

# Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Gesamtfakultät

für Mathematik, Ingenieur- und Naturwissenschaften

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

M.Sc. Sabrina Christel Wohlfart

aus: Bensheim

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2023



Synthese und präklinische Evaluation von Peptid-Gallensäure-  
Chimären als antivirale Wirkstoffe gegen HBV/HDV

Gutachter: apl. Prof. Dr. Walter Mier

Prof. Dr. Gert Fricker



## Zusammenfassung

Hepatitis B führt zu über achthunderttausend Toten pro Jahr und stellt somit eine der bedeutendsten Erkrankungen der Menschheit dar. Mit Hepatitis D co-infizierte Patienten leiden unter der schwersten Form der Hepatitis. Hepatitis D kann jedoch seit kurzem mit dem Eintrittsinhibitor Myrcludex B (Handelsname: Hepcludex<sup>®</sup>) effizient behandelt werden. Diese nahezu nebenwirkungsfreie Therapie könnte eventuell noch weiter verbessert werden, da Myrcludex B zusätzlich zur Virusaufnahme auch die Wiederaufnahme von Gallensäuren, die eigentliche Funktion des NTCP, inhibiert.

Die Aufnahme von Hepatitis B in Hepatozyten wird über NTCP vermittelt. Da dieser Rezeptor auch Gallensäuren bindet, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Gallensäure-Peptid-Konjugate synthetisiert. Hierbei wurden monomere und dimere Gallensäuren verwendet und der Einfluss verschiedener Linker und Konformationen an der Bindestelle genauer untersucht. Die Peptidsequenz wurde vom Goldstandard Myrcludex B abgeleitet, zudem wurden weitere HBV-Genotypen charakterisiert. Um aussagekräftige Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erhalten, wurden über 165 verschiedene Peptide und Gallensäure-Peptid-Konjugate synthetisiert und im ersten Schritt auf ihre HDV-Infektionsinhibition untersucht. Die chimären Substanzen erzielten hervorragende Effizienzen. Mit HBVpreS/2-21-yK-LCA und HBVpreS/2-21-yK-DCA, den beiden besten Substanzen, werden die inhibitorischen Eigenschaften von Myrcludex B erreicht. Für das Erreichen hoher inhibitorischer Aktivitäten müssen jedoch enge strukturelle Voraussetzungen eingehalten werden, beispielsweise führt die Verwendung von D-Lysin in der Verknüpfungsstelle zu einer zehnfach verringerten Effizienz.

Da die beiden Substanzen diese Aktivität mit einer deutlich verkürzten Peptidsequenz erreichen, bieten sie, bei vereinfachtem synthetischem Zugang, großes Potential bezüglich einer Verbesserung der Pharmakokinetik. Zudem belegen physikochemische Charakterisierungen ihre generelle Eignung als Medikamente. In weiteren *in vitro*-Untersuchungen konnte eine hohe Stabilität der beiden Gallensäure-Peptid-Konjugate gezeigt werden. Zudem waren weder Cytotoxizität noch hämolytische Eigenschaften beobachtbar. Die hervorragenden Daten *in vitro* konnten mit dem Erhalt der nahezu exklusiven Anreicherung in der Leber *in vivo* bestätigt werden. Somit stellen diese Substanzen aussichtsreiche Kandidaten für die zukünftige Weiterentwicklung als Medikamente dar.

## Summary

Hepatitis B leads to over eight hundred thousand deaths per year, making it one of the most significant diseases of mankind. Patients co-infected with hepatitis D suffer from the most severe form of hepatitis. However, hepatitis D can recently be treated efficiently with the entry inhibitor Myrcludex B (trade name: Hepcludex®). This therapy, which is almost free of side effects, could possibly be improved even further, since Myrcludex B, in addition to viral uptake, also inhibits the reuptake of bile acids, the actual function of the NTCP.

