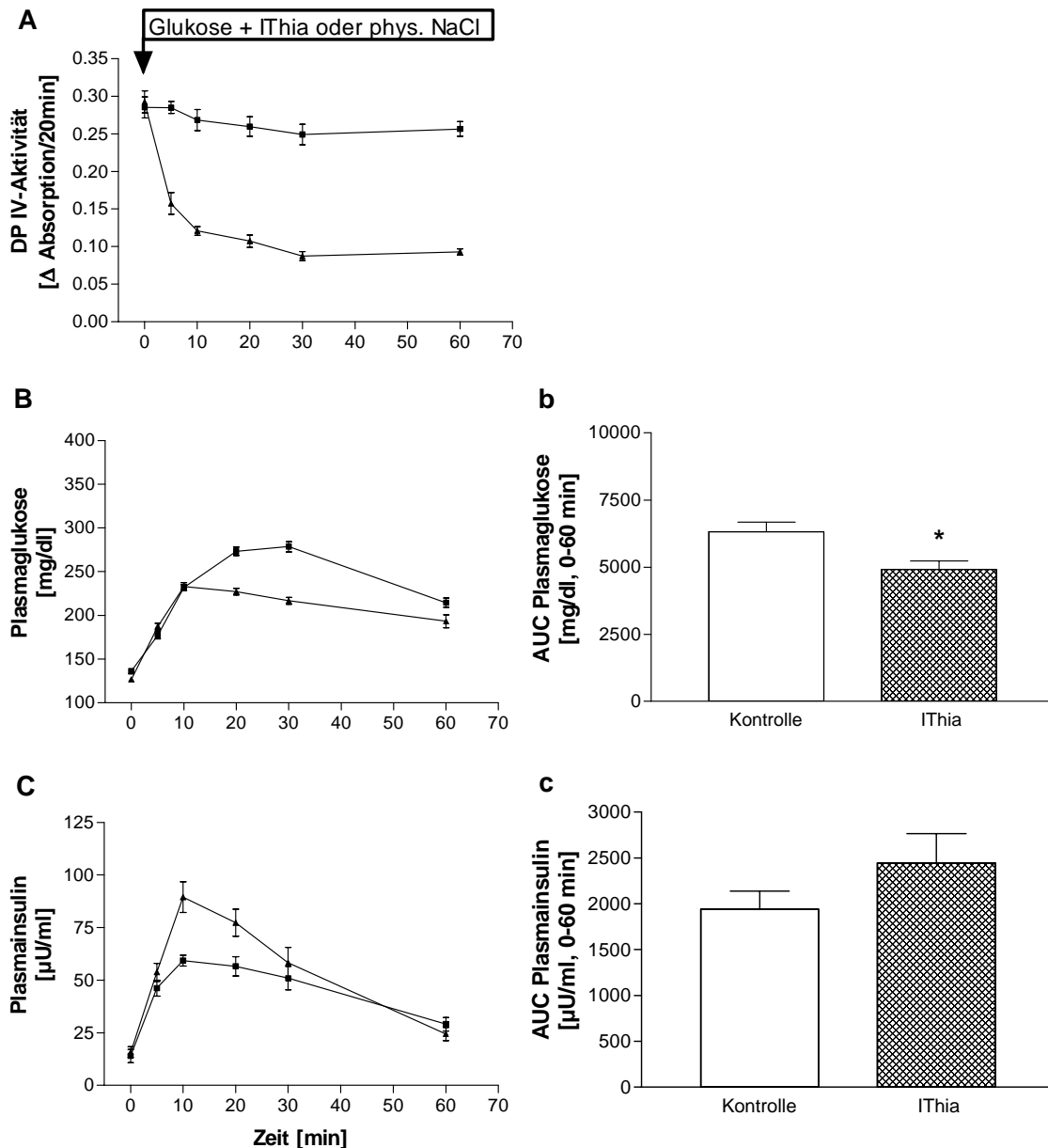


Abbildung 27 Einfluß der oralen Gabe von Ile-Thia ( $\approx 20 \mu\text{mol} / 300 \text{ g KG}$ , , Kontrolle) auf den Verlauf der Plasma-DP IV-Aktivität (A), Plasmaglukose- (B) und Plasmainsulinkonzentration (C), G-AUC<sub>0-60min</sub> (b) und I-AUC<sub>0-60min</sub> (c) nach OGTT (1 mg / 1 kg KG) bei schlanken Zucker-Ratten (Typ Fa/?, n = 6 für jede Gruppe), P < 0,05 für Signifikanz (\*)

### 3.4.7 Orale Gabe von Ile-Thia an adipöse Zucker-Ratten - Einfluß auf die Glukosetoleranz

Die fa/fa-Typ Zucker-Ratten sind mit einer Plasmaglukosekonzentration im Nüchternzustand von 171 mg/dl (entspricht 9,5 mM gegenüber 7,2 mM bei schlanken Zucker-Ratten und 7 mM bei Wistar-Ratten) hyperglykämisch und mit einer initialen Plasmainsulinkonzentration von 73,4  $\mu$ U/ml (im Vergleich zu 14,9  $\mu$ U/ml bei schlanken Zucker-Ratten und 16,2  $\mu$ U/ml bei Wistar-Ratten) hyperinsulinämisch. Ein OGTT von 1 g Glukose pro kg Körpergewicht führte zu einem I-AUC<sub>0-60 min</sub> von 724  $\mu$ U/ml in den ersten 60 min und liegt damit um mehr als



50 % unter dem Insulinwert in normoglykämischen Zucker- und Wistar-Ratten (*Abbildung 28*). Durch Gabe des kompetitiven DP IV-Inhibitors Ile-Thia gleichzeitig mit dem OGTT wird diese Insulinantwort auf 234 % erhöht und befindet sich mit 1695  $\mu\text{U/ml}$  im Bereich der Werte nach OGTT bei normoglykämischen Kontrolltieren (siehe **Tabelle 13**). Der Unterschied in der integrierten Insulinfläche zwischen inhibitorbehandelten und nichtbehandelten Tieren ist allerdings wie bei den schlanken Zucker-Ratten aufgrund der hohen individuellen Streuung nicht signifikant. Die Plasmaglukosekonzentration erreicht unter DP IV-Inhibierung ihren Maximalwert bei 20 min mit 292,2 mg/dl (gegenüber 346 mg/dl bei 30 min ohne Ile-Thia) und fällt anschließend wesentlich schneller ab als in der Kontrollgruppe (bei 60 min 225,2 mg/dl gegenüber 341,1 mg/dl ohne Ile-Thia). Über die Einstellung der neuen basalen Plasmaglukosekonzentrationen nach OGTT, das heißt das eventuelle Erreichen eines normoglykämischen Zustandes nach Ile-Thia-Behandlung, läßt sich bei der gewählten Versuchsdurchführung keine Aussage treffen. Es konnten von den Tieren keine weiteren Blutproben gewonnen und dabei der Blutverlust in physiologisch vertretbarer Größe gehalten werden. Insgesamt führte die verstärkte Insulinausschüttung zu einer Abnahme der integrierten Glukosewerte um 39 % bei der inhibitorbehandelten im Vergleich zur Kontrollgruppe (5319 mg/dl gegenüber 8730 mg/dl). Ursache für den im Vergleich zu den Fa/?-Zucker-Ratten in fa/fa-Zucker-Ratten gefundenen dramatischeren Effekt von Ile-Thia auf die integrierten Insulin- und Glukosewerte könnte zum einen die erniedrigte Glukosekonzentrationsschwelle für die insulinotrope Wirkung der Inkretine in fa/fa-Zucker-Ratten (Chan, Pederson et al. 1985) sein. Zum anderen ist es möglich, daß der glukagonostatische Effekt des GLP-1 in fa/fa-Ratten aufgrund ihres erhöhten Glukagonspiegels stärker zum Tragen kommt.

Zusammenfassend kann geschlußfolgert werden, daß die orale Verabreichung des DP IV-Inhibitors Ile-Thia einen positiven Einfluß auf die orale Glukosetoleranz von fa/fa-Zucker-Ratten, einem Tiermodell für Diabetes Typ 2 des Menschen, hat.

Auf den direkten Nachweis der Verlängerung der Halbwertszeit der Inkretine GIP und GLP-1 nach Inhibierung der DP IV im Blut mußte aufgrund des Fehlens eines N-terminal gerichteten Antikörpers für beide Hormone verzichtet werden. Deacon und Hughes (1998) konnten in Experimenten am Schwein mittels eines N-terminal gerichteten GLP-1-Antikörpers zeigen, daß der DP IV-Inhibitor Val-Pyrr endogenes und exogenes GLP-1 vor dem N-terminalem Abbau schützt und dessen insulinotropen und glukagonostatischen Effekt potenziert.

In einer 1997 von Balkan veröffentlichten Arbeit wird beschrieben, daß die Gabe eines DP IV-Inhibitors 30 min vor OGTT bei adipösen Zucker-Ratten die Insulinantwort vervielfacht und die Glukosetoleranz verbessert. Dagegen konnten sie keinen Einfluß auf die Insulinausschüt-

tung bei schlanken Zucker-Ratten finden, obwohl sich deren integrierter Glukosewert in den ersten 30 min nach OGTT auf 79 % verringerte.

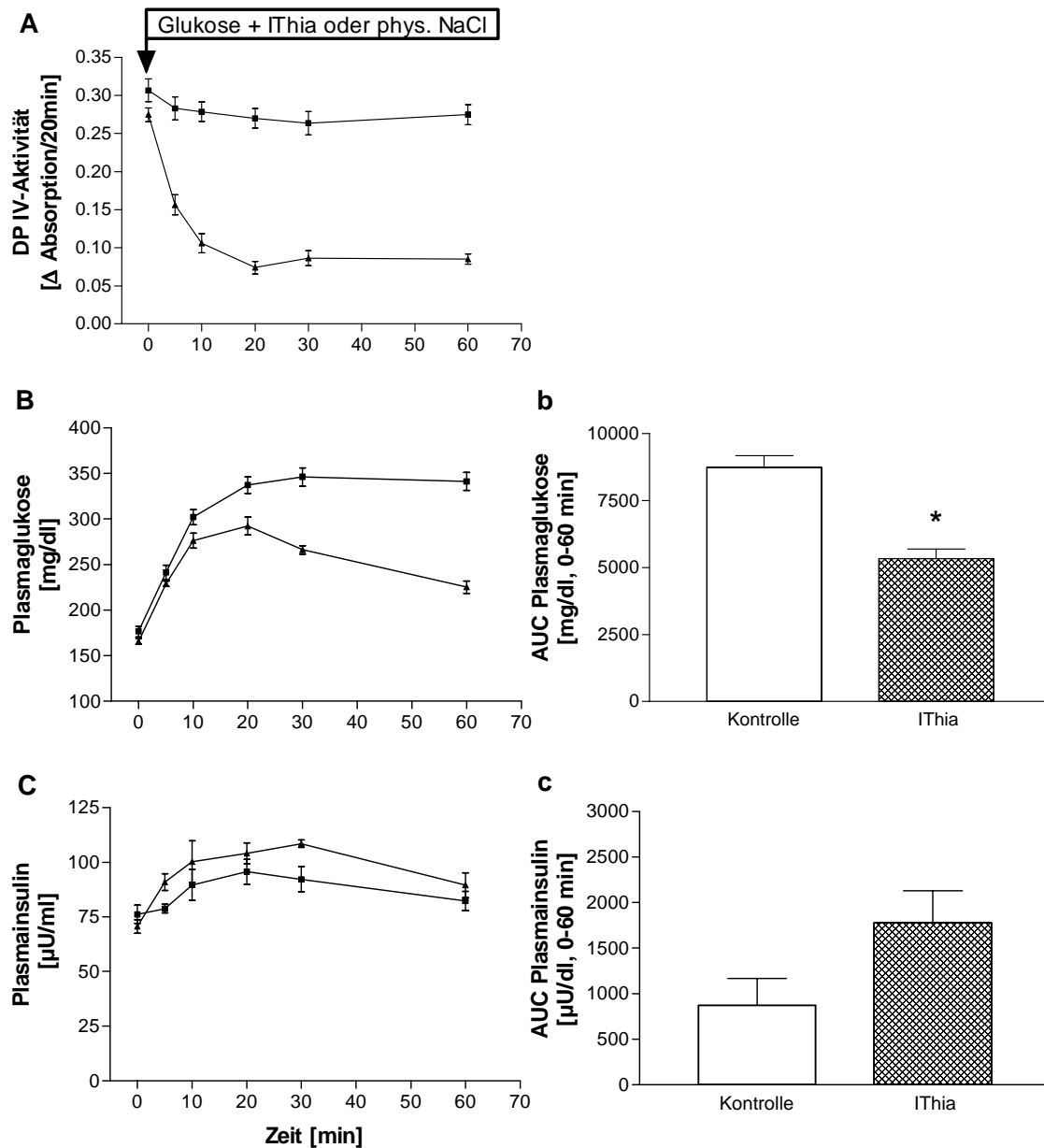


Abbildung 28 Einfluß der oralen Gabe von Ile-Thia ( $\approx 20 \mu\text{mol} / 300 \text{ g KG}$ , , Kontrolle) auf den Verlauf der Plasma-DP IV-Aktivität (A), Plasmaglukose- (B) und Plasmainsulin-konzentration (C), G-AUC<sub>0-60min</sub> (b) und I-AUC<sub>0-60min</sub> (c) nach OGTT (1 mg / 1 kg KG) bei adipösen Zucker-Ratten (Typ *fa/fa*,  $n = 6$  für jede Gruppe),  $P < 0,05$  für Signifikanz (\*)

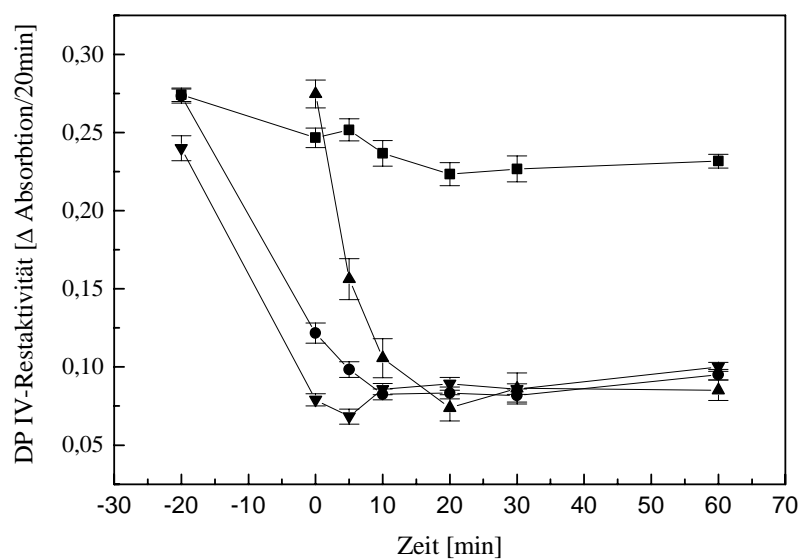
**Tabelle 13** Zusammenfassende Darstellung der integrierten Plasmainsulin- und -glukosewerte der ersten 60 min nach OGTT (1 g/kg KG) bei gleichzeitiger oraler Gabe von Ile-Thia (20  $\mu$ mol/300g) bzw. Kontrolle in den untersuchten Tiermodellen; (Die Angaben in Klammern geben den Wert in % relativ zur Kontrollgruppe an.)

Parameter	Rattenmodell	Ile-Thia	Kontrollgruppe
Plasmaglukosekonzentration (mg/dl)	Wistar	3476 (82 %)	4249
	Zucker (Fa/?)	4913 (78%)	6313
	Zucker (fa/fa)	5319 (61%)	8730
Plasmainsulinkonzentration ( $\mu$ U/ml)	Wistar	1317 (91%)	1449
	Zucker (Fa/?)	2337 (123%)	1892
	Zucker (fa/fa)	1695 (234%)	724

### 3.4.8 Orale Gabe der *prodrugs* PITHia und GPITH an Zucker-Ratten - Einfluß auf die Glukosetoleranz

Von den in Kapitel 3.1.3 vorgestellten *prodrugs* wurden 2 auf ihre Bioverfügbarkeit im Tiermodell und ihren Einfluß auf die Glukosetoleranz nach einem OGTT untersucht. Neben dem GPITHia, das durch die DP IV selbst in den aktiven DP IV-Inhibitor Ile-Thia umgewandelt wird, wurde das PITHia, welches wahrscheinlich durch die LAP aktiviert wird, ausgewählt.

#### 3.4.8.1 Orale Bioverfügbarkeit von Ile-Thia aus GPITHia und PITHia in Zucker-Ratten



**Abbildung 29** Einfluß der oralen Gabe von GPITHia (▲) und PITHia (●), verglichen mit Ile-Thia (■) und Kontrolle (▼), (jeweils 20  $\mu$ mol / 300 g KG), auf die Restaktivität der DP IV im Plasma von fa/fa-Zucker-Ratten

Da davon auszugehen war, daß die Freisetzung des wirksamen DP IV-Inhibitor Ile-Thia aus den *prodrugs* deren Einfluß auf die orale Glukosetoleranz limitiert, wurden diese Verbindungen 20 min vor dem OGTT appliziert. Aus *Abbildung 29* geht hervor, daß nach oraler Gabe von GPITHia und PITHia die DP IV-Aktivität im Plasma ähnlich wie nach Gabe von Ile-Thia gehemmt wird. Die Abnahme der DP IV-Restaktivität verläuft etwas langsamer, um nach 25 min ihr Maximum zu erreichen. Der DP IV-Inhibitor Ile-Thia ist also nach oraler Applikation der beiden *prodrugs* im Blut verfügbar. Von beiden Verbindungen konnte gezeigt werden, daß sie *in vitro* keine Substrate des intestinalen Peptidtransporters sind. Wahrscheinlich werden die *prodrugs* im Darm von der DP IV bzw. der LAP metabolisiert und passieren die Darmmukosa bereits als freigesetztes Ile-Thia.

#### **3.4.8.2 Einfluß der *prodrugs* auf die Glukosetoleranz nach OGTT in Zucker-Ratten**

Der Einfluß der oralen Gabe der *prodrugs* auf die Glukosetoleranz nach OGTT in schlanken und adipösen Zucker-Ratten ist im wesentlichen mit dem Einfluß von Ile-Thia vergleichbar (*Abbildung 30* und *31*, **Tabelle 14**). Die  $G\text{-AUC}_{0-60\text{min}}$ -Werte sind bei den Fa/?-Tieren nach *prodrug*-Gabe etwas kleiner als nach der Gabe von Ile-Thia. Bei den fa/fa-Tieren ist dies nicht zu beobachten. Die  $I\text{-AUC}_{0-60\text{min}}$  variieren bei beiden Tiergruppen relativ stark, was auf die starke Streuung der Insulinwerte zurückzuführen ist. Offensichtlich spielen individuelle physiologische Unterschiede zwischen den Tieren beim Vergleich des Parameters Insulin eine größere Rolle als bei der Betrachtung der Glukosedaten. Zusammenfassend läßt sich anhand der in **Tabelle 14** dargestellten Ergebnisse sagen, daß die orale Gabe der *prodrugs* vor einem OGTT einen leichten stimulierenden Effekt auf die Insulinsekretion bei schlanken und einen starken stimulierenden Effekt auf die Insulinsekretion bei adipösen Zucker-Ratten hat. Bei beiden Tiergruppen wird die Glukosetoleranz nach OGTT durch die Gabe von GPITHia und PITHia deutlich verbessert. Diese beiden *prodrug*-Formen sind wie Ile-Thia als potentielle Therapeutika zur Behandlung von Diabetes Typ 2 des Menschen anzusehen. Eine N-terminale Maskierung von kurzlebigen DP IV-Inhibitoren durch Gly-Pro- oder Pro-Sequenzen ist geeignet, solche Verbindungen zu stabilisieren, damit sie ihre Instabilität erst nach der oralen Applikation entfalten.

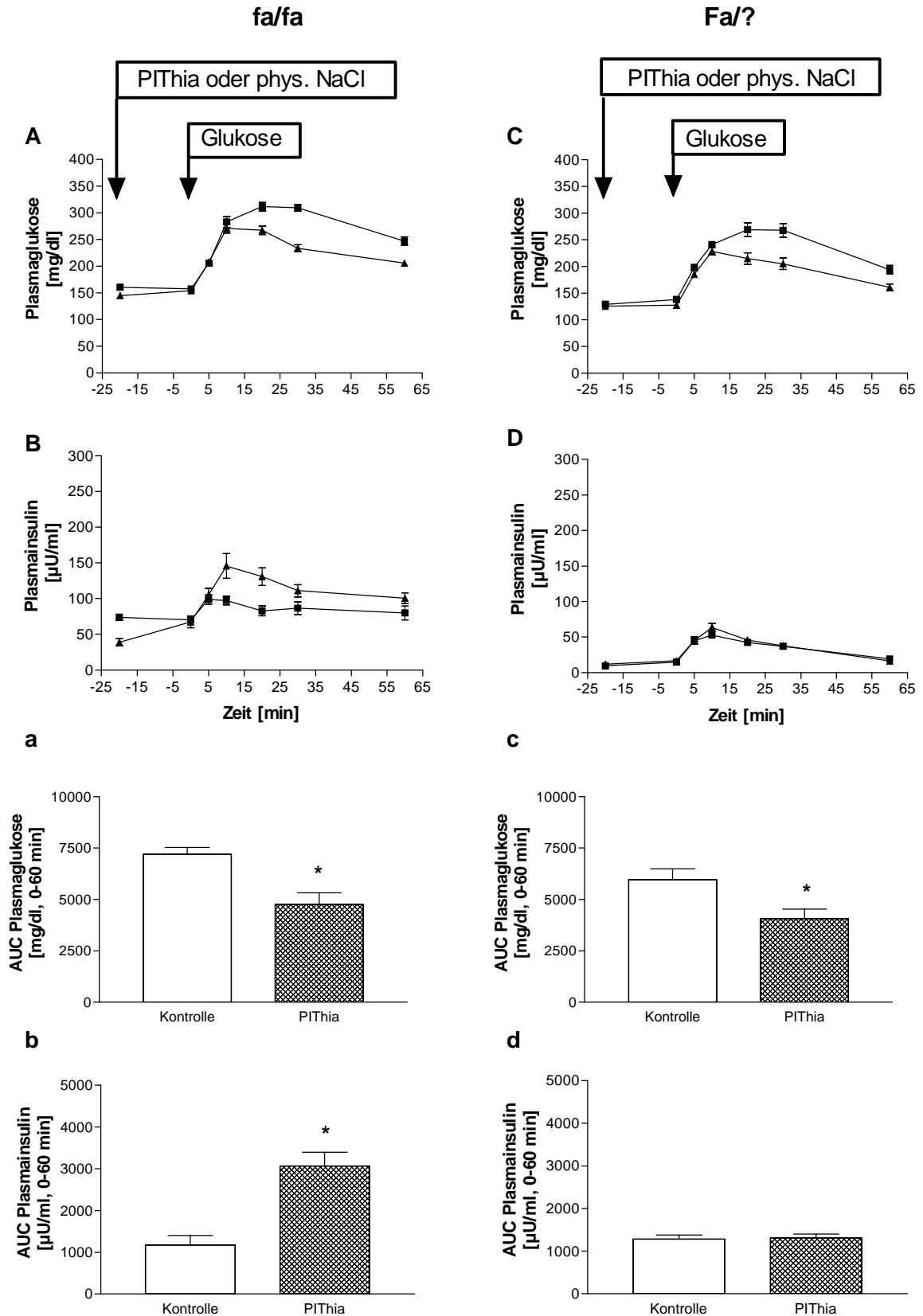


Abbildung 30 Einfluß der oralen Gabe von PITHia ( $\approx 20 \mu\text{mol} / 300 \text{g KG}$ , , Kontrolle) auf den Verlauf der Plasmaglukose- (A, C) und Plasmainulinkonzentration (B, D), G-AUC<sub>0-60min</sub> (a, c) und I-AUC<sub>0-60min</sub> (b, d) nach OGTT (1mg/1kg KG) bei adipösen (fa/fa-Typ, A, B, a, b, n = 6 für jede Gruppe) und schlanken Zucker-Ratten (Fa/?-Typ, C, D, c, d, n = 6 für jede Gruppe), (\*) P < 0,05 für Signifikanz

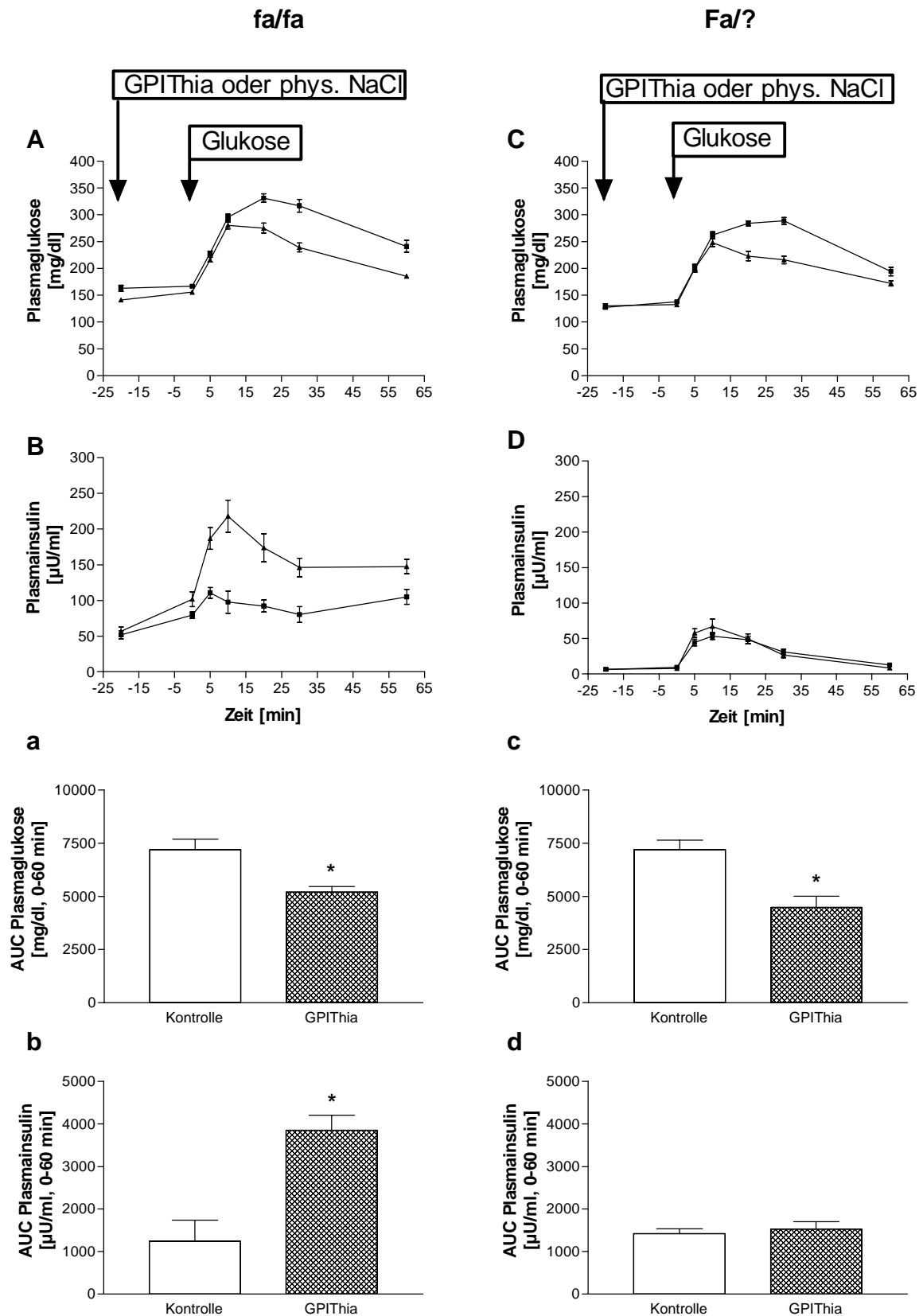


Abbildung 31 Einfluß der oralen Gabe von GPIThIA ( $\approx 20 \mu\text{mol} / 300 \text{ g KG}$ , , Kontrolle) auf den Verlauf der Plasmaglukose- (A, C) und Plasmainsulinkonzentration (B, D),  $G\text{-AUC}_{0-60\text{min}}$  (a, c) und  $G\text{-AUC}_{0-60\text{min}}$  (b, d) nach OGTT ( $1\text{mg}/1\text{kg KG}$ ) bei adipösen (fa/fa-Typ, A, B, a, b,  $n = 6$  für jede Gruppe) und schlanken Zucker-Ratten (Fa/?-Typ, C, D, c, d,  $n = 6$  für jede Gruppe), (\*)  $P < 0,05$  für Signifikanz

**Tabelle 14** Vergleich der G-AUC<sub>0-60min</sub> - und I-AUC<sub>0-60min</sub> -Werte in schlanken und adipösen Zucker-Ratten nach OGTT (1 g / kg KG) nach oraler Gabe von Ile-Thia, Pro-Ile-Thia und Gly-Pro-Ile-Thia ausgedrückt in % der jeweiligen Kontrollgruppe

	Zucker-Ratte	IThia	PIThia	GPIThia
<b>G-AUC<sub>0-60min</sub></b> (% im Vergleich zur Kontrollgruppe)	schlank	78	68	66
	adipös	61	66	66
<b>I-AUC<sub>0-60min</sub></b> (% im Vergleich zur Kontrollgruppe)	schlank	123	102	133
	adipös	234	309	368

### 3.5 Inhibierung der Dipeptidylpeptidase I mit einer Verbindung aus der Klasse der O-Acyl, N-Peptidyl-Hydroxylamine

Die Dipeptidylpeptidase I (EC 3.4.14.1, DP I, Cathepsin C) wurde erstmals von Gutman & Fruton 1948 aus Schweineniere beschrieben. Sie spaltet mit relativ breiter chymotrypsinähnlicher Substratspezifität sequentiell Dipeptide von unsubstituierten N-Termini von Peptidsubstraten ab (McDonald, Callahan et al., 1971; McDonald & Schwabe, 1977). Die gebräuchlichsten Testsubstrate sind Gly-Phe- und Gly-Arg-Derivate (Kirschke, Barrett et al., 1995). Die DP I ist eine lysosomale Cysteinprotease, die durch Abspaltung N-terminaler Dipeptide aktive Enzyme aus Proenzymen wie Granzym B, Leukozyten Elastase, Cathepsin B und Neuraminidase in den lysosomalen Granula cytotoxischer T-Lymphozyten freisetzen kann (Kummer, Kamp et al., 1996; Thiele & Lipsky, 1990). Daher wird vermutet, daß die DP I in pathologische Mechanismen wie apoptotische Prozesse, Muskeldystrophie und Krebsentstehung involviert ist (Aoyagi, Wada et al., 1983; Gelman, Papa et al., 1980; Schlagenhauff, Klessen et al., 1992; Shi, Kam et al., 1992). Die DP I galt lange als Konvertase des Hormons Glukagon in der Leber (Kakiuchi & Tomizawa, 1964; McDonald, Callahan et al., 1971). Die Halbwertszeit von zirkulierendem Glukagon wird mit 5-6 min angegeben (Jaspan, Polonsky et al., 1981; Alford, Bloom et al., 1976). Nach Holst (1991) ist der Beitrag der hepatischen Extraktion des Glukagons in Hund und Mensch eher gering. Auch die Passage von Glukagon durch perfundierte Rattenleber führte zu keinen Spaltprodukten des Hormons (Hildebrandt, Blech et al., 1991). Allgemein anerkannt ist, daß die Niere eine bedeutende Rolle bei Metabolismus und Abbau des Glukagons *in vivo* spielt (Holst, 1991).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß das Glukagon mit seiner N-terminalen Sequenz His-Ser- ein natürliches Substrat der DP IV darstellt (Hinke, Pospisilik et al., 2000). Da das Glukagon über seine die Blutzuckerkonzentration steigernde Wirkung in die Erhaltung der Glukosehomöostase involviert ist, stellte sich die Frage, ob Inhibitoren der DP IV nicht nur die Bioaktivität der Inkretine GIP und GLP-1, sondern auch des Glukagons im Serum beeinflussen. Deshalb sollte ein potenter und irreversibler Inhibitor der DP I entwickelt werden, mit dessen Hilfe eine Beteiligung der DP I an der Konvertierung des Glukagons im Serum ausgeschlossen werden kann.

Die DP I wird durch reversible und irreversible Cysteinproteaseinhibitoren wie Leupeptin und E-64 schwach inhibiert (Nikawa, Towatari et al., 1992). Stärkere reversible Inhibitoren sind Stefin A und Eiweiß-Cystatin (Nikawa, Towatari et al., 1992; Nicklin & Barrett, 1984). Eine spezifische Inhibierung konnte u. a. mit Diazomethylketonen und Sulphonylmethylketonen erreicht werden (Angliker, Wikstrom et al., 1989; Green & Shaw, 1981). In den letzten Jahren wurden weitere neuartige reversible und irreversible DP I-Inhibitoren entwickelt (Palmer, Rasnick et al., 1998; Thiele, Lipsky et al., 1997). Bei den bisher bekannten irreversiblen Inhibitoren der DP I handelt es sich um Affinitätsmarker, die *in vivo* aufgrund ihrer chemisch reaktiven Gruppen vor ihrer Interaktion mit dem Zielprotein mit anderen Nukleophilen oder Elektrophilen reagieren können. Demgegenüber zeichnen sich mechanismusorientierte Inhibitoren dadurch aus, daß sie nur durch das Zielenzym katalytisch angegriffen und dadurch aktiviert werden können. Solche Inhibitoren werden auch als Selbstmordinaktivatoren bezeichnet und wurden für die Cysteinproteasen mit der Klasse der O-Acyl, N-Peptidyl-Hydroxylamine entwickelt (Brömme, Schierhorn et al., 1998; Brömme, Neumann et al., 1993). Allerdings wurden bisher für die DP I keine Inhibitoren aus dieser Verbindungsklasse abgeleitet. Durch Aufbau eines N,O-Diacylhydroxylamins mit DP I-spezifischer Peptiderkennungssequenz sollte die Klasse dieser Inhibitoren auch für die Dipeptidylpeptidase I erschlossen werden.

In diesem Kapitel wird die kinetische Charakterisierung des neu synthetisierten DP I-Inhibitors Gly-Phe-NHO-Bz (Synthesebeschreibung siehe Abschnitt 2.6) vorgestellt.

### **3.5.1 Bestimmung der 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung der DP I durch GF-NHO-Bz**

Die Geschwindigkeitskonstante der kovalenten Modifikationsreaktion eines Enzyms durch einen irreversiblen Inhibitor wird als  $k_{\text{inact}}$  bezeichnet. Zum Vergleich der Effektivität irreversibler Inhibitoren vom Typ der N,O-Diacylhydroxylamine dient die Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstante 2.Ordnung der Inhibierung, der Quotient aus  $k_{\text{inact}}$  und  $K_i$ .



Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine von Tian & Tsou (1982) beschriebene Methode zur Bestimmung der 2.Ordnungsgeschwindigkeitskonstante der Inaktivierung angewandt. Dabei werden mindestens 2 verschiedene Substratkonzentrationen mit mindestens 4 verschiedenen InhibitorKonzentrationen kombiniert und nach Enzymzusatz die Geschwindigkeit der Abnahme der Substratspaltung verfolgt. Die Geschwindigkeitskonstante dieser Abnahme der Substratspaltung entspricht der scheinbaren, durch die Anwesenheit des Substrats beeinflussten Geschwindigkeit der Inaktivierung des Enzyms ( $k_{obs}$ ). Durch Auftragung von  $1/k_{obs}$  gegen die Substratkonzentration kann für jede eingesetzte InhibitorKonzentration der tatsächliche Wert der Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung bei  $[S] = 0$  ermittelt werden. Aus der Auftragung dieser rechnerisch oder graphisch ermittelten Geschwindigkeitskonstanten gegen die jeweilige InhibitorKonzentration ergibt sich ein hyperboler Kurvenverlauf, aus dem nach Gleichung 6  $K_i$  und  $k_{inact}$  ermittelt werden können.

$$k = \frac{k_{inact} \cdot I}{K_i + I} \quad \text{Gleichung 6}$$

Für den Fall der Inaktivierung der DP I aus Rind und Mensch durch GF-NHO-Bz in Gegenwart von GRpNA als Substrat ergab die Auftragung der ermittelten  $k$  gegen die InhibitorKonzentration keine hyperbole Kurve (*Abbildung 32*). Das heißt, daß bei den verwendeten InhibitorKonzentrationen die Geschwindigkeit der Inaktivierung der DP I durch GF-NHO-Bz sich noch im initial linearen Bereich befindet ( $I \ll K_i$ ). Aufgrund der hohen Geschwindigkeit der Inaktivierungsreaktion ist es nicht möglich, mit höheren Konzentrationen des Inhibitors im Sättigungsbereich zu messen. Für diesen Fall vereinfacht sich Gleichung 6 zu

$$k_{app} = \frac{k_{inact} \cdot I}{K_i} \quad \text{Gleichung 7}$$

Aus dieser Gleichung läßt sich rechnerisch oder graphisch direkt die 2.Ordnungsgeschwindigkeitskonstante der Inaktivierung der DP I mit GF-NHO-Bz bestimmen.

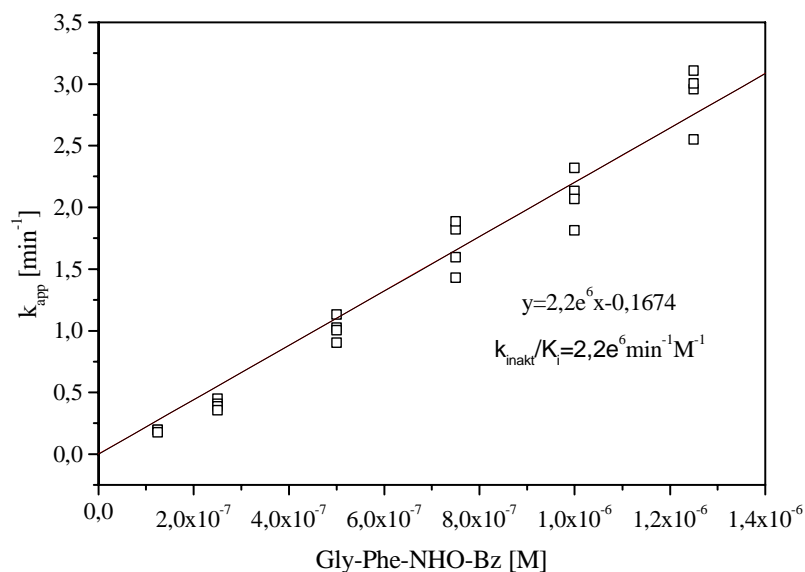


Abbildung 32 Inaktivierung der DP I<sub>Rind</sub> mit Gly-Phe-NHO-Bz bei 37°C und pH 5,6 in 40 mM MES-Puffer (4 mM DTE, 2 mM EDTA, 4 mM KCl), Enzymkonzentration = 2,9 nM, Substrat Gly-Arg-pNA (0,94 und 0,47 mM)

Tabelle 15 2.Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung der Dipeptidylpeptidase I mit GF-NHO-Bz

Enzym	$k_{inact}/K_i$ [s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]
DP I <sub>Rind</sub>	36729 ± 845
DP I <sub>hum</sub>	34979 ± 1014

Tabelle 16 kinetische Parameter der Hydrolyse von GRpNA durch die Dipeptidylpeptidase I

Enzym	$K_m$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_m$ [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
DP I <sub>Rind</sub>	1,29 ± 0,11	107,7 ± 4,8	83,5
DP I <sub>hum</sub>	1,50 ± 0,20	105,5 ± 7,7	70,3

### 3.5.2 Nachweis der Irreversibilität der Inaktivierung der DP I durch GF-NHO-Bz

Die Irreversibilität der Inaktivierung der DP I durch GF-NHO-Bz wurde mittels eines Verdünnungstests nachgewiesen. Dazu wurde ein Reaktionsansatz mit definierter Substrat-, Inhibitor- und Enzymkonzentration nach Abschluß der Inaktivierungsreaktion durch nochmalige Zugabe von Substrat und Puffer so verdünnt, daß sich Enzym- und Inhibitorkonzentration halbieren und Puffer- und Substratkonzentration konstant bleiben. Im Falle der Reversibilität

der Inaktivierung sollte die resultierende Restaktivität mehr als die Hälfte der vor der Verdünnung bestehenden Aktivität betragen. Im Falle der mit GF-NHO-Bz inaktivierten DP I konnte bei diesem Reversibilitätstest keine Reaktivierung des Enzyms festgestellt werden.

### 3.5.3 Bestimmung der Partitionierungskonstanten von GF-NHO-Bz für die DP I

Die mechanismusorientierten Inhibitoren vom Typ der O-Acyl, N-Peptidyl-Hydroxylamine werden von Cystein- und Serinproteasen als Substrate hydrolysiert. Das Verhältnis von Substrathydrolyse zu Inaktivierung wird mit der Partitionierungskonstanten  $r = k_{\text{cat}}/k_{\text{inact}}$  (auch *turn over-Zahl*) beschrieben. Im theoretisch günstigsten Fall, wenn jedes Inhibitormolekül zur Modifizierung eines Enzymmoleküls führt, wäre die Partitionierungskonstante des Inhibitors kleiner als 1. Die Partitionierungskonstante eines mechanismusorientierten Inhibitors gestattet also eine Aussage über dessen Wirksamkeit.

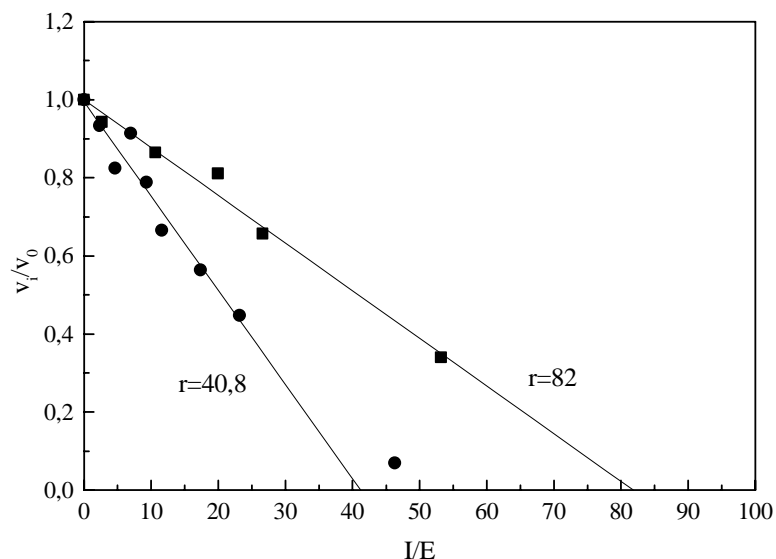


Abbildung 33 Bestimmung der Partitionierungskonstante  $r$  von GF-NHO-Bz für die Inaktivierung der DP I aus Rinderpankreas (●) und humaner Niere (■)

Um die *turn-over-Zahl* des GF-NHO-Bz für die DP I zu bestimmen, wurde das Enzym mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen inkubiert und nach Reaktionsende die DP I-Restaktivität ermittelt. Das Verhältnis von  $v_i$  zu  $v_0$  als Funktion des Verhältnisses Inhibitor- zu Enzymkonzentration lieferte die Partitionierungskonstante  $r$ . Die genaue Konzentration an aktivem Enzym wurde vorher durch Titration der DP I<sub>Rind</sub> und DP I<sub>hum</sub> mit Cystatin C bestimmt.

Die Partitionierungskonstante von GF-NHO-Bz für die DP I aus Rinderpankreas beträgt 40,8 und für die DP I aus humaner Niere 82. Damit ist  $r$  von GF-NHO-Bz für die DP I<sub>hum</sub> doppelt so groß wie für die DP I<sub>Rind</sub>.

### 3.5.4 Bestimmung der 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung der DP I durch verschiedene N-terminal geschützte und ungeschützte O-Acyl, N-Peptidyl-Hydroxamsäuren

Für eine Reihe von verschiedenen Inhibitoren aus der Klasse der N,O-Diacylhydroxamsäuren wurden nach einem vereinfachten Verfahren die 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung der DP I ermittelt. Aus der Umstellung der Gleichung 6 ergibt sich die Beziehung

$$\frac{k_{inact}}{K_i} = \frac{k}{I}, \quad \text{Gleichung 8}$$

das heißt, bei Messungen mit Inhibitorkonzentrationen unterhalb des  $K_i$ -Wertes kann die 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstante der Inaktivierung direkt aus Inhibitorkonzentration und der ermittelten entsprechenden Geschwindigkeitskonstante berechnet werden.

Erwartungsgemäß sind alle N-terminal geschützten Verbindungen mit Ausnahme des Z-FG-NHO-Bz-CH<sub>3</sub> keine Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase I. Das N-terminal freie IP-NHO-NB entspricht nicht der Substratspezifität der DP I und zeigt deshalb ebenfalls eine um mehr als eine Größenordnung niedrigere 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstante im Vergleich zum GF-NHO-Bz.

**Tabelle 17** 2. Ordnungs-Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{inact}/K_i$ ) in [ $s^{-1}M^{-1}$ ] der Inaktivierung der DP I durch verschiedene O-Acyl, N-Peptidyl-Hydroxamsäuren, Angabe in Klammern: gemessene Konzentration des Inhibitors

Verbindung	DP I <sub>hum</sub>	DP I <sub>Rind</sub>
H-IP-NHO-NB	208 ( $2e^{-5}$ )	149 ( $2e^{-5}$ )
H-YG-NHO-Bz	3619 ( $1e^{-6}$ )	3948 ( $1e^{-6}$ )
Z-FG-NHO-Bz-CH <sub>3</sub>	152 ( $2e^{-5}$ )	116 ( $2e^{-5}$ )
Z-GF-NHO-Bz-CH <sub>3</sub>	keine Inhibierung ( $2e^{-5}$ )	keine Inhibierung ( $2e^{-5}$ )
Boc-AAA-NHO-Bz	keine Inhibierung ( $1e^{-4}$ )	keine Inhibierung ( $1e^{-4}$ )
Boc-AA-NHO-Bz	keine Inhibierung ( $1e^{-4}$ )	keine Inhibierung ( $1e^{-4}$ )
Boc-APF-NHO-Bz	keine Inhibierung ( $1e^{-4}$ )	keine Inhibierung ( $1e^{-4}$ )

### 3.5.5 Selektivität von GF-NHO-Bz

Um die Selektivität des synthetisierten Inhibitors GF-NHO-Bz gegenüber anderen Cathepsinen bewerten zu können, wurde nach unter 3.5.4 beschriebener Methode die 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstante der Inaktivierung durch GF-NHO-Bz für die Cathepsine B (EC 3.4.22.1) und L (EC 3.4.22.15) bestimmt.

Die Cathepsine B und L gehören wie das Cathepsin C zur Klasse der papainähnlichen lysosomalen Cysteinproteasen. Cathepsin B zeigt sowohl Endopeptidase- als auch Exopeptidaseaktivität. Letztere wird als Dipeptidylpeptidasefunktion beschrieben (Aronson & Barrett, 1978). Die Substratspezifität ist relativ breit, wobei große hydrophobe Aminosäuren an P<sub>2</sub>-Position und positiv geladene und offenkettige aliphatische Aminosäuren an P<sub>1</sub>-Position bevorzugt werden (Hasnain, Hiram et al., 1993; Shaw, 1990; Krantz, Copp et al., 1991; Pliura, Bonaventura et al., 1992). Cathepsin L ist eine Endopeptidase, die bevorzugt Peptidbindungen mit hydrophoben Aminosäuren in P<sub>2</sub> und P<sub>3</sub>-Position spaltet (Kärgel, Dettmer et al., 1980, 1981).

**Tabelle 18** 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung der Cathepsine B, C und L durch GF-NHO-Bz

Enzym	Cathepsin C (hum. Niere)	Cathepsin B (hum. Leber)	Cathepsin L (hum. Leber)
$K_{inact}/K_i [s^{-1}M^{-1}]$	34979	87	37

Die 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung von Cathepsin C durch GF-NHO-Bz ist mehr als 2 Größenordnungen höher als die für Cathepsin B und L. Damit kann das GF-NHO-Bz hinsichtlich der getesteten Enzyme als spezifischer Inhibitor der DP I bezeichnet werden.