The uptake of hepatitis B into hepatocytes is mediated via NTCP. Since this receptor also binds bile acids, various bile acid-peptide conjugates were synthesized in this work. Monomeric and dimeric bile acids were used and the influence of different linkers and conformations at the binding site was investigated in more detail. The peptide sequence was derived from the gold standard Myrcludex B, and additional HBV genotypes were also characterized. To obtain meaningful structure-activity relationships, at least 165 different peptides and bile acid-peptide conjugates were synthesized and evaluated for their HDV infection inhibition in the first step. The chimeric compounds achieved excellent efficiencies. With HBVpreS/2-21-yK-LCA and HBVpreS/2-21-yK-DCA, the two best compounds, the inhibitory properties of Myrcludex B are obtained. However, tight structural requirements must be met to reach high inhibitory activities; for example, the use of D-lysine in the linkage site leads to a tenfold reduction in efficiency.

Since the two substances achieve this activity with a significantly shortened peptide sequence, they offer great potential in terms of improved pharmacokinetics with simplified synthetic access. In addition, physicochemical characterizations demonstrate their general suitability as drugs. In further *in vitro* studies, a high stability of the two bile acid-peptide conjugates were shown. In addition, neither cytotoxicity nor hemolytic properties were observable. The excellent data *in vitro* was confirmed with the preservation of almost exclusive accumulation in the liver *in vivo*. Thus, these compounds represent promising candidates for future development as drugs.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Hepatitis	1
1.1.1	Hepatitis B Virus	1
1.1.2	Hepatitis D Virus	6
1.1.3	Behandlungsstrategien für Hepatitis B und D	9
1.2	Natrium-Taurocholat-Cotransportierendes-Polypeptid	11
1.3	Gallensäuren und Gallensäuresalze	14
1.4	Peptidsynthese	19
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>25</b>
3.1	Vergleich der HBV-Genotypen und der Fettsäurelänge	25
3.2	Konjugation verschiedener Gallensäurederivate zur Steigerung der HDV/HBV-Inhibition	32
3.2.1	Konjugation verschiedener Gallensäuremonomere	32
3.2.2	Betrachtung des Einflusses der Position von Myristinsäure und konjugierter Gallensäure	39
3.2.3	Untersuchung des Einflusses der Konstitution der Aminosäure an der Gallensäurekonjugationsstelle	42
3.2.4	Vergleich verschiedener Linker zwischen Peptid und Gallensäure	45
3.2.5	Cyclische Peptide mit Variation der Konjugationsstelle der Gallensäure	49
3.2.6	Synthese und Kopplung von Gallensäuredimeren	54
3.3	Physikochemische Charakterisierung	69
3.3.1	Bestimmung LogD-Wert	69
3.3.2	Bestimmung des isoelektrischen Punkts	70
3.4	Charakterisierung der Gallensäure-Peptid-Konjugate <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	72
3.4.1	Zellviabilität nach HDV-Infektionsinhibitionsassay	72
3.4.2	Hämolytische Aktivität	74
3.4.3	Stabilität in der Leber (CYP P450-Stabilität)	76
3.4.4	Serumstabilität	78
3.4.5	Vergleich der Bioverteilung verschiedener Gallensäure-Peptid-Konjugate mittels szintigraphischer Aufnahmen in SWISS-Mäusen	80
3.4.6	Szintigraphische Aufnahmen und Bioverteilungen der inhibitorisch aktivsten Gallensäure-Peptid-Konjugate im Vergleich mit Myrcludex B.	84
3.4.7	<i>In vivo</i> Stabilität in der Leber	90
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>98</b>
5.1	Material	98
5.1.1	Verbrauchsmaterialien	98
5.1.2	Chemikalien	99
5.1.3	Geräte	102
5.1.4	Tiere	104
5.1.5	Software	104
5.2	Methoden	105
5.2.1	Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc/ <i>t</i> Bu-Strategie	105