Unter Anwendung des entwickelten spezifischen DP I-Inhibitors Gly-Phe-NHO-Bz und des DP IV-Inhibitors Ile-Thia konnte inzwischen in der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, daß die DP IV und nicht die DP I die Bioaktivität des Glukagons im Serum limitiert (Pospisilik, Hinke et. al., 2001).

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Verbindungen synthetisiert und hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung gegenüber der Dipeptidylpeptidase IV, der Prolyl oligopeptidase oder der Dipeptidylpeptidase I untersucht.

1. Die DP IV ist ein ubiquitäres und multifunktionelles Enzym. Im Blut ist sie für die Inaktivierung der glukoseabhängigen insulinotropen Hormone GLP-1 und GIP verantwortlich. Um die Halbwertszeit der Inkretine *in vivo* zu verlängern, sollte es ausreichen, die katalytische Aktivität der DP IV nur im unmittelbaren Zeitraum nach der Nahrungsaufnahme zu blockieren. Deshalb sollten kompetitive Inhibitoren des Enzyms mit kurzer Halbwertszeit unter physiologischen Bedingungen entwickelt werden. Dazu wurden verschiedene Aminosäurethiazolidide und Aminosäurepyrrolidinomethylketone nach in der Peptidchemie allgemein üblichen Methoden synthetisiert und kinetisch charakterisiert. Aus der Klasse der Aminosäurethiazolidide konnte für Pro-Thia, Asn-Thia und Glu-Thia im Gegensatz zum Ile-Thia und His-Thia gezeigt werden, daß die Verbindungen in Abhängigkeit vom pH-Wert einem nichtenzymatischen Zerfall unterliegen. Die Halbwertszeiten bei pH 8 betragen mehrere Tage. Für Pro-CH<sub>2</sub>-Pyrr aus der Klasse der Aminosäurepyrrolidinomethylketone wurde bei pH 7,6 eine Halbwertszeit von 27,6 min ermittelt. Die Vertreter dieser Verbindungsklasse sind schlechte kompetitive Inhibitoren der DP IV.

Für Asn-Thia, Glu-Thia, His-Thia und Ile-Thia wurde gezeigt, daß diese Verbindungen Substrate des Peptidtransporters PepT1 sind.

2. Um instabile potentielle Inhibitoren der DP IV hinsichtlich einer pharmazeutischen Anwendung besser handhaben zu können, sollte nach einer Möglichkeit gesucht werden, solche Verbindungen präapplikativ zu stabilisieren. Deshalb wurden *prodrug*-Formen des Ile-Thia und His-Thia synthetisiert, aus denen der DP IV-Inhibitor erst nach Abspaltung einer Aminosäure oder eines Dipeptides durch Peptidasen freigesetzt wird. Die Tri- und Tetrapeptidanaloga wurden durch schrittweise N-terminale Verlängerung des Ile-Thia bzw. His-Thia erhalten. Aus Gly-Pro-, Ile-Pro- und Pro-Pro-Ile-Thia wird Ile-Thia durch die DP IV selbst freigesetzt. Für Pro-Ile-Thia kommt die LAP als freisetzendes Enzym in Frage. Beide Enzyme sind in der Darmmukosa des Dünndarms lokalisiert, so daß die Inhibitorfreisetzung nach oraler Applikation der *prodrugs* im Dünndarm erfolgen kann. A-

ber auch in Serum wird Ile-Thia rasch aus den 4 *prodrug*-Formen freigesetzt. Nur für Ile-Pro-Ile-Thia konnte gezeigt werden, daß es ein Substrat des Peptidtransporters PepT1 ist. Die *prodrugs* Pyr-Ile-Thia und Pyr-His-Thia sind Substrate der u.a. im Blut lokalisierten PAP. Aus ihnen wird der DP IV-Inhibitor in Heparin-Blut sehr langsam freigesetzt. Sie könnten die Wirkung eines oral verabreichten potentiellen DP IV-Inhibitors auf die Serum-DP IV beschränken. Beide Verbindungen sind keine Substrate des Peptidtransporters PepT1. Um Aussagen darüber zu treffen, ob die orale Applikation von Pyr-Ile-Thia und Pyr-His-Thia zu pharmakologisch wirksamen Konzentrationen im Blut führt, sind entsprechende *in vivo*-Versuche am Tiermodell notwendig.

3. Die selektive Inhibierung der intestinalen DP IV könnte im Rahmen der Entwicklung von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht regulierenden Therapeutika von Interesse sein. Darum wurde Glu-Thia in der Seitenkette mit unterschiedlich großen Resten modifiziert, um Verbindungen zu erhalten, die gute potentielle Inhibitoren der DP IV sind, aber nach oraler Applikation die Darmschleimhaut nicht mehr passieren können.

Die Einführung von Polyglycinresten (1, 3 und 5) in die Seitenkette des Glu-Thia verbesserte die Affinität der DP IV zu den Inhibitoren im Vergleich zur unmodifizierten Verbindung um den Faktor 5. Ein PEG-Rest an der Aminosäure in P<sub>2</sub>-Position (durchschnittliches MG 8000) führte zu einer leichten Vergrößerung der Hemmkonstante. Für Glu(Gly<sub>5</sub>)-Thia und Glu(PEG) Thia wurde gezeigt, daß die Verbindungen keine Substrate des intestinalen Peptidtransporters PepT1 sind. Eine Untersuchung der Inhibitoren *in vivo* ist noch nicht erfolgt.

4. Alle N-terminal geschützten Synthesestufen der untersuchten DP IV-Inhibitoren und die *prodrugs* sind potentielle kompetitive Inhibitoren der POP. Die Hemmkonstanten gegenüber einer rekombinanten POP von *Flavobacterium meningosepticum* wurden bestimmt.
5. Als potentieller Inhibitor der DP I wurde Gly-Phe-NHO-Bz synthetisiert. Die 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstante der Inaktivierung des Enzyms (DP I<sub>hum</sub>) wurde mit 34979 [s<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>] und die Partitionierungskonstante 82 ermittelt. Es konnte gezeigt werden, daß die Verbindung ein irreversibler und selektiver Inhibitor des Enzyms ist. Die Verbindung ist mit einer Halbwertszeit von 18,4 h bei pH 5,6 stabil. Damit wurde die Klasse der O-Acyl, N-Peptidyl-Hydroxamsäuren als Inhibitoren für die DP I erschlossen. Unter Anwendung des entwickelten spezifischen DP I-Inhibitors Gly-Phe-NHO-Bz und des DP IV-Inhibitors Ile-Thia konnte inzwischen in der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, daß die

DP IV und nicht die DP I die Bioaktivität des Glukagons im Serum limitiert (Pospisilik, Hinke et. al., 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte an einem Tiermodell untersucht werden, ob oral verfügbare kompetitive Inhibitoren der DP IV die Glukosetoleranz der Tiere nach einem oralen Glukosetoleranztest (OGTT) positiv beeinflussen.

Mit dem kompetitiven DP IV-Inhibitor Ile-Thia und GPITHia und PITHia als Vertreter der *prodrugs* wurden Untersuchungen an der Ratte vorgenommen.

- Von diesen Verbindungen wurde gezeigt, daß sie in Ratten oral verfügbar sind. Für das Ile-Thia konnte eine lineare Abhängigkeit der Ile-Thia-Konzentration im Plasma von der oralen Dosis im untersuchten Bereich (bis 100 µmol/300 g KG) ermittelt werden.
- Die orale Gabe von Ile-Thia an gesunde Wistar-Ratten hatte keinen signifikanten Einfluß auf deren Glukosetoleranz im OGTT. Dies wurde auf eine generell sehr gute Glukosetoleranz von Jungtieren zurückgeführt.
- Die orale Gabe von Ile-Thia an Zucker-Ratten vom Fa/?-Typ verbesserte deren Glukosetoleranz nach einem OGTT. Die integrierte Glukoseantwort verringerte sich bei Inhibitorgabe um 22% im Vergleich zur Kontrolle. Die integrierte Insulinantwort erhöhte sich um 23%.
- Die orale Gabe von Ile-Thia an Zucker-Ratten vom fa/fa-Typ verbesserte deren Glukosetoleranz nach einem OGTT erheblich. Die integrierte Glukoseantwort verringerte sich bei Inhibitorgabe um 39% im Vergleich zur Kontrolle. Die integrierte Insulinantwort erhöhte sich um 134%.
- Die orale Gabe der *prodrugs* PITHia und GPITHia an Zucker-Ratten vom Fa/? und fa/fa-Typ wiesen eine dem Ile-Thia vergleichbare Wirkung auf deren Glukosetoleranz im OGTT auf. Damit sind diese *prodrugs* geeignet, potentiell instabile Verbindungen prä-applikativ zu stabilisieren.

Die Wirksamkeit des Konzepts der Beeinflussung der Glukosetoleranz durch Verlängerung der Halbwertszeit der biologisch aktiven Formen der Inkretine GIP und GLP-1 nach einmaliger oraler Gabe eines DP IV-Inhibitors wurde damit erstmals in einem Tiermodell des Diabetes Typ 2 des Menschen, den fa/fa-Zucker-Ratten, nachgewiesen. Inzwischen konnten Ahrens und Simonsson (2001) in einer vierwöchigen Studie zeigen, daß die Gabe eines DP IV-Inhibitors an Personen mit Diabetes Typ 2 zu einer Reduktion der Blutglukosekonzentration im nüchternen Zustand und nach Nahrungsaufnahme führte.



---

Ob diese Effekte nach langfristiger Gabe des Inhibitors erhalten bleiben oder ob Anzeichen von Tachyphylaxie zu beobachten sind, bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten. Des weiteren ist es Aufgabe von Langzeitversuchen zu klären, inwieweit eine langanhaltende Inhibierung der DP IV zu unerwünschten Nebenwirkungen führt. Da es nicht gelungen ist, einen kompetitiven Inhibitor der DP IV zu entwickeln, der sich durch eine geringe Stabilität *in vivo* und gute Wirksamkeit auszeichnet, bleibt auch dies eine weiterhin bestehende Aufgabe.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Synthese

#### 5.1.1 Analytische Methoden

Die angegebenen Schmelzpunkte der Verbindungen sind unkorrigiert und wurden mit einem Original-Kofler-Heiztischmikroskop (Leica Galen III) bestimmt.

Die optische Aktivität der Verbindungen wurde mit einem Polarimeter 343 (Perkin-Elmer) gemessen.

Die Durchführung der Elementaranalysen erfolgte am Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im automatischen Verfahren an einem CHNS-932 (Leco).

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte am Fachbereich Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg an Geräten der Firmen Bruker (ARX 500) und Varian (Unity 500). Die chemischen Verschiebungen der Verbindungen beziehen sich auf den internen Standard TMS (0,05 % v/v).

Die Massenspektren wurden im positiven Modus mit einem Elektrospray-Massenspektrometer (API 165, Perkin-Elmer) oder einem MALDI-TOF (Hewlett-Packard) aufgenommen. Dazu wurden die Proben in einem 4:1-Gemisch von Methanol/Wasser, das 0,1 % Ameisensäure (v/v) enthielt, gelöst. Als Matrix diente im Falle der MALDI-TOF-Untersuchungen DHAP oder DHB. Zum Teil wurden die Proben mit einer Massendifferenz 1 gemessen, so daß ganze Zahlen als Masse resultieren.

Die Reinheit aller synthetisierten Substanzen wurde mittels Dünnschichtchromatografie (Merck, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) und HPLC (Merck-Hitachi) überprüft.

*DC-Systeme (v/v):*

(A)	Chloroform / Methanol	9:1
(B)	Benzol / Aceton / Eisessig	50:20:1
(C)	n-Butanol / Essigester / Eisessig / Wasser	1:1:1:1

Die Detektion der Verbindungen erfolgte durch Anfärbung mit 0,2 %iger Ninhydrinlösung in Aceton.

*HPLC-System:* Gerät: Pumpe L-6200A, Detektor UV-VIS L-4250 (Merck)

---

Säule: Nucleosil C18, 5  $\mu$ m, 125 mm x 4 mm  
Eluent: ACN / Wasser / 0,1 % TFA  
Fluß: 1 ml / min  
 $\lambda$ : 220 nm  
Gradient A: 5 % ACN – 60 % ACN in 15 min, – 95 % ACN in 5 min  
Gradient B: 20 % ACN – 80 % ACN in 15 min, – 95 % ACN in 5 min  
Gradient C: 0 % ACN – 50 % ACN in 15 min, – 95 % ACN in 5 min

Die Reinheit der N-terminal ungeschützten Verbindungen wurde außerdem mittels Kapillarelektrophorese (P/ACE<sup>TM</sup>-MDQ, Beckman) kontrolliert.

Alle eingesetzten Chemikalien und Lösungsmittel stammen aus kommerziellen Quellen (Produkte der Firmen Fluka, Merck, Aldrich, Sigma, Roth, Novabiochem, BACHEM).

### 5.1.2 Allgemeine Synthesevorschriften

Um die Synthesemethoden übersichtlich und komprimiert darzustellen, werden die gängigen Methoden in diesem Abschnitt allgemein beschrieben. In den folgenden Kapiteln sind die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Zielverbindungen in Tabellen zusammengefaßt und die entsprechende Synthesemethode angegeben. Auf die Aufführung sämtlicher Zwischenstufen wurde verzichtet, wenn es sich um in der Peptidchemie gängige und unkompliziert herzustellende Verbindungen handelte. Die NMR-Daten der synthetisierten Verbindungen sind im Anhang aufgeführt.

#### ***(Methode A) Peptidbindungsknüpfung mittels Mischanhydridmethode mit CAIBE als Aktivierungsreagenz***

10 mmol N-terminal geschützte Aminosäure bzw. Peptid werden in 20 ml absolutem THF gelöst. Die Lösung wird auf  $-15^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Nacheinander werden unter Rühren je 10 mmol NMM und 10 mmol CAIBE zugegeben. Nach ca 6 min werden 10 mmol der Amino-komponente zugesetzt. Liegt die Aminokomponente als Salz vor, wird der Reaktionsansatz anschließend mit weiteren 10 mmol NMM versetzt. Danach wird die Reaktionsmischung 2 h in der Kälte und anschließend über Nacht bei RT gerührt.

Das Reaktionsgemisch wird einrotiert, in Essigsäureethylester aufgenommen und nacheinander 3x mit 5 %iger  $\text{KHSO}_4$ -Lösung, 1x mit gesättigter NaCl-Lösung, 3x mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, abschließend 2x mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. wird die Verbindung aus EE/Pentan umkristallisiert.

***(Methode B) Peptidbindungsknüpfung mittels Mischanhydridmethode mit Pivalinsäurechlorid als Aktivierungsreagenz***

10 mmol N-terminal geschützte Aminosäure bzw. Peptid werden in 20 ml absolutem THF gelöst. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt. Nacheinander werden unter Rühren je 10 mmol NMM und 10 mmol Pivalinsäurechlorid zugegeben. Nach ca. 6 min wird das Reaktionsgemisch auf -15°C abgekühlt. Nach Erreichen der Temperatur werden 10 mmol der Aminokomponente zugesetzt. Handelt es sich bei der Aminokomponente um ein Salz, wird der Reaktionsansatz anschließend mit weiteren 10 mmol NMM versetzt. Danach wird die Reaktionsmischung 2 h in der Kälte und über Nacht bei RT gerührt.

Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie bei *Methode A*.

***(Methode C) Peptidbindungsknüpfung mit TBTU als Aktivierungsreagenz***

10 mmol der N-terminal geschützten Aminosäure bzw. Peptid und 10 mmol der C-terminal geschützten Aminokomponente werden in 20 ml absolutem DMF gelöst. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt. Nacheinander werden unter Rühren je 10 mmol DIPEA und 10 mmol TBTU zugegeben. Das Gemisch wird eine Stunde bei 0°C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Nach der vollständigen Entfernung des DMF i. Vak. wird das Produkt wie unter *Methode A* beschrieben aufgearbeitet.

***(Methode D) Darstellung eines Aktivesters (Succinimid-Ester)***

10 mmol N-terminal geschützte Aminosäure bzw. Peptid und 10 mmol N-Hydroxysuccinimid werden in 20 ml absolutem THF gelöst. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt, und es werden 10 mmol DCC unter Rühren zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird weitere 2 h bei 0°C und anschließend bei RT über Nacht gerührt. Der entstandene N,N'-Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, das LM i. Vak entfernt und das Produkt aus EE / Pentan umkristallisiert.

***(Methode E) Peptidbindungsknüpfung mit Succinimid-Estern***

10 mmol der C-terminal ungeschützten Aminokomponente werden in einer NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (20 mmol in 20 ml Wasser) vorgelegt. Zu dieser Lösung werden bei RT unter Rühren langsam 10 mmol des in 10 ml Dioxan gelösten N-terminal geschützten Succinimid-esters zuge-  
tropft. Das Reaktionsgemisch wird weiter über Nacht gerührt und anschließend das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie bei *Methode A*.

***(Methode F) Abspaltung der N-terminalen-Schutzgruppe***

1 mmol N-terminal geschütztes Aminosäurepyrrolidid, -thiazolidid oder Peptid wird mit 3 ml 1,1 N HCl/Eisessig (*Methode F1*) oder 3 ml 50 %ige TFA in DCM (*Methode F2*) oder 3 ml 30 %ige HBr in Eisessig (*Methode F3*) versetzt. Die Abspaltung bei RT wird mittels DC verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion (ca. 2 h) wird das Salz der Verbindung mit absolutem

Diethylether ausgefällt, abgesaugt und i. Vak. über  $P_4O_{10}$  getrocknet. Das Produkt wird aus Methanol/Ether umkristallisiert oder umgefällt.

**(Methode G) Verseifung**

1 mmol Peptidmethylester wird in 10 ml Aceton gelöst, langsam mit 1,1 eq. einer 1 M NaOH-Lösung versetzt und bei RT gerührt. Der Verlauf der Verseifung wird mittels DC verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Aceton i. Vak. entfernt. Die verbleibende wässrige Lösung wird mit konzentrierter  $KHSO_4$ -Lösung bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 2-3 angesäuert. Anschließend extrahiert man das Produkt mehrmals mit EE und wäscht die vereinigten Essigesterfraktionen kurz mit gesättigter NaCl-Lösung, trocknet über  $Na_2SO_4$  und entfernt i. Vak. das Lösungsmittel. Die Kristallisation erfolgt aus EE/Pentan.

**(Methode H) Herstellung von Diazomethan**

22,5 ml einer 40 %igen NaOH-Lösung werden mit 70 ml Diethylether überschichtet. Das Gemisch wird auf  $0^\circ C$  abgekühlt und unter kräftigem Rühren werden langsam 7,7 g (75 mmol) N-Nitrosomethylharnstoff hinzugefügt. Nach der vollständigen Zersetzung des N-Nitrosomethylharnstoffs wird der Ether dekantiert und über festem NaOH unter weiterer Eiskühlung 5 h getrocknet. Die getrocknete Diazomethanlösung steht direkt für weitere Umsetzungen zur Verfügung.

**(Methode I) Herstellung von Z-Aminosäurechlormethylketonen**

Aus 15 mmol der N-terminal Z-geschützten Aminosäure, 15 mmol NMM und 15 mmol CAIBE wird bei  $-15^\circ C \pm 2^\circ C$  in 30 ml absolutem THF das gemischte Anhydrid gebildet. Nach 6 min wird das ausgefallene N-Methylmorpholiniumchlorid abgesaugt und die Reaktionsmischung auf  $-20^\circ C$  abgekühlt. Zum Reaktionsgemisch wird eine nach Methode H bereite Diazomethanlösung (75 mmol), die ebenfalls auf  $-20^\circ C$  gekühlt wurde, hinzugefügt und noch weitere 3 h bei  $0^\circ C$  gerührt. Anschließend wird das Gemisch mit einer etherischen HCl-Lösung in kleinen Portionen so lange versetzt, bis keine Gasbildung beim Zugeben der HCl-Lösung mehr erfolgt. Der Reaktionsansatz wird weiter bei RT über Nacht gerührt, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand i. Vak. über  $P_4O_{10}$  getrocknet. Das Produkt wird ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

**(Methode J) Darstellung von Z-Aminosäurepyrrolidinomethylketonen**

Das nach Methode I hergestellte Z-Aminosäurechlormethylketon wird in 15 ml absolutem THF gelöst und unter Rühren werden 30 mmol Pyrrolidin und anschließend portionsweise 15 mmol NMM hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt, anschließend das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der Rückstand in EE aufgenommen, kurz mit 5 %iger

KHSO<sub>4</sub>-Lösung und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Trennbedingungen: Säule: Nucleosil C18, 7 µm, 250 mm x 21 mm  
Eluent: isokratisch, 40 % ACN / Wasser / 0,1 % TFA  
Fluß: 6 ml / min  
λ: 220 nm

***(Methode K) Darstellung von N-Peptidyl-Hydroxamsäuren***

10 mmol eines nach Methode D hergestellten Succinimidesters und 30 mmol Hydroxylaminhydrochlorid werden in 150 ml eines Gemisches aus Wasser/THF (1:1) gelöst. Dazu werden portionsweise 5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gegeben und der Ansatz wird für 4 h bei RT unter DC-Kontrolle (System A) gerührt. Nach Reaktionsende wird das THF i. Vak. entfernt, die verbleibende wässrige Phase mit konzentrierter KHSO<sub>4</sub>-Lösung auf pH 2-3 gebracht und mehrmals mit EE extrahiert. Die vereinigten EE-Extrakte werden weiter aufgearbeitet wie bei Methode G.

***(Methode L) O-Acylierung von N-Peptidyl-Hydroxamsäuren***

10 mmol N-Peptidyl-Hydroxamsäure werden in 20 ml absolutem THF aufgenommen, auf -5°C gekühlt und mit 11 mmol (1,53 ml) TEA versetzt. Zu diesem Gemisch werden langsam unter Rühren und weiterem Kühlen 11 mmol des entsprechenden Säurechlorids zugetropft. Mittels DC (System A) wird das Reaktionsende detektiert und anschließend die Mischung zu eiskaltem, mit HCl angesäuertem Wasser (pH 2-3), gegeben und kräftig gerührt. Der sich bildende Niederschlag wird abgesaugt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt wird aus EE/Pentan umkristallisiert.

### **5.1.3 Synthese der Aminosäurepyrrolidide und –thiazolidide**

#### **5.1.3.1 Boc-Aminosäurepyrrolidide und –thiazolidide**

Die Synthese der Boc-geschützten Aminosäurepyrrolidide und –thiazolidide erfolgte ausgehend von den Boc-geschützten Aminosäuren und Pyrrolidin bzw. Thiazolidin nach den in **Tabelle 19** angegebenen und in 5.1.2 beschriebenen Methoden. Zweifach Boc-geschütztes Histidin sowie die  $\omega$ -Methylester von Boc-Glu-OH und Boc-Asp-OH kamen für die Synthese der entsprechenden Pyrrolidide und Thiazolidide zum Einsatz. Die  $\omega$ -Methylester wurden nach erfolgter Kupplung der Aminosäuren an Pyrrolidin bzw. Thiazolidin mit Methode G entfernt.

**Tabelle 19** Synthesedaten der N-terminal geschützten Aminosäurepyrrolidide und thiazolidide –

Verbindung	Summenformel M <sub>r</sub> Synthesemethode Ausbeute	MS [M+H] <sup>+</sup> DC:R <sub>f</sub> /System F <sub>p</sub>	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> , Kon- zentration LM	Elementaranaly- se (ber./gef.) %	HPLC R <sub>t</sub> [min]/ System
Boc-Ile-Thia	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S 302,43 A 82 %	303,4 0,86 / A 0,72 / B Öl	-15,2 c = 1 Methanol	C: 55,60/55,42 H: 8,67/8,21 N: 9,26/8,95	14,77 / B
Boc-Ile-Pyrr	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 284,39 A 78 %	285,4 0,8 / A 0,61 / B Öl	-9,9 c = 1 Methanol	C: 63,35/62,98 H: 9,92/9,61 N: 9,85/9,78	14,46 / B
Boc-His(Boc)-Thia	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S 326,41 A 56 %	327,6 0,79 / A 0,48 / B 85-89°C	+13,0 c = 1 Methanol	C: 53,50/52,86 H: 7,09/7,18 N: 13,14/12,68	12,33 / B
Boc-His(Boc)-Pyrr	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> 308,38 A 63 %	309,4 0,74 / A 0,39 / B 89-93°C	+9,2 c = 1 Methanol	C:58,81/58,63 H:7,90/7,74 N:13,72/13,69	12,18 / B
Boc-Asn-Thia	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S 303,37 B 76 %	304,2 0,51 / A 0,21 / B 125-127°C	-31,4 c = 1 Methanol	C:47,51/47,53 H:6,98/6,81 N:13,85/13,62	12,67 / A
Boc-Asn-Pyrr	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 285,34 B 78 %	286,3 0,46 / A 0,13 / B 168-171°C	-29,2 c = 1 Methanol	C:54,72/54,51 H:8,12/7,84 N:14,73/14,44	12,11 / A
Boc-Pro-Thia	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S 286,38 A 86 %	287,6 0,78 / A 0,52 / B Öl	-22,2 c = 1 Methanol	C:54,52/54,30 H:7,74/7,55 N:9,78/9,00	15,89 / B
Boc-Pro-Pyrr	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 268,35 A 89 %	269,7 0,70 / A 0,47 / B Öl	-27,8 c = 1 Methanol	C:62,66/61,97 H:9,01/8,82 N:10,44/10,19	15,66 / B
Boc-Asp-Thia	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S 304,36 B + G 51 %	305,9 0,44 / A 0,36 / B Öl	+1,5 c = 1 Methanol	C:47,36/46,79 H:6,62/6,54 N:9,20/8,91	14,09 / A
Boc-Asp-Pyrr	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 286,32 B + G 59 %	287,6 0,41 / A 0,30 / B Öl	-20,5 c = 1 Methanol	C:54,53/54,21 H:7,74/7,81 N:9,78/9,17	13,19 / A
Boc-Glu-Thia	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S 318,38 B + G 62 %	319,6 0,52 / A 0,42 / B 115-118°C	-3,1 c = 1 Methanol	C:49,04/48,89 H:6,96/6,82 N:8,80/8,59	13,93 / A
Boc-Glu-Pyrr	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 300,35 B + G 54 %	301,5 0,48 / A 0,33 / B 147-149°C	-14,6 c = 1 Methanol	C:55,99/55,53 H:8,05/7,74 N:9,33/9,12	13,37 / A

### 5.1.3.2 Aminosäurepyrrolidide und –thiazolidide

Die acidolytische Abspaltung der Boc-Schutzgruppen von den in **Tabelle 19** aufgeführten Verbindungen wurde nach *Methode F1* bzw. im Falle der Histidinderivate mit *Methode F2* durchgeführt. Die analytischen Daten der erhaltenen Substanzen sind in **Tabelle 20** dargestellt.

**Tabelle 20** Synthesedaten der Aminosäurepyrrolidide und –thiazolidide

Verbindung	Summenformel M <sub>r</sub> Ausbeute	MS [M+H] <sup>+</sup> DC/R <sub>f</sub> /System F <sub>p</sub>	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> , Kon- zentration LM	Elementaranalyse (ber./gef.) %	HPLC R <sub>t</sub> [min]/ System
H-Ile-Thia*HCl	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl 238,77 92 %	203,5 0,79 / C 82-84°C	-3,1 c = 1 Methanol	C:45,27/44,79 H:8,02/8,36 N:11,73/11,02	12,17 / C
H-Ile-Pyrr*HCl	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> OCl 220,74 94 %	185,6 0,76 / C 173-175°C	+7,2 c = 1 Methanol	C:54,41/53,93 H:9,40/9,59 N:12,51/12,51	12,10 / C
H-His-Thia *2TFA	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> F <sub>6</sub> S 454,34 89 %	227,8 0,35 / C 74-78°C	+7,1 c = 1 Methanol	C:34,37/34,01 H:3,55/3,72 N:12,33/11,92	4,23 / C
H-His-Pyrr *2TFA	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> F <sub>6</sub> 436,31 92 %	209,5 0,37 / C 77-80°C	+4,5 c = 1 Methanol	C:38,54/38,33 H:4,22/4,22 N:12,84/12,62	5,08 / C
H-Asn-Thia*HCl	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ClS 239,72 96 %	204,1 0,64 / C 92-96°C	-18,3 c = 1 Methanol	C:35,07/34,51 H:5,89/6,19 N:17,53/16,97	3,16 / C
H-Asn-Pyrr*HCl	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Cl 221,09 98 %	186,3 0,52 / C 92-96°C	-12,7 c = 1 Methanol	C:43,34/42,55 H:7,27/7,65 N:18,95/17,55	3,63 / C
H-Pro-Thia*HCl	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl 222,73 74 %	187,9 0,63 / C Öl	-106,2 c = 1 Methanol	C:43,14/42,87 H:6,79/6,52 N:12,58/12,19	8,96 / C
H-Pro-Pyrr*HCl	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> OCl 204,70 91 %	169,7 0,5 / C Öl	-93,2 c = 1 Methanol	C:52,81/52,82 H:8,37/8,45 N:13,69/13,53	9,32 / C
H-Asp-Thia*HCl	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> SCl 240,70 96 %	220,3 0,61 / C 48-51°C	-10,5 c = 1 Methanol	C:34,93/33,54 H:5,44/5,85 N:11,64/10,94	4,33 / C
H-Asp-Pyrr*HCl	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl 222,67 95 %	202,4 0,53 / C 42-44°C	-7,0 c = 1 Methanol	C:43,15/42,65 H:6,79/6,87 N:12,58/11,51	5,09 / C
H-Glu-Thia*HCl	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> SCl 254,73 94 %	218,28 0,68 / C 201-204°C	-6,7 c = 1 Methanol	C:37,72/37,67 H:5,94/5,93 N:11,00/10,83	8,03 / C
H-Glu-Pyrr*HCl	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl 236,69 92 %	201,4 0,61 / C 147-149°C	-14,6 c = 1 Methanol	C:45,67/45,45 H:7,24/7,13 N:11,84/11,47	8,30 / C



### 5.1.4 Synthese der Isoleucinderivate

Boc-geschütztes Isoleucin wurde nach *Methode B* mit Azetidin und Piperidin gekuppelt. Die Boc-Schutzgruppen wurden acidolytisch nach *Methode F1* entfernt.

**Tabelle 21** Synthesedaten der N-terminal geschützten und ungeschützten Isoleucinderivate

Verbindung	Summenformel M <sub>r</sub> Ausbeute	MS [M+H] <sup>+</sup> DC/R <sub>f</sub> /System F <sub>p</sub>	[α] <sup>20</sup> <sub>D</sub> , Kon- zentration LM	Elementarana- lyse (ber./gef.) %	HPLC R <sub>t</sub> [min]/ System
Boc-Ile-Aze	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 270,37 69 %	271,3 0,82 / A 0,54 / B Öl	-4,9 c = 1 Methanol	C:62,19/61,50 H:9,69/9,23 N:10,36/10,06	13,02 / B
H-Ile-Aze*HCl	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> OCl 206,71 89 %	171,3 0,72 / C 202-203°C	+21,0 c = 1 Methanol	C:52,29/51,86 H:9,26/9,13 N:13,55/12,92	10,95 / C
Boc-Ile-Pip	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 298,42 73 %	299,5 0,87 / A 0,71 / B Öl	-9,2 c = 1 Methanol	C:64,40/64,33 H:10,13/9,86 N:9,39/8,98	16,41 / B
H-Ile-Pip*HCl	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> OCl 234,74 92 %	199,4 0,70 / C 140-142°C	+36,2 c = 1 Methanol	C:56,28/55,87 H:9,87/9,59 N:11,93/11,31	13,53 / C

### 5.1.5 Synthese der Aminosäurepyrrolidinomethylketone

**Tabelle 22** Synthesedaten der N-terminal geschützten und ungeschützten Aminosäurepyrrolidinomethylketone

Verbindung	Summenformel M <sub>r</sub> Ausbeute	MS [M+H] <sup>+</sup> DC/R <sub>f</sub> /System	HPLC R <sub>t</sub> [min]/ System
Z-Ile-CH <sub>2</sub> -Pyrr	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 332,44 46 %	299,3 6,4 / A Öl	9,1 / B
Z-Pro-CH <sub>2</sub> -Pyrr	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 316,40 51 %	283,4 6,1 / A Öl	8,2 / B
H-Ile-CH <sub>2</sub> -Pyrr*HBr	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> OBr 279,22 86 %	199,0 0,53 / C Öl	5,6 / C
H-Pro-CH <sub>2</sub> -Pyrr*HBr	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> OBr 263,18 91 %	183,6 0,53 / C Öl	4,9 / C

Die Synthese der Aminosäurepyrrolidinomethylketone erfolgte aus den Z-geschützten Derivaten von Isoleucin und Prolin. Diese wurden nach *Methode I* in die entsprechenden Z-Aminosäurechlormethylketone umgewandelt, welche nach *Methode J* mit Pyrrolidin gekuppelt wurden. Die Z-Schutzgruppen wurden acidolytisch nach *Methode F3* entfernt. Die Hyd-

robromide der Aminosäurepyrrolidinomethylketone sind hygroskopisch und konnten nur als Öl erhalten werden.

### 5.1.6 Synthese der N-terminal verlängerten Aminosäurethiazolidide

Das nach 5.1.3.2 erhaltene Isoleucinthiazolidid wurde nach *Abbildung 5* unter Verwendung der *Methode A* schrittweise N-terminal mit den entsprechenden Boc-Aminosäuren verlängert. Nach jedem Kupplungsschritt erfolgte eine acidolytische Deblockierung des N-Terminus mit *Methode F1*.

Da für einige der Verbindungen ein ausreichender Reinheitsgrad durch Umkristallisation nicht erreicht werden konnte, wurde in diesen Fällen eine präparative HPLC-Reinigung abgeschlossen. Die so erhaltenen Substanzen liegen als Salze des Trifluoracetats vor.

Trennbedingungen: Säule: Nucleosil C18, 7  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 21 mm

Eluent: ACN / Wasser / 0,1 % TFA

Gradient: 20 % ACN  $\rightarrow$  90 % in 30 min

Fluß: 6 ml/min,  $\lambda$ : 220 nm

**Tabelle 23** Synthesedaten der N-terminal verlängerten Aminosäurethiazolidide

Verbindung	Summenformel M <sub>r</sub> MS [M+H] <sup>+</sup>	DC (R <sub>f</sub> /System) F <sub>p</sub>	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ , c = 1 Methanol	Elementaranalyse (ber./gef.) %	HPLC R <sub>t</sub> [min]/ System
Pro-Ile-Thia*HCl	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> SCl 335,89 300,0	0,67 / C 171-174°C	-43,6	C: 50,06/49,24 H: 7,80/7,73 N: 12,51/12,17	11,81 / A
Gly-Pro-Ile-Thia *TFA	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> SF <sub>3</sub> 470,50 357,0	0,65 / C 78-83°C	-77,3	C: 45,95/45,54 H: 6,21/5,88 N: 11,91/11,50	11,85 / A
Pro-Pro-Ile-Thia *HCl	C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> SCl 433,00 397,0	0,58 / C 102-107°C	-121,3	C: 52,70/52,58 H: 7,68/7,42 N: 12,94/11,80	12,51 / A
Ile-Pro-Ile-Thia *TFA	C <sub>22</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> SF <sub>3</sub> 526,61 413,0	0,7 / C 92-95°C	-40,25	C: 50,18/49,28 H: 7,08/6,64 N: 10,64/9,92	13,82 / A
Pyr-Ile-Thia*HCl	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> SCl 349,87 314,0	0,57 / C 98-104°C	-10,35	C: 48,06/48,58 H: 6,91/7,06 N: 12,01/12,18	12,19 / A
Pyr-His-Thia*2HCl	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> SCl <sub>2</sub> 410,31 338,0	0,45 / C 89-95°C	-21,7	C: 40,98/42,04 H: 5,16/6,02 N: 17,07/16,70	7,15 / A

In **Tabelle 23** sind die analytischen Daten aller Zielverbindungen dargestellt. Die Synthese des Boc-Pyr-His-Thia erfolgte aus dem Boc-geschützten Derivat der Pyroglutaminsäure und dem TFA-Salz des Histidinthiazolidids nach *Methode B*. Diese Reaktion lieferte ein Produktgemisch, dessen Hauptfraktion das gewünschte Boc-Pyr-His-Thia enthielt. Die Verbindung

wurde an einer Kieselgelsäule durch Elution mit Chloroform/Methanol (7:3) gereinigt und vom so erhaltenen sauberen Produkt nach *Methode F1* die N-terminale Schutzgruppe entfernt.

### 5.1.7 Synthese der seitenkettensubstituierten Glutaminsäurethiazolidide

#### 5.1.7.1 Seitenkettensubstituierte Boc-Glutaminsäurethiazolidide

Das in **Tabelle 19** aufgeführte Boc-Glu-Thia wurde an der  $\gamma$ -Carbonsäurefunktion durch die Einführung verschieden großer Reste modifiziert. Diese Reste wurden über ihre Aminogruppe durch Ausbildung einer Amidbindung an die  $\gamma$ -Carbonsäurefunktion gekuppelt. Dabei kamen je nach Rest verschiedene Kupplungsverfahren zum Einsatz.

Folgende Aminokomponenten wurden mit der angegebenen Methode an Boc-Glu-Thia geknüpft:

Aminokomponente	Kupplungsmethode	Ausbeuten
Aminopolyethylenglycolmethylether ( $M_r \approx 8000$ )	C	93 %
H-Gly-O $t$ Bu	A	74 %
H-Gly-Gly-Gly-OH	D + E	49 %
H-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-OH	D + E	93 %

Die Aufreinigung der Reaktionsprodukte weicht in 2 Fällen von der allgemeinen Synthesebeschreibung ab.

#### ***Boc-Glu(Gly<sub>5</sub>)-Thia***

Das Produkt fällt bereits während der Reaktion über Nacht aus, wird anschließend abfiltriert und mit 0,1 N HCl und danach mit Wasser gewaschen. Anschließend wird über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> i. Vak. getrocknet.

#### ***Boc-Glu(PEG)-Thia***

Abweichend von der allgemeinen Vorschrift werden die Ausgangsstoffe der Synthese in einem 500fachen Überschuß DMF gelöst. Nach Reaktionsende wird das DMF i. Vak. vollständig entfernt und der Rückstand in Methanol gelöst. Nach Überschichtung mit Ether fällt das Produkt zusammen mit nicht umgesetztem PEG aus. Die Feinreinigung erfolgte durch präparative HPLC-Trennung an einer Gelfiltrationssäule (Pharmacia, Sephadex G-25, 90  $\mu$ m, 26 mm x 100 mm).

Trennbedingungen: Eluent: Wasser, Fluß: 5 ml/min,  $\lambda = 220$  nm

**Tabelle 24**      **Synthesedaten der seitenkettenmodifizierten Boc-Glutaminsäurethiazolidide**

Verbindung	Summenformel M <sub>r</sub> Ausbeute	MS [M+H] <sup>+</sup> DC/R <sub>f</sub> /System F <sub>p</sub>	[α] <sup>20</sup> <sub>D</sub> , Kon- zentration LM	Elementaranalyse (ber./gef.) %	HPLC R <sub>t</sub> [min]/ System
Boc-Glu(Gly-OtBu)-Thia	C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S 431,54 74 %	432,4 0,63 / A 0,34 / B 130-132°C	-5,8 c = 1 Methanol	C:52,88/52,50 H:7,71/7,82 N:9,74/9,38	12,77 / B
Boc-Glu(Gly <sub>3</sub> )-Thia	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> S 489,54 49 %	490,5 n. b. Öl	n. b.	C:46,62 H:6,38 N:14,31	n. b.
Boc-Glu(Gly <sub>5</sub> )-Thia	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> N <sub>7</sub> O <sub>10</sub> S 603,64 86 %	604,5 0,09 / C Zers. ab 202°C	n. b.	C:45,76/45,60 H:6,18/6,11 N:16,24/16,56	11,93 / A
Boc-Glu(PEG)-Thia	93 %	≈8000 (Mas- senscher- punkt) 52-53°C	n. b.	n. b.	n. b.

### 5.1.7.2 Seitenkettenmodifizierte Glutaminsäurethiazolidide

Von den in **Tabelle 24** beschriebenen Verbindungen wurden nach *Methode F1* und *F2* (Boc-Glu(Gly<sub>5</sub>)Thia) die N-terminalen Boc-Schutzgruppen abgespalten. Dabei wurde im Falle des Boc-Glu(Gly-OtBu)-thiazolidids gleichzeitig der *t*-Butylester entfernt. Die mit Gly-Derivaten modifizierten Substanzen wurden nach den unter 0 angegebenen Bedingungen durch präparative HPLC-Trennung aufgereinigt und liegen als Trifluoracetate vor. Das H-Glu(PEG)-Thia wurde wie die Boc-geschützte Vorstufe an einer Gelfiltrationssäule gereinigt (siehe 5.1.7.1).

**Tabelle 25** Synthesedaten der seitenkettenmodifizierten Glutaminsäurethiazolidide

Verbindung	Summenformel M <sub>r</sub> Ausbeute	MS [M+H] <sup>+</sup> DC/R <sub>f</sub> /System F <sub>p</sub>	[α] <sup>20</sup> <sub>D</sub> , Kon- zentration LM	Elementaranalyse (ber./gef.) %	HPLC R <sub>t</sub> [min]/ System
H-Glu(Gly)-Thia *TFA	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> SF <sub>3</sub> 389,34 92 %	389,3 0,48 / C 89-92°C	+6,2 c = 1 Methanol	C:37,02/37,93 H:4,66/4,29 N:10,79/10,53	6,12 / C
H-Glu(Gly <sub>3</sub> )-Thia *TFA	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> SF <sub>3</sub> 503,45 94 %	503,4 0,32 / C 91-94°C	+4,1 c = 1 Methanol	C:38,17/37,56 H:4,80/4,78 N:13,91/13,43	7,84 / C
H-Glu(Gly <sub>5</sub> )-Thia *TFA	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>7</sub> O <sub>10</sub> SF <sub>3</sub> 617,55 98 %	617,6 0,25 / C 105-107°C	n. b.	C:38,90/38,82 H:4,90/4,79 N:15,88/15,39	8,22 / C
H-Glu(PEG)-Thia *HCl	92 %	≈8000 (Mas- senscher- punkt)	n. b.	n. b.	n. b.

### 5.1.8 Synthese des O-Benzoyl, N-Glycylphenyl-Hydroxylamins

Das nach *Methode D + E* aus Boc-Gly-OH und H-Phe-OH dargestellte Boc-Gly-Phe-OH wurde nach *Methode D* zum Succinimidester umgesetzt. Aus diesem wurde nach *Methode K* das N-Peptidyl-Hydroxylamin hergestellt und anschließend nach *Methode L* mit Benzoylchlorid O-acyliert. Die N-terminale Deblockierung erfolgte nach *Methode F1*.

#### *Boc-Gly-Phe-NHOH*

Ausbeute: 74 %                      F<sub>p</sub>: 156-159°C  
 M<sub>r</sub>: 337,37                      Summenformel: C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>                      MS: 338,4 [M+H<sup>+</sup>]  
 DC: 0,27 / A, 0,11 / B

#### *Boc-Gly-Phe-NHO-Bz*

Ausbeute: 76 %                      F<sub>p</sub>: 125-128°C  
 M<sub>r</sub>: 441,48                      Summenformel: C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>                      MS: 464,8 [M+Na]  
 DC: 0,75 / A, 0,53 / B

#### *H-Gly-Phe-NHO-Bz\*HCl*

Ausbeute: 92 %                      F<sub>p</sub>: 116-119°C  
 M<sub>r</sub>: 377,82                      Summenformel: C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Cl                      MS: 341,8 [M+H<sup>+</sup>]  
 DC: 0,76 / C                      [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -11,1

Elementaranalyse:	C	H	N
ber.:	57,29	5,30	11,14
gef.:	56,19	5,18	10,23

## 5.2 Enzymkinetische Methoden

Die spektrophotometrische Messung der Freisetzung des p-Nitroanilins aus den pNA-Substraten erfolgte an einem UV/VIS-Spektrometer Lambda 20 (390 nm) oder an dem Bio Assay Reader HTS 7000 Plus (405 nm) der Firma Perkin Elmer. Zur fluoreszenzspektrometrischen Untersuchung der PAP-katalysierten Hydrolyse von Pyr-βNA wurde das Luminescence Spektrometer LS50B (Excitation 310 nm, Emission 410 nm) der Firma Perkin Elmer eingesetzt. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung (Verwendung von Halbmikroküvetten) oder Vierfachbestimmung (Mikroansätze in 96-well-Platten) durchgeführt.

Zur Auswertung der Messungen wurden lineare und nichtlineare Regressionsprogramme (GraFit von Erithacus Software Ltd.) herangezogen.

Die DP IV<sub>Schwein</sub> und die POP<sub>Flavo</sub> wurden innerhalb der Arbeitsgruppe präpariert. Die humane DP I wurde freundlicherweise von Blaz Gigic (J.-Stefan-Institut, Ljubljana) zur Verfügung gestellt. Alle anderen verwendeten Enzyme stammen aus kommerziellen Quellen (Sigma, Calbiochem, Serva, Boehringer, Germed).

Die verwendeten Substrate wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt oder von Bachem bezogen.