5.2.2	Synthese von Gallensäurederivaten zur Peptidmodifikation	109
5.2.3	Analytik der Gallensäurederivate	121
5.3	Physikochemische Charakterisierung	122
5.3.1	Bestimmung LogD-Wert	122
5.3.2	Bestimmung des isoelektrischen Punkts	122
5.4	<i>In vitro</i> Charakterisierung	123
5.4.1	HDV-Infektionsinhibitionsassay	123
5.4.2	Janus Green Assay	124
5.4.3	CYP P450-Stabilität	124
5.4.4	Hämolyse	125
5.4.5	Serumstabilität	125
5.5	<i>In vivo</i> Charakterisierung	126
5.5.1	Radioaktive Iodmarkierung	126
5.5.2	Szintigraphische Aufnahmen	127
5.5.3	Bioverteilungsstudien	127
5.5.4	<i>In vivo</i> Stabilität in der Leber	127
<b>6</b>	<b>Danksagung</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen, Vorträge und Poster</b>	<b>131</b>
7.1	Publikationen	131
7.2	Poster	131
7.3	Vorträge	132
7.4	Betreute Abschlussarbeiten	132
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>145</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>151</b>
<b>11</b>	<b>Anhang</b>	<b>I</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>%ID/g</b>	injizierte Dosis pro Gramm Organ
<b>Äq.</b>	Äquivalente
<b>Alloc</b>	Allyloxycarbonyl
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ASBT</b>	apikaler natriumabhängiger Gallensäuretransporter
<b>AUC</b>	Fläche unter der Kurve
<b>Bn</b>	Benzyl
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-Gruppe
<b>Bzl</b>	Benzyl-Schutzgruppe
<b>CA</b>	Cholsäure
<b>cccDNA</b>	kovalent geschlossene zirkuläre DNA
<b>CDCA</b>	Chenodesoxycholsäure
<b>COMU</b>	[(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat]
<b>C-Terminus</b>	Carboxy-Terminus
<b>CYP7A1</b>	Cholesterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase
<b>CYP27A1</b>	Sterol-27-hydroxylase
<b>CYP8B7</b>	Sterol-12 $\alpha$ -hydroxylase
<b>Dab</b>	Diaminobuttersäure
<b>Dap</b>	Diaminopropionsäure
<b>DCA</b>	Desoxycholsäure
<b>DCC</b>	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
<b>DCM</b>	Dichlormethan
<b>DIC</b>	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
<b>DIPEA</b>	<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin
<b>DMAP</b>	4-(Dimethylamino)-pyridin
<b>DMB</b>	2,4-Dimethoxybenzyl
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMF</b>	Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ECH</b>	extrazelluläre $\alpha$ -Helix
<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
<b>EE</b>	Essigsäureethylester
<b>EG</b>	Ethylenglykol
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EMA</b>	Europäische Arzneimittel-Agentur
<b>ER</b>	endoplasmatisches Retikulum

<b>EtNH</b>	Ethylendiamin
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> , US-Arzneimittelzulassungsbehörde
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum
<b>Fmoc</b>	Fluorenylmethoxycarbonyl
<b>FXR</b>	Farnesoid X Rezeptor
<b>HATU</b>	[O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat]
<b>HBeAg</b>	Hepatitis B-e Antigen
<b>HBsAg</b>	HBV-Oberflächenantigen
<b>HBTU</b>	(2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)
<b>HBIG</b>	Hepatitis B-Immunglobulin
<b>HBV</b>	Hepatitis B-Virus
<b>HBxAg</b>	Hepatitis B X-Protein
<b>HDAg</b>	Hepatitis D-Antigen
<b>HDV</b>	Hepatitis delta Virus
<b>Hex</b>	Hexan
<b>Hmb</b>	2-Hydroxy-4-methoxybenzyl
<b>HOBt</b>	1-Hydroxybenzotriazol
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>HSD3B1</b>	Hydroxy- $\Delta$ -5-Steroid-Dehydrogenase, $3\beta$ -/Steroid- $\Delta$ -Isomerase 1
<b>HSD3B7</b>	Hydroxy- $\Delta$ -5-Steroid-Dehydrogenase, $3\beta$ -/Steroid- $\Delta$ -Isomerase 7
<b>HSPG</b>	Heparansulfatproteoglykan
<b>IC<sub>50</sub></b>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
<b>ICH</b>	intrazelluläre $\alpha$ -Helix
<b>IEF</b>	Isoelektrische Fokussierung
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	Interferon $\alpha$
<b>LCA</b>	Lithocholsäure
<b>LC-MS</b>	Flüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
<b>LogD</b>	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
<b>MeCN</b>	Acetonitril
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>m/z<sub>calc</sub></b>	berechnetes Masse-zu-Ladung-Verhältnis
<b>m/z<sub>obs</sub></b>	beobachtetes Masse-zu-Ladung-Verhältnis
<b>M<sub>w</sub></b>	Molekulare Masse [g/mol]
<b>MW</b>	Mikrowelle
<b>myr</b>	Myristinsäure
<b>MyrB</b>	Myrcludex B (Hepcludex <sup>®</sup> )
<b>NADPH</b>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
<b>n.b.</b>	nicht bestimmbar