Verwendete Standardmeßansätze:	Mikroansatz	Halbmikroansatz
Puffer	100 µl	500 µl
Substrat	100 µl	500 µl
Wasser/Inhibitor	50 µl	250 µl
Enzym	10 µl	50 µl

*Verwendete Enzyme und Puffer:*

**DP IV<sub>Schwein</sub>** aus Schweineniere

Proteinkonzentration 1,6 mg/ml, MW 120 000

spezifische Aktivität gegenüber GP-pNA 49,4 U/mg bei pH 7,6 und 30°C

typischer Standardansatz mit 40 mM HEPES-Puffer pH 7,6, I = 0,125 (KCl),

Enzymkonzentration 1,2 nM

**POP<sub>Flavo</sub>** rekombinantes Protein von *Flavobacterium meningosepticum* aus E. coli,

Proteinkonzentration 5,5 mg/ml, MW 74 000

spezifische Aktivität gegenüber GPP-pNA 25,6 U/mg bei pH 7,6 und 30°C

typischer Standardansatz mit 40 mM HEPES-Puffer pH 7,6, I = 0,125 (KCl),

Enzymkonzentration 4,5 nM

**DP I<sub>Hum</sub>** humane Niere

Proteinkonzentration 3,7 mg/ml, MW 160 000

spezifische Aktivität gegenüber GR-pNA 79,4 U/mg bei pH 5,6 und 30°C

typischer Standardansatz mit 40 mM MES-Puffer pH 5,6, 4 mM DTT, 4 mM

KCl, 2 mM EDTA, Enzymkonzentration 3,4 nM

**DP I<sub>Rind</sub>** Rinderpankreas (Sigma), lyophilisiertes Enzym, aufgenommen in 2 ml Puffer

Proteinkonzentration 0,069 mg/ml, MW 160 000

spezifische Aktivität gegenüber GR-pNA 24,6 U/mg bei pH 5,6 und 30°C

typischer Standardansatz mit 40 mM MES-Puffer pH 5,6, 4 mM DTT,

4 mM KCl, 2 mM EDTA, Enzymkonzentration 2,9 nM

**Cathepsin B<sub>Hum</sub>** humane Leber (Calbiochem),

Proteinkonzentration 0,725 mg/ml, MW 27 500

typischer Standardansatz mit 40 mM MES-Puffer pH 5,6, 4 mM DTT, 4

mM KCl, 2 mM EDTA, Enzymkonzentration 2 nM, Substrat Z-RR-

pNA

**Cathepsin L<sub>Hum</sub>** humane Leber (Calbiochem),

Proteinkonzentration 0,1 mg/ml, MW 29 000

- typischer Standardansatz mit 40 mM MES-Puffer pH 5,6, 4 mM DTT, 4 mM KCl, 2 mM EDTA, Enzymkonzentration 10 nM, Substrat Z-FR-pNA
- LAP<sub>Schwein</sub>** Schweineniere (Sigma)  
 Proteinkonzentration 5,3 mg/ml  
 Zur Aktivierung wurden 100 µl Enzymlösung für 2 h bei pH 8,0 und 40°C in 900 µl HEPES-Puffer (50 mM mit 15 mM MnCl<sub>2</sub>) preinkubiert.  
 typischer Standardansatz mit 40 mM HEPES pH 8,0, I = 0,125 (KCl), Enzymkonzentration 1,2 µg/ml, Substrat Leu-pNA
- APM<sub>Schwein</sub>** Schweineniere (Sigma)  
 Proteinkonzentration 4,5 mg/ml  
 typischer Standardansatz mit 40 mM HEPES pH 7,2, I = 0,125 (KCl), Enzymkonzentration 2,5 µg/ml, Substrat Ala-pNA
- PAP<sub>Kalb</sub>** Kalbsleber (Sigma), lyophilisiertes Enzym, aufgenommen in 2 ml Puffer  
 Proteinkonzentration 3,4 mg/ml  
 typischer Standardansatz mit 50 mM Phosphatpuffer pH 8,0, 2 mM DTT, 4 mM EDTA, Enzymkonzentration 0,3 µg/ml, Substrat Pyr-βNA
- Subtilisin** *Bacillus subtilis* (Serva)  
 Proteinkonzentration 0,7 mg/ml  
 typischer Standardansatz mit 40 mM HEPES pH 7,6, I = 0,125 (KCl), Enzymkonzentration 0,3 µg/ml, Substrat Succ-AAA-pNA
- Elastase** Schweinepankreas (Serva)  
 Proteinkonzentration 0,9 mg/ml  
 typischer Standardansatz mit 40 mM HEPES pH 7,6, I = 0,125 (KCl), Enzymkonzentration 27 ng/ml, Substrat Succ-AAA-pNA
- α-Chymotrypsin** Schweinepankreas (Germed)  
 Proteinkonzentration 3,4 mg/ml  
 typischer Standardansatz mit 40 mM HEPES pH 7,6, I = 0,125 (KCl), Enzymkonzentration 0,26 µg/ml, Substrat Succ-AAPF-pNA
- Trypsin** Schweinepankreas (Serva)  
 Proteinkonzentration 2,95 mg/ml  
 typischer Standardansatz mit 40 mM HEPES pH 7,6, I = 0,125 (KCl), Enzymkonzentration 13 µg/ml, Substrat Succ-AAPF-pNA

### 5.2.1 Bestimmung der kinetischen Konstanten der enzymkatalysierten Hydrolyse von Substraten

Die Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_m$ ,  $V_{max}$ , bzw.  $k_{cat}$  der enzymkatalysierten Substrathydrolyse erfolgte durch Variation der Substratkonzentration in einem Konzentrationsbereich, der ungefähr dem 0,05 bis 8-fachem des  $K_m$ -Wertes des Testsubstrates entsprach. Die Enzymkonzentration war mindestens 3 Größenordnungen geringer als die verwendete Substratkonzentration und die Aktivität wurde so gewählt, daß während der Messungen nur maximal 5 % des Substrates umgesetzt wurden. Die in den Messungen ermittelten Initialgeschwindigkeiten wurden als Funktion der Substratkonzentration aufgetragen und mittels nichtlinearer Regression die kinetischen Konstanten bestimmt.

### 5.2.2 Untersuchung der Hemmung der DP IV und POP durch klassische kompetitive Inhibitoren

Zur Bestimmung der  $K_i$ -Werte von kompetitiven Inhibitoren wurden 3 verschiedene Substratkonzentrationen mit jeweils mindestens 3 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen kombiniert und die Initialgeschwindigkeiten der enzymkatalysierten Hydrolyse des Testsubstrates nach Inkubation der Reaktionslösung mit Enzym bestimmt. Dabei erfolgte die Wahl der Enzymkonzentration so, daß sie wenigstens um 2 Größenordnungen unter der Inhibitorkonzentration lag und während der Meßzeit der Gesamtsubstratverbrauch 5 % nicht überstieg. Die Bestimmung der Hemmkonstanten erfolgte anhand der DIXON-Auftragung und durch ein lineares Regressionsverfahren. Der Hemmtyp wurde durch die Sekundärauftragung der Ergebnisse des DIXON-Plots überprüft.

### 5.2.3 Untersuchung der Freisetzung des Ile-Thia und His-Thia aus den *prodrugs* in Serum bzw. Heparin-Blut

1 mM Lösungen der *prodrugs* in Serum (GPIThia, PPIThia, IPIThia und PITHia) oder Heparin-Blut (600 IE / 200 ml; PyrITHia und PyrHThia) wurden bei 37°C inkubiert. Nach 0, 6, 12, 31, 52, 130 und 220 min bzw. 0, 4, 14, 34, 64 144 und 254 min wurde mit jeweils 50 µl in einem Standardansatz (40 mM HEPES-Puffer pH 7,6; 0,4 mM GPpNA) die Restaktivität der löslichen Serum-DP IV ermittelt. Das Heparin-Blut wurde unmittelbar vor der Messung bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert und die Bestimmung der DP IV-Restaktivität mit dem so gewonnenen Plasma durchgeführt. Die Restaktivitäten wurden als Prozent im Vergleich zu einer Kontrolle ausgewertet.



### 5.2.4 Untersuchung der Hydrolyse der *prodrugs* Pyr-Ile-Thia, Pyr-His-Thia und Pro-Ile-Thia durch die PAP bzw. LAP

#### *Pyr-Ile-Thia und Pyr-His-Thia*

750  $\mu\text{l}$  einer 1 mM Stammlösung der jeweiligen Verbindung wurden mit 750  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer (100 mM, 10 mM EDTA, 5 mM DTE, 5% Glycerol, pH 8) bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  PAP-Lösung (250  $\mu\text{g/ml}$ , für die Sequenzierung, Kalbsleber, Boehringer Mannheim) wurde die Reaktion gestartet. An einer vollautomatisierten, thermostatisierbaren Kapillarelektrophorese (P/ACE<sup>TM</sup>-MDQ, Beckman) erfolgte periodisch (alle 30 min) die Probenentnahme und -trennung (Injektion: 5 s, 0,5 psi; Separation: 8 min, 15 kV; Trennpuffer: 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 2,5; Kapillare: 25 (15) cm x 50  $\mu\text{m}$ ; PyrHisThia  $t_R$  4,55 min; PyrIleThia  $t_R$  4,39 min). Über einen Zeitraum von 5 h wurde die Abnahme der Peakfläche der Substrate bzw. die Zunahme der Peakfläche der Hydrolyseprodukte (Ile-Thia  $R_f$  3,64 min und His-Thia  $R_f$  3,21 min) verfolgt.

#### *Pro-Ile-Thia*

750  $\mu\text{l}$  einer 1 mM Stammlösung PITHia wurden mit 750  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer (100 mM, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8) bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  LAP-Lösung (25  $\mu\text{g/ml}$ , Schweineniere, Sigma, Aktivierung siehe S. 95) wurde die Reaktion gestartet. An einer vollautomatisierten, thermostatisierbaren Kapillarelektrophorese (P/ACE<sup>TM</sup>-MDQ, Beckman) erfolgte periodisch (alle 15 min) die Probenentnahme und -trennung (Injektion: 5 s, 0,5 psi; Separation: 8 min, 15 kV; Trennpuffer: 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 2,5; Kapillare: 25 (15) cm x 50  $\mu\text{m}$ ; ProIleThia  $t_R$  4,32 min). Über einen Zeitraum von 2 h wurde die Abnahme der Peakfläche des Substrats bzw. die Zunahme der Peakfläche des Hydrolyseproduktes (Ile-Thia  $t_R$  3,64 min) verfolgt.

### 5.2.5 Untersuchung der Inaktivierung der DP I durch H-GF-NHO-Bz

Zur Bestimmung der 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung der DP I durch H-GF-NHO-Bz wurden 2 verschiedene Substratkonzentrationen (0,47 mM und 0,94 mM) mit jeweils 6 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen kombiniert und nach Enzymzusatz die Abnahme der Geschwindigkeit der Substratspaltung verfolgt. Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, daß sie wenigstens um 2 Größenordnungen unter der Inhibitorkonzentration lag und während der Meßzeit der Gesamtsubstratverbrauch 5 % nicht überstieg. Aus den resultierenden hyperbolen Kurven wurden die scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung  $k_{\text{obs}}$  der Inaktivierung durch nichtlineare Regression bestimmt. Die Auftragung von  $1/k_{\text{obs}}$  als Funktion der Substratkonzentration ergab die realen 1. Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten.

schwindigkeitskonstanten  $k$  für jede untersuchte InhibitorKonzentration. Unter der Bedingung  $I \ll K_i$  entspricht der Anstieg der aus der Auftragung von  $k$  gegen die InhibitorKonzentration resultierenden Geraden gemäß Gleichung 6 der 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung.

### **5.2.6 Untersuchung der Inaktivierung der Cathepsine durch O-Acyl, N-Peptidyl-Hydroxylamine**

Zur Bestimmung der 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung der Cathepsine durch O-Acyl, N-Peptidyl-Hydroxylamine wurde  $k_{\text{obs}}$  mit 2 verschiedenen Substratkonzentrationen und bei einer InhibitorKonzentration ( $I \ll K_i$ ) bestimmt. Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, daß sie wenigstens um 2 Größenordnungen unter der InhibitorKonzentration lag und während der Meßzeit der Gesamtsubstratverbrauch 5 % nicht überstieg. Aus dem ermittelten  $k$  wurde nach Gleichung 6 die 2. Ordnungsgeschwindigkeitskonstante der Inaktivierung berechnet.

### **5.2.7 Reversibilitätstest der Inaktivierung**

Die Reaktion der Inaktivierung der DP I-katalysierten Hydrolyse von GRpNA durch H-GF-NHO-Bz wurde in einem Standardansatz (Halbmikroansatz) gestartet und bis zum Ende der Inaktivierung verfolgt. Dabei wurde die InhibitorKonzentration so gewählt, daß die resultierende Endgeschwindigkeit ungleich Null war. Die Endgeschwindigkeit wurde durch Anlegen einer Tangente bestimmt. Danach wurden in die Küvette nochmal 0,5 ml Puffer, 0,5 ml Substrat und 0,25 ml Wasser gegeben und dadurch die Enzym- und InhibitorKonzentration auf die Hälfte verdünnt. Die nun gemessene Initialgeschwindigkeit darf im Falle der Irreversibilität der Inaktivierung nicht mehr als 50 % der Endgeschwindigkeit nach erfolgter Inaktivierung betragen.

### **5.2.8 Bestimmung der Partitionierungskonstanten der Inaktivierung der DP I durch H-GF-NHO-Bz**

In einem Standardreaktionsansatz wurde die DP I mit mindestens 6 verschiedenen InhibitorKonzentrationen (280 nM – 4,7 nM) inkubiert. Nach Beendigung der Inaktivierungsreaktion wurden nach Zugabe von GRpNA (0,72 mM) die DP I-Restaktivitäten bestimmt. Durch Auftragung des Verhältnisses der jeweiligen Restaktivitäten ( $v_i$ ) zur Initialgeschwindigkeit ohne Inhibitor ( $v_0$ ) als Funktion des Quotienten aus Inhibitor- und Enzymkonzentration wurde die Partitionierungskonstante  $r$  ermittelt.

## 5.3 Stabilitätsuntersuchungen

### 5.3.1 Untersuchung des nichtenzymatischen Zerfalls der Aminosäurethiazolidide

Von den Verbindungen Ile-Pyrr, Ile-Thia, Ile-Aze, Ile-Pip, Asn-Thia, His-Thia, Pro-Thia, Glu-Thia und Asp-Thia wurde eine 0,1 mM Lösung in Puffern bei verschiedenen pH-Werten (pH 2, 4, 6 Citrat-Puffer nach Sørensen, pH 8 und 10 Boratpuffer nach Sørensen und Clark) hergestellt. Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert und mittels automatischem Probengeber periodisch (4 Tage) eine Probe unter folgenden Bedingungen an einer Kapillarelektrophorese (CE<sup>3D</sup>, Hewlett-Packard) untersucht:

Kapillare: unbeschichtet, 27(19) cm x 50 µm

Injektion: 2 s mit 10 kV

Trennung: 10 min bei 10 kV, NaHPO<sub>4</sub>-Puffer, 0,1 M, pH 2

Detektion: UV-VIS 220 nm

Die korrigierten (interner Standard 0,1 mM Gly-Gly) relativen Signalflächen (Verhältnis von Signalfläche zu Migrationszeit) wurden als Funktion der Zeit entsprechend einer Reaktion Pseudo-1. Ordnung ausgewertet.

Die Linearität des Konzentrations-Signalflächen-Verhältnisses im verwendeten Konzentrationsbereich ist für Ile-Thia gezeigt nachgewiesen worden.

### 5.3.2 Untersuchung der Stabilität der Aminosäurethiazolidide in biologischen Medien

- EDTA-Blut: 0,2 mM EDTA in frisch gewonnenem humanen Blut
- Serum: Zentrifugation von humanem Blut bei 4°C für 10 min 10000 rpm
- Leber- und Nierenrohhomogenat: 50 g tiefgefrorenes Gewebe vom Schwein wurden in 0,9 %iger Kochsalzlösung aufgetaut, gespült und anschließend in 80 ml PBS-Puffer (1 mM DTE) mittels Ultraturax homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 14000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand für die Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt.

Von Ile-Pyrr, Ile-Thia, Ile-Aze, Ile-Pip, Asn-Thia, His-Thia, Pro-Thia, Glu-Thia und Asp-Thia wurde eine 1-0,1 mM Lösung (je nach Hemmkonstante für die DP IV-katalysierte Substrathydrolyse) in dem jeweiligen biologischen Medium hergestellt. Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert und periodisch über mindestens 3 Tage die Restaktivität der endogenen DP IV gegenüber GpNA (1 mM) in HEPES-Puffer (0,04 M, pH 7,6) bestimmt. Dabei wurde folgender Ansatz verwendet: 0,5 ml Puffer; 0,5 ml Substrat; 0,2 ml Wasser und 0,1 ml des Inkubats (oder jeweils ein Zehntel im Mikroansatz). Die Konzentration des Inhibitors wurde also

im Meßansatz um den Faktor 13 verdünnt. Die ermittelten Restaktivitäten mit Inhibitor wurden in % der Restaktivität des Kontrollansatzes ohne Inhibitor ausgewertet.

### 5.3.3 Nichtenzymatischer Zerfall der Aminosäurepyrrolidinomethylketone

Die Geschwindigkeitskonstanten des nichtenzymatischen Zerfalls der Aminosäurepyrrolidinomethylketone wurden durch Verfolgung der Abnahme der Höhe ihres Massesignals an einem Elektrospray-Massenspektrometer (API 165, Perkin-Elmer) bei Raumtemperatur bestimmt. Aus einer 10  $\mu$ molaren Lösung der entsprechenden Verbindung in Ammoniumacetatpuffer pH 7,6 wurde periodisch eine Probe über ESI-MS analysiert und quantifiziert. Zuvor war der Konzentrationsbereich ermittelt worden, in dem sich die Konzentration der Verbindungen proportional zur Höhe des Massesignals verhält. Die Abnahme der Signalthöhe als Funktion der Zeit wurde durch nichtlineare Regression entsprechend einer Reaktion Pseudo-1. Ordnung ausgewertet.

### 5.3.4 Nichtenzymatischer Zerfall des H-GF-NHO-Bz

Der nichtenzymatische Zerfall einer 0,4 mM Lösung des H-GF-NHO-Bz in MES-Puffer pH 5,6 bei 30°C wurde durch Verfolgung der Extinktionsabnahme der Verbindung am UV/VIS-Spektrometer Lambda 20 (Perkin-Elmer) verfolgt. Die Geschwindigkeitskonstante Pseudo-1. Ordnung wurde mittels nichtlinearer Regression nach Auftragung der Extinktionen bei 268 nm als Funktion der Zeit ermittelt.

## 5.4 Tierexperimente

Alle beschriebenen Tierexperimente, mit Ausnahme der Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve des Ile-Thias, konnten durch die freundliche Unterstützung von Prof. R. A. Pederson am Institut für Physiologie der Universität von British Columbia (Kanada) durchgeführt werden.

Für die Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve des Ile-Thias an Wistar-Ratten wurde von J. Freyse am Institut für Diabetesforschung in Karlsruhe ein katheterisiertes Rattenmodell verwendet. Für die Bestimmung der DP IV-Restaktivität im Plasma nach oraler Applikation von Ile-Thia wurde folgender Mikroansatz verwendet: 80  $\mu$ l 7,7 mM GpNA in HEPES-Puffer (40 mM, pH 7,6) + 20  $\mu$ l Plasma.

---

Im folgenden sind die Bedingungen für die am Institut für Physiologie der Universität von British Columbia (Kanada) durchgeführten Experimente beschrieben.

#### 5.4.1 Tiere

Kolonien von Zucker- und Wistar-Ratten werden im Institut für Physiologie der Universität von British Columbia (Kanada) gehalten. Die verwendeten adipösen (fa/fa) Zucker-Ratten wogen zwischen 350 und 450 g, die schlanken (Fa/?) Zucker-Ratten wogen 300-350 g. Die Wistar-Ratten hatten ein Körpergewicht von 250-300 g. In der den Experimenten vorangehenden Nacht wurde den Tieren die Nahrung entzogen. Trinkwasser war weiterhin zugänglich.

#### 5.4.2 Durchführung des OGTT und der Inhibitorapplikation

Den Tieren wurde zum Zeitpunkt  $t=0$  1 g Glukose pro Kilogramm Körpergewicht in Form einer 40 %igen Lösung mittels einer Schlündelsonde verabreicht. Der DP IV-Inhibitor Ile-Thia (0,1 M in destilliertem Wasser) wurde gemeinsam mit der Glukoselösung appliziert. Die *prodrug*-Formen PITHia und GPITHia (0,1 M in destilliertem Wasser) wurden 20 min vor der Glukoseladung verabreicht. Die Kontrollgruppen erhielten statt des Inhibitors jeweils eine adäquate Menge einer 0,9 %igen Kochsalzlösung.

#### 5.4.3 Blutentnahme

Nach Resektion der Schwanzspitze wurde den Tieren zu den Zeiten 0, 5, 10, 20, 30 und 60 min (zusätzlich -20 min bei Applikation der *prodrugs*) jeweils 500  $\mu$ l Blut mit heparinisierten Röhrchen aus der Schwanzvene entnommen und in Eppendorf-Röhrchen gefüllt. Die Proben wurden auf Eis gelagert, für 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und von dem so gewonnenen Plasma sofort die DP IV-Restaktivität und die Glukosekonzentration bestimmt. Für die Insulinbestimmung wurde ein Teil der Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 5.4.4 DP IV-Aktivitätsbestimmung in Plasma

Die Bestimmung der DP IV-Aktivität im Plasma erfolgte in Mikrotiterplatten am Plattenreader (Dynatech MRX Microplate Reader) bei 405 nm (Doppelbestimmung). Folgender Ansatz kam zur Anwendung: 270  $\mu$ l 0,26 mM GPpNA in HEPES-Puffer (40 mM, pH 7,6) + 30  $\mu$ l Plasma

#### **5.4.5 Glukosebestimmung in Plasma**

Für die Bestimmung der Glukosekonzentration im Plasma (mittels Glukoseoxidase) kam ein Beckman Glucose Analyzer 2 zur Anwendung. Es wurden Doppelbestimmungen mit jeweils 10 µl Plasma durchgeführt.

#### **5.4.6 Insulinbestimmung in Plasma**

Die Insulinbestimmung wurde mittels RIA nach einer von Pederson (1982) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Radioaktivität wurde mit einem LKB Wallac 2177 Gammamaster Automatic Gamma Counter gemessen.

#### **5.4.7 Statistische Analyse**

Der statistische Vergleich zwischen den inhibitorbehandelten und Kontrollgruppen erfolgte mit einem ungepaarten t-Test. Ergebnisse  $P < 0,05$  wurden als statistisch signifikant bewertet. Für die Integration der Insulin- und Glukoseflächen wurden die jeweiligen Werte zum Zeitpunkt 0 als Basis verwendet. Für die Analysen kam GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) zum Einsatz.

## 6 Literatur

Adibi, S.A.: Renal assimilation of oligopeptides: physiological mechanisms and metabolic importance. *Am. Physiol. Soc.* **272**, E723-E736 (1997)

Ahmad, S.; Wang, L.; Ward, P.E.: Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**, 1257-1261 (1992)

Ahr n, B.: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes. *BioEssays* **20**, 642-651 (1998)

Ahr n, B.; Larsson, H.; Holst, J.J.: Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 473-478 (1997)

Ahr n, B.; Simonsson, E.; Efendic, S.; Eriksson, P.; Bavenholm, P.; Jansson, P. A.; Landin-Olsson, M.; Torgeirsson, H.; Rask, E.; Sandqvist, M.; Dickinson, S.; Holmes, D.: Inhibition of DPP-IV by NVP DPP728 improves metabolic control over a 4 week period in type 2 diabetes. *Diabetes* **50**, Supplement 2 [Abstract], 416-P (2001)

Alford, F.P.; Bloom, S.R.; Nabarro, J.D.: Glucagon metabolism in man, studies on the metabolic clearance rate and the plasma acute disappearance time of glucagon in normal and diabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **42**, 830-838 (1976)

Amasheh, S.; Wenzel, U.; Boll, M.; Dorn, D.; Weber, W.M.; Clauss, W.; Daniel, H.: Transport of charged dipeptides by the intestinal H<sup>+</sup>/peptide symporter PepT1 expressed in xenopus laevis oocytes. *J. Membrane Biol.* **155**, 247-256, 1997

Andersen, D.K.; Sun, Y.S.; Brunicaudi, F.C.; Berlin, S.A.; Lebovitz, H.E.; Garsky, V.; Elahi, D.: Regulation of hepatic glucose production by gastric inhibitory polypeptide (GIP). Insulin (INS) and Glucagon (GLUC). *Dig. Dis. Sci.* **29**, 6S (1984)

Angliker, H.; Wikstrom, P.; Kirschke, H.; Shaw, E.: The inactivation of the cysteinyl exopeptidases cathepsin H and C by affinity-labelling reagents. *Biochem. J.* **262**, 63-68 (1989)

Aoyagi, T.; Wada, T.; Kojima, F.; Nagai, M.; Miyoshino, S.; Umezawa, H.: Two different modes of enzymatic changes in serum with progression of Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Chim. Acta* **129**, 165-173 (1983)

Aronson, N.N. & Barrett, A.J.: The specificity of cathepsin B. Hydrolysis of glucagon at the C-terminus by a peptidyl dipeptidase mechanism. *Biochem. J.* **171**, 759-765 (1978)

Ashworth, D.M.; Atrash, B.; Baker, G.R.; Baxter, A.J.; Jenkins, P.D.; Jones, D.M.; Szelke, M.: 2-Cyanopyrrolidides as potent, stable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 1163-1166 (1996)

Augustyns, K.J.L.; Lambeir, A.M.; Borloo, M.; DeMeester, I.; Vedernikova, I.; Vanhoof, G.; Hendriks, D.; Scharpe, S.; Haemers, A.: Pyrrolidides: Synthesis and structure-activity relationship as inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Eur. J. Med. Chem.* **32**, 301-309 (1997)

- Balkan, B.; Kwasnik, L.; Miserendino, R.; Mone, M.; Hughes, T.E.; Li, X.: Improved insulin secretion and oral glucose tolerance after *in vivo* inhibition of DPP-IV in obese Zucker rats. Abstract 16. *International Diabetes Federation Congress*, Helsinki, 20.-25.07.1997, 511 (1997)
- Bauer, K.: Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* **70**, 69-74 (1988)
- Bauer, K.; Nowak, P.; Kleinkauf, H.: Specificity of a serum peptidase-hydrolyzing thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur. J. Biochem.* **118**, 173-176 (1981)
- Bell, G.I.; Santerre, R.F.; Mullenbach, G.T.: Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* **302**, 716-718 (1983)
- Bisswanger, H.. Enzymkinetik, Theorie und Methoden, VCH 2. Aufl. Weinheim, 1994
- Boduszek, B.; Oleksyszyn, J.; Kam, C.M.; Selzler, J.; Smith, R.E.; Powers, J.C.: Dipeptide phosphonates as inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *J. Med. Chem.* **37**, 3969-3976 (1994)
- Boll, M.; Herget, M.; Wagener, M.; Weber, W.M.; Markovich, D.; Biber, J.; Clauss, W.; Murer, H.; Daniel, H.: Expression cloning and functional characterisation of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 284-289 (1995)
- Bonin, A.; Hühn, J.; Fleischer, B.: Dipeptidyl-peptidase IV/CD 26 on T-cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway. *Immunol. Rev.* **161**, 43-53 (1998)
- Bordallo, C.; Schwenke, J.; Rendueles, M.S.: Localization of the thermosensitive X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **173**, 199-203 (1984)
- Born I.; Faust, J.; Heins, J.; Barth, A.; Neubert, K.: Potent inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Eur. J. Cell Biol. [Suppl.]* **40**, 23 (1994)
- Bouras, M.; Huneau, J.F.; Luengo, C.; Erlansson-Albertsson, C.; Tomé, D.: Metabolism of enterostatin in rat intestine, brain membranes, and serum: differential involvement of proline-specific peptidases. *Peptides* **16**, 398-405 (1995)
- Bouras, M.; Huneau, J.F.; Tome, D.: The inhibition of intestinal dipeptidylaminopeptidase-IV promotes the absorption of enterostatin and des-arginine-enterostatin across rat jejunum *in vitro*. *Life Sciences* **59**, 2147-2155 (1996)
- Brandsch, M.; Ganapathy, V.; Leibach, F.H.: Role of dipeptidyl peptidase IV (DPIV) in intestinal and renal absorption of peptides. In: *Molecular Biology Intelligence Unit. Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response*, Fleischer B, Hrsg.: Austin, USA, 111-129 (1995)
- Brandsch, M.; Thünecke, F.; Küllertz, G.; Schutkowski, M.; Fischer, G.; Neubert, K.: Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H<sup>+</sup>/peptide symporter, PEPT1. *J. Biol. Chem.* **273**, 3861-3864 (1998)



- Brandt, W.; Lehmann, T.; Thondorf, I.; Born, I.; Schutkowski, M.; Rahfeld, J.; Neubert, K.; Barth, A.: A model of the active site of dipeptidyl peptidase IV predicted by comparative molecular field analysis and molecular modelling simulations. *Int. J. Peptide Protein Res.* **46**, 494-507 (1995)
- Brandt, W.; Ludwig, O.; Thondorf, I.; Barth, A.: A new mechanism in serine proteases catalysis exhibited by dipeptidyl peptidase (DPIV). Results of PM3 semiempirical thermodynamic studies supported by experimental results. *Eur. J. Biochem.* **236**, 109-114 (1996)
- Bray, G.A. & Yorck, D.A.: Studies on foodintake of genetically obese rats. *Am. J. Physiol.* **223**, 176-179 (1972)
- Bristol, L.A.; Bachovchin, W.; Takács, L.: Inhibition of CD26 enzyme activity with proboropro stimulates rat granulocyte/macrophage colony formation and thymocyte proliferation in vitro. *Blood* **85**, 3602-3609 (1995)
- Brömme, D.; Neumann, U.; Kirschke, H.; Demuth, H.U.: Novel N-peptidyl-O-acyl hydroxamates: selective inhibitors of cysteine proteinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1202**, 271-276 (1993)
- Brömme, D.; Schierhorn, A.; Kirschke, H.; Wiederanders, B.; Barth, A.; Fittkau, S.; Demuth, H.U.: Potent and selective inactivation of cysteine proteinases with N-peptidyl-O-acyl hydroxylamines. *Biochem. J.* **263**, 861-866 (1989)
- Brown, J.C.; Pederson, R.A.: A multiparameter study on the action of preparations containing cholecystokinin-pancreozymin. *Scand. J. Gastroenterol.* **5**, 537-541 (1970)
- Browne, P. & O`Cuinn, G.: An evaluation of the role of a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl amino peptidase, each purified from the soluble fraction of the guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro. *Eur. J. Biochem.* **137**, 75-87 (1983)
- Brubaker, P.L.: Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides. *Endocrinology* **128**, 3175-3182 (1991)
- Buchan, A.M.J.; Polak, J.M.; Capella, C.; Solcia, E.; Pearse, A.G.E.: Electron immunocytochemical evidence for the K cell localization of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man. *Histochem.* **546**, 37-44 (1978)
- Burcelin, R.; Dolci, W.; Thorens, B.: Long-lasting effect of a dipeptidyl peptidase IV-resistant analog of glucagon-like peptide-1. *Metabolism* **48**, 252-258 (1999)
- Callebaut, C.; Krust, B.; Jacotot, E.; Hovanessian, A.G.: T cell activation antigen, CD 26, as a cofactor for entry of HIV in CD4<sup>+</sup> cells. *Science* **262**, 2045-2050 (1993)
- Chan C.B.: Beta-cell stimulus – secretion coupling defects in rodent models of obesity, *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* **73**, 1414-1424 (1995)
- Chan, C.B.; Pederson, R.A.; Buchan, A.M.J.; Tubesing, K.B.; Brown, J.C.: Gastric inhibitory polypeptide and hyperinsulinemia in the Zucker (fa/fa) rat: a developmental study. *Int. J. Obesity* **9**, 137-146 (1985)

- Cheeseman, C.I. & Tsang, R.: The effect of GIP and glucagon-like peptides on intestinal basolateral membrane hexose transport. *Am. Phys. Soc.* **271**, G477-482 (1996)
- Cheng, H.C.; Abdel-Ghany, M.; Elble, R.C.; Pauli, B.U.: Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J. Biol. Chem.* **273**, 24207-24215 (1998)
- Chikuma, T.; Hama, T.; Nagatsu, T.; Kumegawa, M.; Kato, T.: Purification and properties of dipeptidyl peptidase IV from human urine. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **371**, 325-330 (1990)
- Coxe, J.S.; O'Dorisio, T.M.; Cataland, S.; Crockett, S.E.; Gastric inhibitory polypeptide hypersecretion in diabetes mellitus: effect of sulfonylurea treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **52**, 1002-1005 (1981)
- Creutzfeldt, W.: The incretin concept today. *Diabetologia* **16**, 75-85 (1979)
- Creutzfeldt, W.O.; Kleine, N.; Willms, B.; Orskov, C.; Holst, J.J.; Nauck, M.A.: Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care* **19**, 580-586 (1996)
- Daniel, H. & Adibi, S.A.: Functional separation of dipeptide transport and hydrolysis in kidney brush border membrane vesicles. *FASEB J.* **8**, 753-759 (1994)
- Daniel, H.: First insights into the operational mode of epithelial peptide transporters. *J. Physiol.* **498**, 561 (1997)
- Daniel, H.: Function and molecular structure of brush border membrane peptide/H<sup>+</sup> symporters. *J. Membrane Biol.* **154**, 197-203 (1996)
- Darmoul, D.; Lacasa, M.; Baricault, L.; Marguet, D.; Sapin, C.; Trotot, P.; Barbat, A.; Trugnan, G.: Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **267**, 4824-4833 (1992)
- Deacon, C.F.; Hughes, T.E.; Holst, J.J.: Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes* **47**, 764-769 (1998)
- Deacon, C.F.; Knudsen, L.B.; Madsen, K.; Wiberg, F.C.; Jacobsen, O.; Holst, J.J.: Dipeptidyl-peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia* **41**, 271-278 (1998)
- Deacon, C.F.; Nauck, M.A.; Toft-Nielsen, M.; Pridal, L.; Willms, B.; Holst, J.J.: Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH<sub>2</sub>-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* **44**, 1126-1131 (1995)
- DeMeester, I.; Korom, S.; Van Damme, J.; Scharp, S.: CD26, let it cut or cut it down. *Immunol. Today* **20**, 367-375 (1999)

DeMeester, I.; Vanham, G.; Kestens, L.; Vanhoof, G.; Bosmans, E.; Gigase, P.; Scharpe, S.: Binding of Adenosine Deaminase to the Lymphocyte Surface via CD26. *Eur. J. Immunol.* **24**, 566-570 (1994)

Demuth, H.U. & Heins, J.: Catalytic Mechanism of Dipeptidylpeptidase IV. In: *Molecular Biology Intelligence Unit. Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response*, Fleischer B., Hrsg.: Austin, USA, 1-35 (1995)

Demuth, H.U.: Beiträge zur spezifischen irreversiblen Hemmung der Dipeptidylpeptidase IV. Dissertation A, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg (1980)

Demuth, H.U.: Studien zur Entwicklung und zum Funktionsmechanismus irreversibler Inhibitoren von Serinproteasen unter besonderer Berücksichtigung postprolinspaltender Enzyme. Dissertation B, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg (1988)

Demuth, H.U.; Fischer, G.; Barth, A.; Showen, R.L.: N-Obond fission as the rate-determining step in the aqueous conversion of N-peptidyl-O-(p-nitrobenzoyl)hydroxylamines to p-Nitrobenzoic acid and peptidylhydroxamic acids. *J. Org. Chem.* **54**, 5880-5883 (1989)

Dendorfer, A.; Vordermark, D.; Dominiak, P.: Degradation of bradykinin by bovine tracheal epithelium and isolated epithelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 121-129 (1997)

Döring, F.; Walter, J.; Will, J.; Föcking, M.; Boll, M.; Amasheh, S.; Clauss, W.; Daniel, H.: Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J. Clin. Invest.* **101**, 2761-2767 (1998)

Döring, F.; Will, J.; Amasheh, S.; Clauss, W.; Ahlbrecht, H.; Daniel, H.: Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J. Biol. Chem.* **273**, 23211-23218 (1998)

Duke-Cohan, J.S.; Morimoto, C.; Rucker, J.A.; Schlossman, S.F.: A novel form of dipeptidyl peptidase IV found in human serum. Isolation, characterization, and comparison with T lymphocyte membrane dipeptidylpeptidase IV (CD26). *J. Biol. Chem.* **270**, 14107-14114 (1995)

Duke-Cohan, J.S.; Morimoto, C.; Rucker, J.A.; Schlossman, S.F.: Serum high molecular weight dipeptidyl peptidase IV (CD26) is similar to a novel antigen DPPT-L released from activated T cells. *J. Immunol.* **156**, 1714-1721 (1996)

Dupre, J.; Behme, M.T.; Hramiak, I.M.; McFarlane, P.; Williamson, M.P.; Zabel, P.; McDonald, T.J.: Glucagon-like peptide I reduces postprandial glycemic excursions in IDDM. *Diabetes* **44**, 626-630 (1995)

Dupre, J.; Ross, S.A.; Watson, D.; Brown, J.C.: Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **37**, 826-828 (1973)

Durinx, C.; Lambeir, A.M.; Bosmans, E.; Falmagne, J.B.; Berghmans, R.; Haemers, A.; Scharpe, S.; DeMeester, I.: Molecular characterization of dipeptidylpeptidase activity in serum. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5608-5613 (2000)

- Ebert, R.; Nauck, M.; Creutzfeldt, W.: Effect of exogenous or endogenous gastric inhibitory polypeptide (GIP) on plasma triglyceride responses in rats. *Horm. Metab. Res.* **23**, 517-521 (1991)
- Eckel, R.H.; Fujimoto, W.Y.; Brunzell, J.D.: Gastric inhibitory polypeptide enhanced lipoprotein lipase activity in cultured preadipocytes. *Diabetes* **28**, 1141-1142 (1979)
- Edvell A. & Lindstrom P.: Initiation of increased pancreatic islet growth in young normoglycemic mice (Umea +/-). *Endocrinology* **140**, 778-783 (1999)
- Fehmann, H.C., Göke, R.; Göke, B.: Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide. *Endocrine Rev.* **16**, 390-410 (1995)
- Fehmann, H.C.; Göke, B.; Göke, R.; Trautmann, M.E.; Arnold, R.: Synergistic stimulatory effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide on the endocrine rat pancreas. *FEBS Lett.* **252**, 109-112 (1989)
- Fehmann, H.C.; Habener, J.F.: Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) on a somatostatin secreting cell line. *FEBS Lett.* **279**, 335-340 (1991)
- Ferrario, C.M.; Iyer, S.N.: Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul. Pept.* **78**, 13-18 (1998)
- Finlay, M.F. & McCloud L.: Intestinal leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase: Genetic regulation and development in mice. *Biochemical genetics* **28**, 267-281 (1990)
- Fischer, G.; Heins, J.; Barth, A.: The conformation around the peptide bond between the P<sub>1</sub>- and P<sub>2</sub>-positions is important for catalytic activity of some proline-specific proteases. *Biochim. Biophys. Acta* **742**, 452-462 (1983)
- Fleischer, B.: CD 26: A Surface Protease Involved in T-Cell Activation. *Immunol. Today* **15**, 180-184 (1994)
- Forbes, A., Elliott, T.; Tildesley, H.; Finegood, D.; Meneilly, G.S.: Alterations in non-insulin-mediated glucose uptake in the elderly patient with diabetes. *Diabetes* **47**, 1915-1919 (1998)
- Freyse, E.J.; Knospe, S.; Becher, T.; El Hag, O.; Göke, B.; Fischer, U.: Glucagon-like peptide -1 has no insulin-like effect in insulin-dependent diabetic dogs maintained normoglycemic and normoinsulinemic. *Metabolism* **48**, 134-137 (1999)
- Freyse, J.E.; Knospe, S.; Glund, K.; Demuth, H.U.: Dosage of a dipeptidyl peptidase IV (DP IV) inhibitor and timing of its administration to improve glucose tolerance in rats. *Abstract from the 59<sup>th</sup> Scientific Session*, 1555 (1999)
- Frohman, L.A.; Downs, T.R.; Heimer, E.P.; Felix, A.M.: Dipeptidylpeptidase IV and trypsin-like enzymatic degradation of human growth hormone-releasing hormone in plasma. *J. Clin. Invest.* **83**, 1533-1540 (1989)
- Fülöp, V.; Bocskei, Z.; Polgar, L.: Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell* **94**, 161-170 (1998)

- Gangwar, S.; Pauletti, G.M.; Wang, B.; Siahaan, T.J.; Stella, V.J.; Borchardt, R.T.: Prodrug strategies to enhance the intestinal absorption of peptides. *DDT* Vol. 2, No. 4, 148-155 (1997)
- Gelman, B.B.; Papa, L.; Davis, M.H.; Gruenstein, E.: Decreased lysosomal dipeptidyl aminopeptidase I activity in cultured human skin fibroblasts in Duchenne's muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* **630**, 220-224 (1980)
- Green, G.D. & Shaw, E.: Peptidyl diazomethyl ketones are specific inactivators of thiol proteinases. *J. Biol. Chem.* **256**, 1923-1928 (1981)
- Gross, R.; Schölmerich, P.; Gerok, W.: Die innere Medizin 8. Aufl., Stuttgart: Schattauer, S. 889 (1994)
- Gutheil, W.G. & Bachovchin, W.W.: Separation of l-Pro-DL-boroPro into its component diastereomers and kinetic analysis of their inhibition of dipeptidyl peptidase IV. A new Method for the analysis of slow, tight-binding inhibition. *Biochemistry* **32**, 8723-8731 (1993)
- Gutheil, W.G.; Subramanyam, M.; Flentke, G.R.; Sanford, D.G.; Munoz, E.; Huber, B.T.; Bachovchin, W.W.: Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6594-6598 (1994)
- Gutman, H.R. & Fruton, J.S.: On the proteolytic enzymes of animal tissues VIII. An intracellular enzyme related to chymotrypsin. *J. Biol. Chem.* **174**, 851-858 (1948)
- Gutniak, M.K.; Holst, J.J.; Orskov, C.; Ahren, B.; Efendic, S.: Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)-amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **326**, 1316-1322 (1992)
- Hanson, H. & Frohne, M.: Crystalline leucine aminopeptidase from lens ( $\alpha$ -aminoacyl-peptide hydrolase; EC 3.4.11.1). *Methods Enzymol.* **45**, 504-521 (1976)
- Hartmann, H.; Ebert, R.; Creutzfeldt, W.: Insulin-dependent inhibition of hepatic glycogenolysis by gastric inhibitory polypeptide (GIP) in perfused rat liver. *Diabetologia* **29**, 112-114 (1986)
- Hasnain, S.; Hiram, T.; Huber, C.P.; Mason, P.; Mort, J.S.: Characterization of cathepsin B specificity by site-directed mutagenesis. Importance of Glu245 in the S2-P2 specificity for arginine and its role in transition state stabilization. *J. Biol. Chem.* **268**, 235-240 (1993)
- Hegen, M.; Mittrücker, H.W., Hug, R.; Demuth, H.U.; Neubert, K.; Barth, A.; Fleischer, B.: Enzymatic activity of CD 26 (dipeptidylpeptidase IV) is not required for its signalling function in T cells. *Immunology* **189**, 483-493 (1993)
- Heins, J.: Kinetische Charakterisierung der Dipeptidyl Peptidase IV, einer prolinspezifischen Exopeptidase und Vergleich dieses Enzyms mit der Prolyl Endopeptidase; Entwicklung eines Modells der Substratspezifität der Dipeptidylpeptidase IV, Dissertation B Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg (1989)
- Heller, R.S.; Kieffer, T.J.; Habener, J.F.: Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing  $\alpha$ -cells of the rat. *Diabetes* **46**, 785-791 (1997)

- Herrmann, C.; Göke, R.; Richter, G.; Fehmann, H.C.; Arnold, R.; Göke, B.: Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* **56**, 117-126 (1995)
- Heymann, E. & Mentlein, R.: Liver dipeptidyl aminopeptidase IV hydrolyzes substance P. *FEBS Lett.* **91**, 360-364 (1978)
- Higashimoto, Y.; Opara, E.C., Liddle, R.A.: Dietary regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) gene expression in rat small intestine. *Comp. Biochem. Physiol.* **110C**, 207-214 (1995)
- Hildebrandt, W.; Blech, W.; Kohnert, K.D.: Kinetic studies on hepatic handling of glucagon using the model of non-recirculating perfused rat livers. *Horm. Metab. Res.* **23**, 410-413 (1991)
- Hinke, S.A.; Pospisilik, J.A.; Demuth, H.U.; Manhart, S.; Kühn-Wache, K.; Hoffmann, T.; Nishimura, E.; Pederson, R.A.; McIntosh, C.H.: Dipeptidyl peptidase IV (DPIV/CD26) degradation of glucagon. Characterization of glucagon degradation products and DPIV-resistant analogs. *J. Biol. Chem.* **275**, 3827-3834 (2000)
- Hino, M.; Nagatsu, T.; Kakumu, S.; Okuyama, S.; Yoshii, Y.; Nagatsu, I.: Glycylprolyl  $\beta$ -naphthylamidase activity in human serum. *Clin. Chim. Acta* **62**, 5-11 (1975)
- Holst, J.J.: Degradation of glucagons. In: Henriksen J. editor, Degradation of bioactive substances: physiology and pathophysiology, Boca Raton: CRC Press, 167-180 (1991)
- Holst, J.J. & Deacon, C.F.: Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* **47**, 1663-1670 (1998)
- Holst, J.J.; Gromada, J.; Nauck, M.A.: The pathogenesis of NIDDM involves a defective expression of the GIP receptor. *Diabetologia* **40**, 984-986 (1997)
- Holst, J.J.; Orskov, C.; Vagn-Nielsen, O.; Schwartz, T.W.: Truncated glucagon-like peptide 1, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Lett.* **211**, 169-174 (1987)
- Hong, W. & Doyle, D.: Molecular dissection of the NH<sub>2</sub>-terminal signal/anchor sequence of rat dipeptidyl peptidase IV. *J. Cell. Biol.* **111**, 323-328 (1990)
- Hopsu-Havu, V.K. & Glenner, G.G.: A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycylprolyl- $\beta$ -naphthylamide. *Histochemie* **7**, 197-201, (1966)
- Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, Bd. XV/1 und Band XV/2: Synthese von Peptiden, Hrsg.: Wunsch E, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1974)
- Huston, J.P.; Hasenohrl, R.U.; Boix, F.; Gerhardt, P.; Schwarting, R.K.: Sequence-specific effects of neurokinin substance P on memory, reinforcement, and brain dopamine activity. *Psychopharmacology* **112**, 147-162 (1993)
- Iida, M.; Murakami, T.; Ishida, I.; Mizuno, A.; Kuwajima, M.; Shima, K.: Substitution at codon 269 (glutamine  $\rightarrow$  proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 597-604 (1996)

- Ionescu, E.; Sauter, J.F.; Jeanrenaud, B.: Abnormal oral glucose tolerance in genetically obese (fa/fa) rats. *Am. J. Physiol.* **248**, E500 (1985)
- Jaspan, J.B.; Polonsky, K.S.; Lewis, M.; Pensler, J.; Pugh, W.; Moossa, A.R.; Rubenstein, A.H.: Hepatic metabolism of glucagon in the dog: contribution of the liver to overall metabolic disposal of glucagon. *Am. J. Physiol.* **240**, E233-244 (1981)
- Jeanrenaud B: An hypothesis on the aetiology of obesity: dysfunction of the central nervous system as a primary cause. *Diabetologia* **28**, 502-513 (1985)
- Jia, X.; Elliott, R.; Kwok, Y.N.; Pederson, R.A.; McIntosh, C.H.: Altered glucose dependence of glucagon-like peptide I(7-36)-induced insulin secretion from the Zucker (fa/fa) rat pancreas. *Diabetes* **44**, 495-500 (1995)
- Johnston, J.A.; Jensen, M.; Lannfelt, L.; Walker, B.; Williams, C.H.: Inhibition of prolyl-endopeptidase does not affect gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in a human neuroblastoma cell line. *Neurosci. Lett.* **277**, 33-36 (1999)
- Kähne, T.; Lendeckel, U.; Wrenger, S.; Neubert, K.; Ansorge, S.; Reinhold, D.: Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (review). *Int. J. Mol. Med.* **4**, 3-15 (1999)
- Kakiuchi, S. & Tomizawa, H.H.: Properties of a glucagon-degrading enzyme of beef liver. *J. Biol. Chem.* **239**, 2160-2164 (1964)
- Kameoka, J.; Tanaka, T.; Nojima, J.; Schlossman, S.F.; Morimoto, C.: Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* **261**, 466-469 (1993)
- Kärgel, H.J.; Dettmer, R.; Etzold, G.; Kirschke, H.; Bohley, P.; Langner, J.: Action of cathepsin L on the oxidized B-chain of bovine insulin. *FEBS Lett.* **114**, 257-260 (1980)
- Kärgel, H.J.; Dettmer, R.; Etzold, G.; Kirschke, H.; Bohley, P.; Langner, J.: Action of rat liver cathepsin L on glucagon. *Acta Biol. Med. Ger.* **40**, 1139-1143 (1981)
- Kelly, T.A.; Adams, J.; Bachovchin, W.W.; Barton, R.W.; Capbell, S.J.; Coutts, S.J.; Snow, R.J.: Immunosuppressive boronic acid dipeptides: correlation between conformation and activity. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12637-12638 (1993)
- Kieffer, T.J.; McIntosh, C.H.; Pederson, R.A.: Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* **136**, 3585-3597 (1995)
- Kirschke, H.; Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.: Proteinases 1. Lysosomal cystein proteinases. *Protein Profile* **2**, 1587-1643 (1995)
- Knudsen, L.B. & Pridal, L.: GLP-1(9-36)amide is major metabolite of GLP-1(7-36)amide after in vivo administration to dogs, and it acts as an antagonist on the pancreatic receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **318**, 429-435 (1996)
- Knudsen, L.B.; Nielsen, P.F.; Huusfeldt, P.O.; Johansen, N.L.; Madsen, K.; Pedersen, F.Z.; Thøgersen, H.; Wilken, M.; Agerso, H.: Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with

pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *Med. Chem.* **43**, 1664-1669 (2000)

Krantz, A.; Copp, L.J.; Coles, P.J.; Smith, R.A.; Heard, S.B.: Peptidyl (acyloxy)methyl ketones and the quiescent affinity label concept: the departing group as a variable structural element in the design of inactivators of cysteine proteinases. *Biochemistry* **30**, 4678-4687 (1991)

Kreil, G.; Haiml, L.; Suchanek, G.: Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase IV: Evidence for a new type of precursor--product conversion. *Eur. J. Biochem.* **111**, 49-58 (1980)