<b>NHS</b>	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
<b>NMP</b>	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
<b>NMR</b>	Kernspinresonanz
<b>NRTI</b>	Nukleosidischer reverse Transkriptase-Inhibitor
<b>NTCP</b>	Natrium-Taurocholat-Cotransportierendes-Polypeptid
<b>N-Terminus</b>	Amino-Terminus
<b>NtRTI</b>	Nukleotidischer reverse Transkriptase-Inhibitor
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
<b>Orn</b>	Ornithin
<b>Oxyrna</b>	Hydroxyiminocyanessigsäureethylester
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>pgRNA</b>	pregenomische RNA
<b>ppm</b>	<i>parts per million</i>
<b>PEG</b>	PEGyliert
<b>pI</b>	Isoelektrischer Punkt
<b>PS</b>	Polystyrol
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PyAOP</b>	(7-Azabenzotriazol-1-yl-oxy)trispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
<b>PyBOP</b>	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium- hexafluorophosphat
<b>rcDNA</b>	<i>relaxed circular DNA</i> (entspannte zirkuläre DNA)
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNP</b>	Ribonukleoprotein
<b>RP-HPLC</b>	Reverse Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SALP</b>	synthetisches Antilipopolsaccharid-Peptid
<b>SG<sub>p</sub></b>	permanente Schutzgruppe
<b>SG<sub>t</sub></b>	temporäre Schutzgruppe
<b>SLC10</b>	<i>solute carrier family 10</i>
<b>SPPS</b>	Festphasenpeptidsynthese
<b>Suc</b>	Succinyl
<b>SVP</b>	subvirale Partikel
<b><i>t</i>Bu</b>	<i>tert</i> -Butyl-Gruppe
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>THF</b>	Tetrahydrofuran
<b>TIS</b>	Triisopropylsilan
<b>TM</b>	Transmembrandomäne ( $\alpha$ -Helix)
<b>TRIAC</b>	Tiratricol
<b>Trt</b>	Trityl-Schutzgruppe

<b>TSTU</b>	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-O-uroniumtetrafluorborat
<b>UDCA</b>	Ursodesoxycholsäure
<b>VitC</b>	Vitamin C (Ascorbinsäure)
<b>WHO</b>	<i>World Health Organisation</i>