Küllertz, G.; Fischer, G.; Barth, A.: Beiträge zum Katalysemechanismus der Dipeptidyl-Peptidase IV. *Acta biol. med. germ.* **37**, 409-420 (1978)

Kummer, J.A.; Kamp, A.M.; Citarella, F.; Horrevoets, A.J.; Hack, C.E.: Expression of human recombinant granzyme A zymogen and its activation by the cysteine proteinase cathepsin C. *J. Biol. Chem.* **271**, 9281-9286 (1996)

Kwasowski, P.; Flatt, P.R.; Bailey, C.J.; Marks, V.: Effects of fatty acid chain length and saturation on gastric inhibitory polypeptide release in obese hyperglycemic (ob/ob) mice. *Biosci. Rep.* **5**, 701-705 (1985)

Lambeir, A.M.; Borloo, M.; DeMeester, I.; Belyaev, A.; Augustyns, K.; Hendriks, D.; Scharpe, S.; Haemers, A.: Dipeptide-derived diphenyl phosphonate esters: mechanism-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Biochim. Biophys. Acta* **1290**, 76-82 (1996)

Larsen, J.; Jallad, N.; Damsbo, P.: One-week continuous infusion of GLP-1 (7-37) improves glycämic control in NIDDM. *Diabetes* **45** [Suppl 2]: 233A (1996)

Li, J.; Wilk, E.; Wilk, S.: Aminoacylpyrrolidine-2-nitriles: Potent and stable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (CD26). *Arch. Biochem. Biophys.* **323**, 148-154 (1995)

Marguet, D.; Bernard, A.-M.; Vivier, I.; Darmoul, D.; Naquet, P.; Pierres, M.: cDNA Cloning for Mouse Thymocyte-activating Molecule. *J. Biol. Chem.* **267**, 2200-2208 (1992)

Martin, M.; Huguet, J.; Centelles, J.J.; Franco, R.: Expression of Ecto-Adenosine Deaminase and CD26 in Human T Cells Triggered by the TCR-CD3 Complex. Possible Role of Adenosine Deaminase as Costimulatory Molecule. *J. Immunol.* **155**, 4630-4643 (1995)

McDonald, J.K. & Barrett, A.J.: Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography, Band 2: Exopeptidases. New York: Academic Press

McDonald, J.K. & Schwabe, C.: Intracellular exopeptidases. In: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues (Barrett, A.J., ed.). Amsterdam: North-Holland Publishing, 311-391

McDonald, J.K.; Callahan, P.X.; Ellis, S.; Smith, R.E.: Polypeptide degradation by dipeptidyl aminopeptidase I (cathepsin C) and related peptidases. In: Tissue Proteinases (Barrett, A.J. & Dingle, J.T., eds). Amsterdam: North-Holland Publishing, 69-107

Mei, J. & Erlanson-Albertsson, C.: Role of intraduodenally administered enterostatin in rats: inhibition of food. *Obesity Research* **41**, 161-165 (1996)



Mentlein, R.; Dahms, P.; Grandt, D.; Kruger, R.: Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regul. Pept.* **49**, 133-144 (1993)

Mentlein, R.; Gallwitz, B.; Schmidt, W.E.: Dipeptidyl peptidase IV hydrolyses Gastric Inhibitory Polypeptide, Glucagon-like Peptide-1 (7-36)amide, Peptide Histidine Methionin and is Responsible for their Degradation in Human Serum. *Eur. J. Biochem.* **214**, 829-835 (1993)

Misumi, Y.; Hayashi, Y.; Arakawa, F.; Ikehara, Y.: Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim. Biophys. Acta* **1131**, 333-336 (1992)

Moens, K.; Heimberg, H.; Flamenz, D.; Huypens, P.; Quartier, E.; Ling, Z.; Pipeleers, D.; Gremlich, S.; Thorens, B.; Schuit, F.: Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide I, and glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells. *Diabetes* **45**, 257-261 (1996)

Morgan, L.M.: The metabolic role of GIP: physiology and pathology, *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 585-591 (1996)

Morimoto, C.; Lord, C.I.; Zhang, C.; Duke-Cohan, J.S.; Letvin, N.L.; Schlossman, S.F.: Role of CD26/dipeptidylpeptidase IV in human immunodeficiency virus type 1 infection and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9960-9964 (1994)

Moriyama, A.; Nakanashi, M.; Takenaka, O.; Sasaki, M.: Porcine muscle endopeptidase: limited proteolysis of tryptic peptides from hemoglobin  $\beta$ -chains at prolyl and alanyl bonds. *Biochim. Biophys. Acta* **956**, 151-155 (1988)

Nathan, D.M.; Schreiber, E.; Fogel, H.; Mojsov, S.; Habener, J.F.: Insulinotropic action of glucagonlike peptide-I-(7-37) in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* **15**, 270-276 (1992)

Nauck, M.A.: Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective. *Acta Diabetol.* **35**, 117-129 (1998)

Nauck, M.A.; Heimesaat, M.M.; Orskov, C.; Holst, J.J.; Ebert, R.; Creutzfeldt, W.: Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **91**, 301-307 (1993)

Nauck, M.A.; Homberger, E.; Siegel, E.G.: Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **63**, 492-498 (1986)

Nikawa, T.; Towatari, T.; Katunuma, N.: Purification and characterization of cathepsin J from rat liver. *Eur. J. Biochem.* **204**, 381-393 (1992)

O'Dorisio, T.M.; Cataland, S.; Stevenson, M.; Mazzaferri, E.L.: Gastric inhibitory polypeptide (GIP): intestinal distribution and stimulation by amino acids and medium-chain triglycerides. *Am. J. Dig. Dis.* **21**, 761-765 (1976)

- Ohneda, A.; Koayashi, T.; Nihei, J.: Response of gastric inhibitory polypeptide to fat ingestion in normal dogs. *Reg. Pept.* **8**, 123-130 (1984)
- Ohtsuki, T.; Tsuda, H.; Morimoto, C.: Good or evil: CD26 and HIV infection, *J. Dermatol. Sci.* **22**, 152-160 (2000)
- Orskov, C.; Holst, J.J.; Nielsen, O.V.: Effect of truncated glucagon-like peptide-1 (proglucagon 78-107 amide) on endocrine secretion from pig pancreas, antrum and stomach. *Endocrinology* **123**, 2009-2013 (1988)
- Orskov, C.; Holst, J.J.; Seier-Poulsen, S.; Kirkegaard, P.: Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man. *Diabetologia* **30**, 874-881 (1987)
- Orskov, C.; Rabenhoi, L.; Wettergren, A.; Kiford, H.; Holst, J.J.: Tissue and Plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide 1 in humans. *Diabetes* **43**, 535-539 (1994)
- Orskov, C.; Tang-Christensen, N.; Holst, J. J.; Larsen, P.J.: Distribution of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and other proglucagon-derived peptides in the rat. *Diabetes* **45**, 140-146 (1996)
- Orskov, C.; Wettergren, A.; Holst, J.J.: Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes* **42**, 658-661 (1993)
- Orskov, L.; Holst, J.; Möller, J.; Orskov, C.; Möller, N.; Alberti, K.G.; Schmitz, O.: GLP-1 does not acutely affect insulin sensitivity in healthy man. *Diabetologia* **39**, 1227-1232 (1996)
- Osei, K.; Falko, J.M.; O'Dorisio, T.M.; Fields, P.G.; Bossetti, B.: Gastric inhibitory polypeptide responses and glucose turnover rates after natural meals in type II diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **62**, 325-330 (1986)
- Palmer, J.T.; Rasnick, D.; Klaus, J.L.: Reversible protease inhibitors. US-Pat. 5,776,718
- Parker J.C.; Andrews, K.M.; Rescek, D.M.; Masefski, W.; Andrews, G.C.; Contillo, L.G.; Stevenson, R.W.; Singleton, D.H.; Suleske, R.T.: Structure-function analysis of a series of glucagon-like peptide-1 analogs. *J. Peptide Res.* **52**, 398-409 (1998)
- Pauly, R.P.; Demuth, H.U.; Rosche, F.; Schmidt, J.; Heather, A.W.; Lynn, F.; McIntosh, C.H.S.; Pederson, R.A.: Improved Glucose tolerance in rats treated with the dipeptidylpeptidase IV (CD26) inhibitor Ile-thiazolidide. *Metabolism* **48**, 385-389 (1999)
- Pederson, R.A.; Buchan, A.M.; Zahedi-Asl, S.; Chan, C.B.; Brown, J.C.: Effect of jejunoileal bypass in the rat on the enteroinsular axis. *Reg. Peptides* **5**, 53-63 (1982)
- Perley, M.J.; Kipnis, D.M.: Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J. Clin. Invest.* **46**, 1954-1962 (1967)
- Phillips, M.S.; Liu, Q.Y.; Hammond, H.A.; Dugan, V.; Hey, P.J.; Caskey, C.T.; Hess, J.F.: Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat. Genet.* **13**, 18-19 (1996)

- Pliura, D.H.; Bonaventura, B.J.; Smith, R.A.; Coles, P.J.; Krantz, A.: Comparative behaviour of calpain and cathepsin B toward peptidyl acyloxymethyl ketones, sulphonium methyl ketones and other potential inhibitors of cysteine proteinases. *Biochem. J.* **288**, 759-762 (1992)
- Polak, J.M.; Bloom, S.R.; Kuzio, M.; Brown, J.C.; Pearse, A.G.E.: Cellulare localization of gastric inhibitory polypeptide in the duodenum and jejunum. *Gut* **15**, 284-288 (1973)
- Polgar, L.: Unusual Secondary Specificity of Prolyl Oligopeptidase and the Different Reactivities of Ist Two Forms toward Chared Substrates. *Biochemistry* **31**, 7729-7735 (1992)
- Pospisilik, J.A.; Hinke, S.A.; Pederson, R.A.; Hoffmann, T.; Rosche, F.; Schlenzig, D.; Glund, K.; Heiser, U.; McIntosh, C.H.; Demuth, H.U.: Metabolism of glucagon by dipeptidyl peptidase IV (CD26). *Regul. Pept.* **96**, 133-141 (2001)
- Proost, P.; De Meester, I.; Schols, D.; Struyf, S.; Lambeir, A.M.; Wuyst, A., Opdenakker, G.; De Clercq, E., Scharpe, S.; Van Damme, J.: Amino-terminal Truncation of Chemokines by CD26/Dipeptidylpeptidase IV. *J. Biol. Chem.* **273**, 7222-7227 (1998)
- Rachman, J.; Gribble, F.M.; Barrow, B.A.; Levy, J.C.; Buchanan, K.D.; Turner, R.C.: Normalization of insulin responses to glucose by overnight infusion of glucagon-like peptide 1 (7-36) amide in patients with NIDDM. *Diabetes* **45**, 1524-1530 (1996)
- Rahfeld, J.: Beiträge zur kinetischen Charakterisierung der Dipeptidyl Peptidase IV. Dissertation A, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, (1990)
- Rawlings, N.D. & Barrett, A.J.: Families of Serine Proteases. *Methods Enzymol.* **244**, 19-61 (1994)
- Rawlings, N.D.; Polgar, L.; Barrett, A.J.: A new family of serine-tyrpeptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochem. J.* **279**, 907-911 (1991)
- Reutter, W.; Baum, O.; Löster, K.; Fan, H.; Bork, J.P.; Bernt, K.; Hanski, C.; Tauber, R.: Functional aspects of the three extracellular domains of dipeptidyl peptidase IV: Characterization of glycosylation events, of the collagen-binding site and of endopeptidase activity. In: *Molecular Biology Intelligence Unit. Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) in Metabolism and Immune Response*, Fleischer B., Hrsg.: Austin, USA, 55-78 (1995)
- Richard, E.; Arredondo-Vega, F.X.; Santisteban, I.; Kelly, S.J.; Patel, D.D.; Hershfield, M.S.: The binding site of human adenosine deaminase for CD26/dipeptidyl peptidase IV: the Arg142Gln mutation impairs binding to cd26 but does not cause immune deficiency. *J. Exp. Med.* **192**, 1223-1236 (2000)
- Ritzel, R.; Schulte, M.; Porksen, N.; Nauck, M.S.; Holst, J.J.; Juhl, C.; März, W.; Schmitz, O.; Schmiegel, W.H.; Nauck, M.A.: Glucagon-like peptide 1 increases secretory burst mass of pulsatile insulin secretion in patients with type 2 diabetes and impaired glucose tolerance. *Diabetes* **50**, 776-784 (2001)
- Roberge, J.N. & Brubaker, P.L.: Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology* **133**, 233-240 (1993)

- Sandhu, H.; Wiesenthal, S.R.; MacDonald, P.E.; McCall, R.H.; Tchipashvili, V.; Rashid, S.; Satkunarajah, M.; Irwin, D.M.; Shi, Z.Q.; Brubaker, P.L.; Wheeter, M.B.; Vranic, M.; Efen-  
dic, S.; Giacca, A.: Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized  
dogs. *Diabetes* **48**, 1045-1053 (1999)
- Schaper, C.: Untersuchung von N-Dipeptidyl-O-(4-Nitrobenzoyl)-Hydroxylaminen als en-  
zymaktivierte Inhibitoren der Dipeptidyl-Peptidase IV, Dissertation A, Martin-Luther-  
Universität, Halle-Wittenberg (1986)
- Schechter, I. & Berger, A.: On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Bi-  
ophys. Res. Commun.* **27**, 157-162 (1967)
- Schlagenhauff, B.; Klessen, C.; Teichmann-Dörr, S.; Breuninger, H.; Rassner, G.: Demonstra-  
tion of proteases in basal cell carcinomas. A histochemical study using amino acid-4-  
methoxy-2-naphthylamides as chromogenic substrates. *Cancer* **70**, 1133-1140 (1992)
- Schmidt, J.: Investigation of the metabolism of glucose-dependent insulinotropic polypeptide  
(GIP) by dipeptidyl peptidase IV (DPIV). *B. I. F. FUTURA* **12**, 228-232 (1997)
- Schols, D.; Proost, P.; Struyf, S.; Wuyts, A.; DeMeester, I.; Scharpe, S.; VanDamme, J.; DeC-  
lercq, E.: CD26-Processed RANTES(3-68), but not intact RANTES, has potent anti-HIV-1  
activity. *Antiviral Research* **39**, 175-187 (1998)
- Schulz, T.B.; Jorde, R.; Burhol, P.G.: Gastric inhibitory polypeptide release into the portal  
vein in response to intraduodenal amino acid loads in anesthetized rats. *Scand. J. Gastroente-  
rol.* **17**, 709-713 (1982)
- Shaw, E.: Cysteinyll proteinases and their selective inactivation. *Adv. Enzymol. Relat. Areas  
Mol. Biol.* **63**, 271-347 (1990)
- Shi, L.; Kam, C. M.; Powers, J. C.; Aebersold, R.; Greenberg, A. H.: Purification of three  
cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate  
and target cell interactions. *J. Exp. Med.* **176**, 1521-1529 (1992)
- Shimabukuro, M.; Koyama, K.; Lee, Y.; Unger, R.H.: Leptin- or troglitazone-induced lipope-  
nia protects islets from interleukin 1 $\beta$  cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* **100**, 1750-1754 (1997)
- Shinoda, M.; Miyazaki, A.; Toide, K.: Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-  
4819, on spatial memory and on cholinergic and peptidergic neurons in rats with ibotenate-  
induced lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav. Brain. Res.* **99**, 17-25 (1999)
- Shinoda, M.; Toide, K.; Ohsawa, I.; Kohsaka, S.: Specific inhibitor for prolyl endopeptidase  
supresses the generation of amyloid beta protein in NG108-15 cells. *Biochem. Biophys. Res.  
Com.* **235**, 641-645 (1997)
- Siegel, E.G.; Gallwitz, B.; Scharf, G.; Mentlein, R.; Morys-Wortmann, C.; Fölsch, U.R.;  
Schrezenmeir, J.; Drescher, K.; Schmidt, W.E.: Biological activity of GLP-1-analogues with  
N-terminal modifications. *Regul. Peptides* **79**, 93-102 (1999)
- Silver, J. & Laursen, R.A.: Inactivation of aminoacyl-tRNA synthetases by amino acid  
chloromethylketones., *Biochim. Biophys. Acta* **340**, 77-89 (1974)

- Smith & Williams, Introduction to the Principles of Drug Design and Action, Harwood academic publishers, 3. Aufl. (1998)
- Stano, J.; Kovacs, P.; Nemeč, P.; Neubert, K.: Dipeptidylpeptidase IV in Gerkin Seedlings *Cucumuc sativus* L. cv. Palava. *Biologia* **49**, 905-910 (1994)
- Starich, G.H.M.; Bar, R.S.; Mazzaferri, E.L.: GIP increases insulin receptor affinity and cellular sensitivity in adipocytes. *Am. J. Physiol.* **249**, 603-607 (1985)
- Stegg, C.; Hartwig, U.; Fleischer, B.: Unchanged signaling capacity of mutant CD26/dipeptidylpeptidase IV molecules devoid of enzymatic activity. *Cell. Immunol.* **164**, 311-315 (1995)
- Steinmetzer, T.: Beiträge zur Inhibierung prolinspezifischer Peptidasen, Dissertation A, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg (1990)
- Stöckel, A.: Synthese und Charakterisierung von Thioxoaminosäureamiden und bestatinanalogen Verbindungen als Inhibitoren prolinspezifischer Proteasen, Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg (1997)
- Stoffers, D.A.; Kieffer, T.J.; Hussain, M.A.; Drucker, D.J.; Bonner-Weir, S.; Habener, J.F.; Egan, J.M.: Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* **49**, 741-748 (2000)
- Stümpel, F.; Scholtka, B.; Hunger, A., Jungermann, K.: Enteric Glucagon 37 Rather Than Pancreatic Glucagon 29 Stimulates Glucose Absorption in Rat Intestine. *Gastroenterology* **115**, 1163-1171 (1998)
- Sudmeier, J.L.; Gunther, U.L.; Gutheil, W.G.; Coutts, S.J.; Snow, R.J.; Barton, R.W.; Bachovchin, W.W.: Solution structures of active and inactive forms of the DP IV (CD26) inhibitor Pro-boroPro determined by NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 12427-12438 (1994)
- Tanaka, S.; Murakami, T.; Horikawa, H.; Sugiura, M.; Kawashima, K.; Sugita, T.: Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Int. J. Immunopharmac.* **19**, 15-24 (1997)
- Tanaka, T.; Kameoka, J.; Yaron, A.; Schlossman, S.F.; Morimoto, C.: The costimulatory activity of the CD 26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4586-4590 (1993)
- Tang-Christensen, M.; Larsen, P.J.; Göke, R.; Fink-Jensen, A.; Jessop, D.S.; Möller, M.; Sheikh, S.P.: Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am. J. Physiol.* **271**, 848-856 (1996)
- Thiele, D.L. & Lipsky, P.E.: The action of leucyl-leucine methyl ester on cytotoxic lymphocytes requires uptake by a novel dipeptide-specific facilitated transport system and dipeptidyl peptidase I-mediated conversion to membranolytic products. *J. Exp. Med.* **172**, 183-194 (1990)
- Thiele, D.L.; Lipsky, P.L.; McGuire, M.J.: Dipeptidyl Peptidase-I inhibitors and uses thereof. US-Pat. 5,602,102

- Thorens, B.: Expression cloning of the pancreatic Beta cell receptor of the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8641-8645 (1992)
- Thorens, B.; Porret, A.; Bühler, L.; Deng, S.P.; Morel, P.; Widmann, C.: Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor, Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin (9-39) is an antagonist of the receptor. *Diabetes* **42**, 1678-1682 (1993)
- Tian, W.X. & Tsou, C.L.: Determination of the rate constant of enzyme modification by measuring the substrate reaction in the presence of the modifier. *Biochemistry* **21**, 1028-1032 (1982)
- Tiruppathi, C.; Miyamoto, Y.; Ganapathy, V.; Leibach, F.H.: Genetic evidence for role of DPP IV in intestinal hydrolysis and assimilation of prolyl peptides. *Am. J. Physiol.* **265**, 81-89 (1993)
- Toft-Nielsen, M.; Madsbad, S.; Holst, J.J.: Exaggerated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) could cause reactive hypoglycaemia. *Diabetologia* **41**, 1180-1186 (1998)
- Toide, K.; Shinoda, M.; Iwamoto, Y.; Fujiwara, T.; Okamiya, K.; Uemura, A.: A novel endopeptidase inhibitor, JTP-4819, with potential for treating alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* **83**, 147-151 (1997)
- Toromoto, Y.; Dang, N.H.; Vivier, E.; Tanaka, T.; Schlossman, S.F.; Morimoto, C.: Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **147**, 2514-2517 (1991)
- Tsuru, D., Yoshimoto, T., Koriyama, N., Furukawa, S.: Thiazolidine derivatives as potent inhibitors specific for prolyl endopeptidase. *J. Biochem.* **104**, 580-586 (1988)
- Unger, R.H. & Eisentraut, A.M.: Entero-insular axis. *Arch. Intern. Med.* **123**, 261-266 (1969)
- Unger, R.H.: How obesity causes diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Trends Endo. Metab.* **8**, 276-282 (1997)
- Uvnas-Moberg, K.; Eklund, M.; Hillegaard, V.; Ahlenius, S.: Improved conditioned avoidance learning by oxytocin administration in high-emotional male Sprague-Dawley rats. *Regul. Pept.* **88**, 27-32 (2000)
- Vaag, A.; Holst, J.J.; Volund, A.; Beck-Nielsen, H.: Gut incretin hormones in identical twins discordant for NIDDM: evidence for decreased GLP-1 secretion during oral glucose in NIDDM twins. *Eur. J. Endocrinol.* **135**, 425-432 (1996)
- Vella, A.; Shah, P.; Basu R.; Basu, A.; Camilleri, M.; Schwenk, F.W.; Holst, J.J.; Rizza, R.A.: Effect of glucagon-like peptide 1(7-36)amide on initial splanchnic glucose uptake and insulin action in humans with type 1 diabetes. *Diabetes* **50**, 565-572 (2001)
- Vella, A.; Shah, P.; Basu R.; Basu, A.; Holst, J.J.; Rizza, R.A.: Effect of glucagon-like peptide 1(7-36)amide on glucose effectiveness and insulin action in people with type 2 diabetes. *Diabetes* **49**, 611-619 (2000)

Viltsboll, T.; Krarup, T.; Deacon, C.F.; Madsbad, S.; Holst, J.J.: Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* **50**, 609-613 (2001A)

Viltsboll, T.; Krarup, T.; Madsbad, S.; Holst, J.J.: No reactiv hypoglycaemia in type 2 diabetic patients after subcutaneous administration of GLP-1 and intravenous glucose. *Diabet. Med.* **18**, 144-149 (2001B)

Wasada, T.; McCorkle, K.; Harris, V.; Kawai, K.: Effect of gastric inhibitory polypeptide on plasma levels of chylomicron triglycerides in dogs. *J. Clin. Invest.* **68**, 1106-1107 (1981)

Wei, Y.; Mojsov, S.: Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett.* **358**, 219-224 (1995)

Wrenger, S.; Faust, J.; Mrestani-Klaus, C.; Fengler, A.; Stöckel-Maschek, A.; Lorey, S.; Kähne, T.; Brandt, W.; Neubert, K.; Ansorge, S.; Reinhold, D.: Down-regulation of T cell activation following inhibition of dipeptidyl peptidase IV/CD26 by the N-terminal part of the thromboxane A2 receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 22180-22186 (2000)

Wrenger, S.; Hoffmann, T.; Faust, J.; Mrestani-Klaus, C.; Brandt, W.; Neubert, K.; Kraft, M.; Olek, S.; Frank, R.; Ansorge, S.; Reinhold, D.: The N-terminal structure of HIV-1 Tat is required for suppression of CD26-dependent T cell growth. *J. Biol. Chem.* **272**, 30283-30288 (1997)

Xu, G.; Stoffers, D.A.; Habener, J.F.; Bonner-Weir, S.: Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* **48**, 2270-2276 (1999)

Yaron, A. & Naider, F.: Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 31-81 (1993)

Yip, R.G. & Wolfe, M.M.: GIP biology and fat metabolism. *Life Science* **66**, 91-193 (2000)

Yoshimoto, T. & Tsuru, D.: Proline-Specific Dipeptidyl Aminopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Biochem.* **91**, 1899-1906 (1982)

Yoshimoto, T.; Kado, K.; Matsubara, F.; Koriyama, N.; Kaneto, H.; Tsuru, D.: Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *J. Pharmacobiodyn.* **10**, 730-735 (1987)

Young, A.A.; Gedulin, B.R.; Bhavsar, S.; Bodkin, N.; Jodka, C.; Hansen, B.; Denaro, M.: Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4. *Diabetes* **48**, 1026-1034 (1999)

Zevaco, C., Monnet, V., Gripon, J.C.: Intracellular X-Prolyl Dipeptidyl Peptidase from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*: Purification and Properties. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 357-366 (1990)

Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J.M.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432 (1994)

---

Zhou, Y.T.; Shimabukuro, M.; Lee, Y.; Koyama, K.; Higa, M.; Ferguson, T.; Unger, R.H.: Enhanced de novo lipogenesis in the leptin.unresponsive pancreatic islets of prediabetic Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* **47**, 1904-1908 (1998)

Zucker, L.M. & Zucker, T.F.: Fatty, a new mutation in the rat. *J. Hered.* **52**, 275-278 (1961)

Zucker, L.M. & Zucker, T.F.: Hereditary obesity in the rat associated with high serum fat and cholesterol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **110**, 165-174 (1962)

Zucker, O.M. & Antoniadou, H.N.: Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat „fatty“. *Endocrinology* **90**, 1320-1330 (1972)



## Anhang

Im folgenden sind die NMR-Daten der synthetisierten Inhibitoren aufgeführt. Für die Aufnahme der NMR-Spektren wurde TMS als Referenzsubstanz eingesetzt.

### *Boc-Ile-Pyrr*

$^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 10,78 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2$ ); 15,12 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}$ ); 23,76 und 24,52 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 25,60 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ); 27,91 ( $[\underline{\text{C}}\text{H}_3]_3\text{-C}$ ); 37,51 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ); 45,34 und 46,31 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 56,01 ( $\text{NH-CH}$ ); 78,86 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 155,60 ( $\text{CO-O}$ ); 170,74 ( $\underline{\text{C}}\text{O-CH}$ )

### *H-Ile-Pyrr \* HCl*

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 0,84 (t,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2$ , 3H); 0,92 (d,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}$ , 3H); 1,11-1,16 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ , 1H); 1,50-1,55 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ , 1H); 1,75-1,92 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ , 5H); 3,26-3,40 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 4H); 3,86-3,87 (m,  $\text{CH-CO}$ , 1H); 8,32 (s,  $\text{NH}_2$ )

### *Boc-Ile-Thia*

$^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 11,15 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2$ ); 14,48 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}$ ); 24,09 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ); 27,86 ( $[\underline{\text{C}}\text{H}_3]_3\text{-C}$ ); 29,92 ( $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 36,07 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ); 48,89 und 49,62 ( $\text{N-CH}_2\text{-S}$ ;  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 56,94 ( $\text{NH-CH}$ ); 78,81 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 155,59 ( $\text{CO-O}$ ); 167,31 ( $\underline{\text{C}}\text{O-CH}$ )

### *H-Ile-Thia \* HCl*

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 0,92 (t,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2$ , 3H); 1,08 (d,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}$ , 3H); 1,31-1,38 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ , 1H); 1,60-1,67 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ , 1H); 2,02-2,07 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ , 1H); 2,92-3,18 (m,  $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 3,56-3,71 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 4,24-4,28 (m,  $\text{NH}_2\text{-CH}$ , 1H); 4,40-4,44 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ , 1/2H); 4,67-4,69 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ , 1H); 4,90-4,92 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ , 1/2H); 8,43 (s,  $\text{NH}_2$ )

### *Boc-Ile-Aze*

$^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 10,89 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2$ ); 15,04 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}$ ); 24,25 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 26,93 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ); 28,07 ( $[\underline{\text{C}}\text{H}_3]_3\text{-C}$ ); 37,26 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ); 47,26 und 50,30 ( $\text{N-CH}_2$ ); 53,40 ( $\text{NH-CH}$ ); 79,08 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 155,46 ( $\text{CO-O}$ ); 171,88 ( $\underline{\text{C}}\text{O-CH}$ )

### *H-Ile-Aze \* HCl*

$^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 0,96 (t,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2$ , 3H); 1,06 (d,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}$ , 3H); 1,29-1,40 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ , 1H); 1,58-1,66 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ , 1H); 2,00-2,08 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ , 1H); 2,27-2,38 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 3,93-4,02 (m,  $\text{N-CH}_2$ , 2H); 4,12-4,23 (m,  $\text{N-CH}_2$ , 2H); 4,53-4,61 (m,  $\text{CH-NH}_2$ , 1H); 8,31 (s,  $\text{NH}_2$ )

### *Boc-Ile-Pip*

$^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 11,20 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2$ ); 15,64 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}$ ); 23,55 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 24,25 und 25,36 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 26,29 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ); 28,07 ( $[\underline{\text{C}}\text{H}_3]_3\text{-C}$ ); 37,32 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ); 42,92 und 44,50 ( $\text{N-CH}_2$ ); 53,99 ( $\text{NH-CH}$ ); 79,05 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 155,84 ( $\text{CO-O}$ ); 170,53 ( $\underline{\text{C}}\text{O-CH}$ )

*H-Ile-Pip \* HCl*

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 0,94 (t,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ , 3H); 1,12 (d,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ , 3H); 1,28-2,06 (m,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ , N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{-CH}$ , 9H); 3,35- 3,63 (m, N-  $\text{CH}_2$ , 4H); 4,44-4,46 (m,  $\text{CH-NH}_2$ , 1H); 8,36 (s,  $\text{NH}_2$ )

*Boc-His(Boc)-Pyrr*

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 24,15 und 25,90 (N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ); 27,78 und 28,19 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 31,93 (C- $\text{CH}_2\text{-CH}$ ); 45,82 und 46,40 (N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ); 51,65 (NH- $\text{CH-CO}$ ); 79,46 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 85,38 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 114,59 (NH- $\text{CH-C}$ ); 136,11 (N- $\text{CH-N}$ ); 139,12 (N- $\text{C-CH}_2$ ); 147,13 (O- $\text{CO-N}$ ); 155,37 (O- $\text{CO-NH}$ ); 170,12 (CH- $\text{CO-N}$ )

*H-His-Pyrr \* TFA*

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 1,76-1,87 (m, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , 4H); 3,07-3,13 (m, CH- $\text{CH}_2\text{-C}$ , 1H); 3,17-3,24 (m, CH- $\text{CH}_2\text{-C}$ , 1H); 3,28-3,40 (m, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , 4H); 3,55-3,60 (m,  $\text{CH-CH}_2\text{-C}$ , 1H); 4,36-4,39 (m,  $\text{NH}_2\text{-CH-CO}$ , 1H); 5,30-5,33 (m, NH, 1H); 7,44 (s, NH- $\text{CH-C}$ , 1H); 8,41 (s,  $\text{NH}_2$ ); 9,01 (s, N- $\text{CH-NH}$ , 1H)

*Boc-His(Boc)-Thia*

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 27,71 und 28,11 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 29,14 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$ ); 31,53 (C- $\text{CH}_2\text{-CH}$ ); 48,30 und 48,88 (N- $\text{CH}_2\text{-S}$ , N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ); 52,02 (NH- $\text{CH-CO}$ ); 79,71 und 85,58 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 114,77 (NH- $\text{CH-C}$ ); 136,42 (N- $\text{CH-NH}$ ); 138,42 (N- $\text{C-CH}_2$ ); 146,89 (O- $\text{CO-N}$ ); 155,32 (O- $\text{CO-NH}$ ); 170,18 (CH- $\text{CO-N}$ )

*H-His-Thia \* TFA*

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 3,00-3,14 (m, S- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 3,26-3,34 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}$ , 2H); 3,62-3,83 (dm, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 4,00-4,04 (m,  $\text{NH}_2\text{-CH-CO}$ , 1H); 4,39 (d, N- $\text{CH}_2\text{-S}$ , 1/2H); 4,57-4,69 (m, N- $\text{CH}_2\text{-S}$ , 1H); 4,90 (d, N- $\text{CH}_2\text{-S}$ , 1/2H); 7,47 (s, NH- $\text{CH-C}$ , 1H); 8,48 (s,  $\text{NH}_2$ ); 9,01 (s, N- $\text{CH-NH}$ , 1H);

*Boc-Glu-Pyrr*

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 23,98 und 25,90 (N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ); 27,28 (CH- $\text{CH}_2$ ); 28,00 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 29,50 ( $\text{CH}_2\text{-CO}$ ); 46,41 und 46,45 (N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ); 51,09 (CH- $\text{CH}_2$ ); 79,88 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 156,11 (CO-O); 170,55 (CO-CH); 176,71 (COOH)

*H-Glu-Pyrr \* HCl*

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 1,76-1,82 (m, CH- $\text{CH}_2$ , 2H); 1,85-1,94 (m, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , 4H); 2,37-2,45 (m,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ , 2H); 3,26-3,39 (m, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , 4H); 4,08 (t, CH- $\text{CH}_2$ , 1H); 8,6 (s,  $\text{NH}_2$ )

*Boc-Glu-Thia*

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 27,81 (N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ); 28,17 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 29,11 (CH- $\text{CH}_2$ ); 31,10 ( $\text{CH}_2\text{-CO}$ ); 48,14 und 48,85 (N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , N- $\text{CH}_2\text{-S}$ ); 51,42 (NH-CH); 80,23 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 156,09 (CO-O); 170,50 (CO-CH); 176,67 (COOH)

*H-Glu-Thia \* HCl*

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 1,88-2,01 (m,  $\text{CH}_2\text{-CH}$ , 2H); 2,34-2,48 (m,  $\text{CH}_2\text{-CO}$ , 2H); 3,01-3,16 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 3,61-3,94 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 4,22-4,29 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 1H); 4,38 (d,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ , 1/2H); 4,59 (t,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ , 1H); 4,75 (d,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ , 1/2H); 8,35 (s,  $\text{NH}_2$ )

*Boc-Pro-Pyrr*

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 23,60, 23,91 und 24,09 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , Pro  $\text{C}^\gamma$ ); 28,25 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 30,22 (Pro  $\text{C}^\beta$ ); 45,82, 45,89 und 46,02 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , Pro  $\text{C}^\delta$ ); 57,95 (Pro  $\text{C}^\alpha$ ); 79,35 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 154,65 (CO-O); 171,18 (CO-CH)

*H-Pro-Pyrr \* HCl*

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 1,82-2,24 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , Pro  $\gamma$ , 6H); 2,43-2,59 (m, Pro  $\beta$ , 2H); 3,29-3,67 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , Pro  $\delta$ , 6H); 4,50 (t, Pro  $\alpha$ , 2H)

*Boc-Pro-Thia*

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 23,4 (Pro  $\text{C}^\gamma$ ); 28,29 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 29,37 ( $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 31,33 (Pro  $\text{C}^\beta$ ); 46,54 (Pro  $\text{C}^\delta$ ); 47,8 und 48,5 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$ ,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ ); 58,16 (Pro  $\text{C}^\alpha$ ); 79,63 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 154,66 (CO-O); 171,04 (CO-CH)

*H-Pro-Thia \* HCl*

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 1,86-2,22 (m, Pro  $\gamma$ , 2H); 2,42-2,61 (m, Pro  $\beta$ , 2H); 2,99-3,23 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 3,44-3,70 (m, Pro  $\delta$ , 2H); 3,71-4,13 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 4,38-4,90 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ , Pro  $\alpha$ , 4H)

*Boc-Asn-Pyrr*

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 24,02 und 25,88 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 28,24 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 38,57 ( $\text{CH-CH}_2$ ); 46,07 und 46,55 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 49,41 ( $\text{CH-CH}_2$ ); 79,70 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 155,34 (CO-O); 170,13 (CO-CH); 172,47 (CO- $\text{NH}_2$ )

*H-Asn-Pyrr\* HCl*

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 1,80-1,92 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 4H); 2,50-2,69 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H); 3,29-3,57 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 4H); 4,22-4,37 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 1H); 7,18 (s, CO- $\text{NH}_2$ , 1H); 7,72 (s, CO- $\text{NH}_2$ , 1H); 8,28 (s, CH- $\text{NH}_2$ )

*Boc-Asn-Thia*

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 28,19 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 29,08 ( $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 38,06 ( $\text{CH-CH}_2$ ); 48,65 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 49,02 ( $\text{N-CH}_2\text{-S}$ ); 49,58 ( $\text{CH-CH}_2$ ); 79,94 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 155,17 (CO-O); 170,05 (CO-CH); 172,57 (CO- $\text{NH}_2$ )

*H-Asn-Thia \* HCl*

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 2,47-2,79 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 2H); 2,97-3,12 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 3,51-3,92 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 4,36-4,41 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 1H); 4,50-4,79 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ , 2H); 7,16 (s, CO- $\text{NH}_2$ , 1H); 7,75 (s, CO- $\text{NH}_2$ , 1H); 8,43 (s, CH- $\text{NH}_2$ )

*Boc-Asp-Pyrr*

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 24,12 und 24,87 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 28,40 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 36,33 ( $\text{CH-CH}_2$ ); 45,33 und 46,45 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 52,41 ( $\text{CH-CH}_2$ ); 79,34 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 155,52 ( $\text{CO-O}$ ); 170,44 ( $\text{CO-CH}$ ); 176,51 ( $\text{COOH}$ )

*H-Asp-Pyrr \* HCl*

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 1,80-1,91 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 4H); 2,70-2,76 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 1H); 2,82-2,88 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 1H); 3,26-3,39 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 3,44-3,50 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 1H); 3,58-3,64 (m,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 1H); 4,24 (t,  $\text{CH-CH}_2$ , 1H); 8,42 (s,  $\text{NH}_2$ )

*Boc-Asp-Thia*

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 27,69 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 28,46 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 36,81 ( $\text{CH-CH}_2$ ); 48,34 und 49,01 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ ); 52,39 ( $\text{CH-CH}_2$ ); 79,28 ( $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$ ); 155,48 ( $\text{CO-O}$ ); 170,60 ( $\text{CO-CH}$ ); 176,85 ( $\text{COOH}$ )

*H-Asp-Thia \* Thia*

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 2,71-2,75 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 1H); 2,80-2,86 (m,  $\text{CH-CH}_2$ , 1H); 3,06-3,17 (dm,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 3,61-3,93 (dm,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , 2H); 4,24 (t,  $\text{CH-CH}_2$ , 1H); 4,46 (d,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ , 1/2H); 4,61 (t,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ , 1H); 4,75 (d,  $\text{N-CH}_2\text{-S}$ , 1/2H); 8,40 (s,  $\text{NH}_2$ )

*H-Ile-CH<sub>2</sub>-Pyrr \* HBr*

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 11,56 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ); 14,78 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ); 22,82 und 23,7 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 25,39 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ); 34,79 ( $\text{CH}_3\text{-CH}$ ); 59,94 und 60,81 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 59,87 ( $\text{NH}_2\text{-CH}$ ); 66,28 ( $\text{CO-CH}_2$ ); 199,51 ( $\text{CO-CH}_2$ )

*H-Pro-CH<sub>2</sub>-Pyrr \* HBr*

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 22,90, 23,16 und 23,68 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ , Pro  $\text{C}^\delta$ ); 27,12 (Pro  $\text{C}^\gamma$ ); 44,24 und 45,19 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 53,77 (Pro  $\text{C}^\epsilon$ ); 59,14 ( $\text{CO-CH}_2$ ); 63,60 (Pro  $\text{C}^\alpha$ ); 197,82 ( $\text{CO-CH}_2$ )

*H-Glu(Gly)-Thia \* TFA*

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 27,65 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 31,16 ( $\text{CH-CH}_2$ ); 31,95 ( $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 42,07 ( $\text{NH-CH}_2\text{-CO}$ ); 49,15 und 50,01 ( $\text{N-CH}_2\text{-S}$ ;  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 168,07 ( $\text{CO-CH}$ ); 173,06 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH}$ ); 177,63 ( $\text{COOH}$ )

*H-Glu(Gly<sub>3</sub>)-Thia \* TFA*

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 27,61 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 31,22 ( $\text{CH-CH}_2$ ); 32,01 ( $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 41,27, 41,48 und 41,61 ( $\text{NH-CH}_2\text{-CO}$ ); 49,21 und 50,41 ( $\text{N-CH}_2\text{-S}$ ;  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 168,09 ( $\text{CO-CH}$ ); 170,75 und 170,98 ( $\text{Gly-CO}$ ); 173,51 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH}$ ); 177,11 ( $\text{COOH}$ )

*H-Glu(Gly<sub>5</sub>)-Thia \* TFA*

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 27,39 ( $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 30,06 ( $\text{CH-CH}_2$ ); 31,93 ( $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$ ); 41,33, 41,55, 41,97, 42,08 und 43,11 ( $\text{NH-CH}_2\text{-CO}$ ); 49,14 und 52,06 ( $\text{N-CH}_2\text{-S}$ ;  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ );

168,48 (CO-CH); 170,68, 170,74, 170,80, 170,94 und 171,05 (Gly-CO); 173,51 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH); 177,11 (COOH)

*Pro-Ile-Thia\*HCl*

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 10,87 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 15,24 (CH<sub>3</sub>-CH); 23,99 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 24,40 (Pro C<sup>γ</sup>); 30,36 (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 31,11 (Pro C<sup>β</sup>); 36,36 (CH<sub>3</sub>-CH); 46,60 (Pro C<sup>δ</sup>); 48,56 und 49,27 (N-CH<sub>2</sub>-S; N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 56,77 (Ile C<sup>α</sup>); 59,36 (Pro C<sup>α</sup>); 168,69 (Ile CO); 169,84 (Pro CO)

*Gly-Pro-Ile-Thia\*TFA*

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) = 10,87 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 15,17 (CH<sub>3</sub>-CH); 23,00 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 24,11 (Pro C<sup>γ</sup>); 29,48 (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 30,72 (Pro C<sup>β</sup>); 36,02 (CH<sub>3</sub>-CH); 45,89 (Gly C<sup>α</sup>); 46,94 (Pro C<sup>δ</sup>); 47,77 und 48,64 (N-CH<sub>2</sub>-S; N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 55,14 (Ile C<sup>α</sup>); 59,11 (Pro C<sup>α</sup>); 164,44 (Gly CO); 169,81 (Ile CO); 171,33 (Pro CO)

*Pro-Pro-Ile-Thia\*HCl*

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) = 10,84 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 15,15 (CH<sub>3</sub>-CH); 23,43 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 23,94 und 24,42 (Pro C<sup>γ</sup>); 29,01 (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 27,99 und 30,73 (Pro C<sup>β</sup>); 36,02 (CH<sub>3</sub>-CH); 45,36 und 46,49 (Pro C<sup>δ</sup>); 47,78 und 48,66 (N-CH<sub>2</sub>-S; N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 54,98 (Ile C<sup>α</sup>); 59,23 und 57,99 (Pro C<sup>α</sup>); 168,89 (Ile CO); 169,81 und 171,11 (Pro CO)

*Ile-Pro-Ile-Thia\*TFA*

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) = 10,72 und 11,08 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 14,20 und 15,17 (CH<sub>3</sub>-CH); 23,36 und 23,66 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 24,72 (Pro C<sup>γ</sup>); 30,70 (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 29,17 (Pro C<sup>β</sup>); 36,02 und 36,18 (CH<sub>3</sub>-CH); 47,58 (Pro C<sup>δ</sup>); 47,76 und 48,68 (N-CH<sub>2</sub>-S; N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 54,47 und 54,95 (Ile C<sup>α</sup>); 59,32 (Pro C<sup>α</sup>); 166,80 und 169,74 (Ile CO); 171,24 (Pro CO)

*Pyr-Ile-Thia\*HCl*

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 10,73 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 15,06 (CH<sub>3</sub>-CH); 24,03 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 25,06 (Pyr C<sup>β</sup>); 29,09 (Pyr C<sup>γ</sup>); 30,72 (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 36,00 (CH<sub>3</sub>-CH); 47,81 und 48,76 (N-CH<sub>2</sub>-S; N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 54,97 (Pyr C<sup>α</sup>); 55,19 (Ile C<sup>α</sup>); 169,77 (Ile CO); 172,70 (Pyr CO); 177,62 (NH-CO-CH<sub>2</sub>)

*Pyr-His-Thia \*2HCl*

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = ); 26,11 (Pyr C<sup>β</sup>); 29,02 (Pyr C<sup>γ</sup>); 29,93 (C-CH<sub>2</sub>-CH); 30,72 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S); 48,05 und 48,51 (N-CH<sub>2</sub>-S, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 50,05 (His C<sup>α</sup>); 55,39 (Pyr C<sup>α</sup>); 114,81 (NH-CH-C); 134,85 (N-CH-NH); 137,76 (N-C-CH<sub>2</sub>); 168,12 (His CO); 172,67 (Pyr CO); 177,55 (NH-CO-CH<sub>2</sub>)

*H-Gly-Phe-NHO-Bz\*HCl*

<sup>13</sup>C-NMR (500MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) = 38,83 (Phe C<sup>β</sup>), 46,3 (Gly C<sup>α</sup>), 52,36 (Phe C<sup>α</sup>), 126,52 (Phe C<sup>3</sup>), 126,76 (Phe C<sup>2</sup>), 128,19 (Benzoyl C<sup>3</sup>), 129,08 (Benzoyl C<sup>2</sup>), 129,21 (C-Benzoyl C<sup>4</sup>), 129,43 (Phe C<sup>4</sup>), 134,32 (Benzoyl C<sup>1</sup>), 137,21 (Phe C<sup>1</sup>), 163,83 (C=O Gly), 163,87 (C=O Benzoyl), 168,13 (C=O Phe)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ (ppm) = 2,90 und 3,31 (dd, CH<sub>2</sub> Phe<sup>β</sup>, 2H); 4,77 (t, CH Phe<sup>α</sup>, 1H); 4,75 (s, CH Gly<sup>α</sup>, 1H); 7,07 (d, NH<sub>2</sub> Gly), 7,25-8,20 (m, CH-arom, 10H); 9,08 (d, NH Phe); 12,62 (s, NHO)

## Danksagung

An erster Stelle danke ich herzlichst Herrn PD Dr. habil. H.-U. Demuth für die Überlassung des Themas, die Gewährung optimaler Arbeitsbedingungen, die ständige Bereitschaft zur Erörterung theoretischer und praktischer Probleme und sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Neubert bin ich zu großem Dank für die Bereitschaft, diese Arbeit an der MLU Halle zu betreuen, verpflichtet.

Danken möchte ich Frau Prof. Dr. Daniel, Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Giessen, für die Durchführung der Bindungsstudien am Peptidtransporter PepT1.

Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. R. A. Pederson an der University of British Columbia, Kanada, für die Gewährung der Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe die Versuche an Ratten durchführen zu können. Für die finanzielle Unterstützung dieses Aufenthalts danke ich dem DAAD.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der probiodrug GmbH für die stete Hilfsbereitschaft und die angenehme, aufmunternde Arbeitsatmosphäre. Ein besonders herzlicher Dank gilt dabei Herrn Dr. Hoffmann für die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei praktischen und theoretischen Problemen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für das Verständnis und die Unterstützung während der letzten Jahre herzlichst bedanken.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Halle (Saale), den 23. 07. 2001

## Lebenslauf

Name: Dagmar Schlenzig  
 Geburtsdatum: 14. 11. 1967  
 Geburtsort: Zittau  
 Familienstand: ledig  
 Kinder: Paul Schlenzig, 25. 06. 1993  
 Franz Schlenzig, 28. 07. 1999

### *Schulbildung*

1974-1984 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Zittau  
 1984-1986 Erweiterte Oberschule in Zittau  
 1986 Abitur

### *Studium*

1986-1991 Studium am Fachbereich Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 1991 Diplom im Fach Biochemie

### *Tätigkeiten*

08/1991-05/1993 Stipendiatin des BMFT/DECHEMA-Stipendienprogramms „Biotechnologie“  
 06/1993-09/1994 Erziehungsurlaub  
 10/1994-09/1997 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e. V., Jena, Arbeitsgruppe Wirkstoffforschung in Halle  
 seit 10/1997 wissenschaftliche Mitarbeiterin der probiodrug GmbH, Halle  
 seit 08/1999 Erziehungsurlaub