## 1 Einleitung

### 1.1 Hepatitis

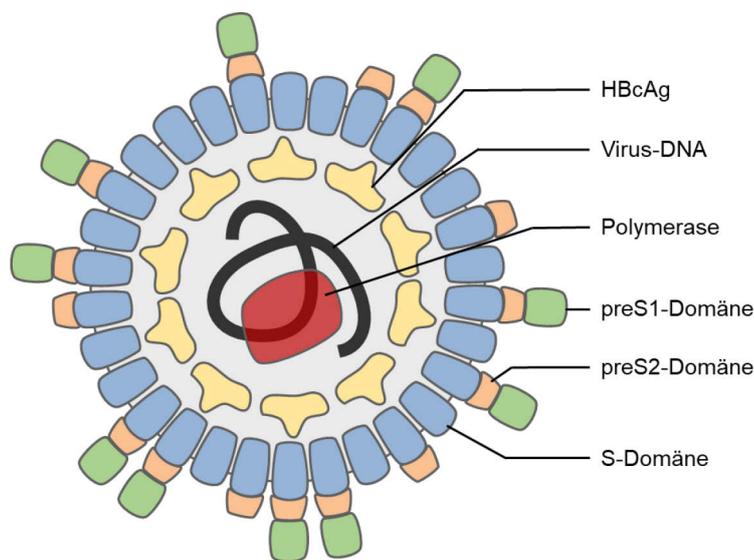
Hepatitis ist eine Entzündungsreaktion der Leber, die durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden kann. Diese sind häufig Alkoholabusus, toxische Fremdstoffe, bestimmte Medikamente oder pathologische Autoimmunreaktionen. Die häufigste Ursache ist jedoch durch eine Infektion mit hepatotropen Viren. Hierbei werden fünf Typen von Hepatitisviren unterschieden: A, B, C, D und E. Alle Virustypen verursachen Leberkrankheiten, unterscheiden sich jedoch in ihren Übertragungsarten, der Schwere der Erkrankung, der geographischen Verteilung und den Präventionsmethoden. Zudem können bei einigen Arten sowohl akute als auch chronische Krankheitsverläufe auftreten<sup>[1]</sup>.

#### 1.1.1 Hepatitis B Virus

Die *World Health Organisation* (WHO) nimmt an, dass im Jahr 2019 296 Millionen Menschen mit einer chronischen Hepatitis B-Infektion infiziert sind. Jedes Jahr werden 1,5 Millionen neue Infektionen verzeichnet. Im Jahr 2019 sind ungefähr 820000 Menschen an Leberzirrhose oder Leberzellkarzinomen, welche durch Hepatitis B hervorgerufen wurden, verstorben<sup>[2]</sup>. Hepatitis B ist somit weltweit eine der bedeutendsten Todesursachen<sup>[3]</sup>. Die Infektion mit dem Hepatitis B-Virus (HBV) ist auf unterschiedliche Weise möglich. Es ist eine perinatale oder sexuelle Übertragung, sowie eine Infektion durch den Kontakt mit infiziertem Blut möglich<sup>[4]</sup>. Diese Übertragung kann sowohl bei Drogenabhängigen, aber auch bei Mitarbeitern in medizinischen Berufen stattfinden, was oftmals zu einer unerkannten Verbreitung des Virus führt<sup>[1]</sup>. Die Verläufe einer HBV-Infektion sind komplex. Während eine chronische Hepatitis B-Infektion häufiger aus akuten Krankheiten bei Kindern entsteht, kann sie auch bei Personen, die unter anderen chronischen Krankheiten leiden, ausgebildet werden<sup>[5-6]</sup>.

HBV zählt zur Familie der *Hepadnaviridae* und hat eine Größe von lediglich 42 nm. Der infektiöse Viruspartikel besteht aus einem ikosaedrischen Nukleokapsid, aufgebaut aus 240 dimeren HBcAgs, welches die teilweise doppelsträngige Virus-DNA, mit der kovalent-gebundenen Polymerase umschließt. Das Genom besteht aus ungefähr 3200 Basenpaaren. Die Membranhülle beinhaltet drei verschiedene Membranproteine. Diese werden analog ihrer Größe als S-, M- und L- Oberflächenantigen (HBsAg) bezeichnet. Das S-HBsAg hat eine Länge von 226 Aminosäuren, es beinhaltet lediglich die S-Domäne. Beim M-HBsAg handelt es sich um insgesamt 281 Aminosäuren und es ist um die preS2-Domäne erweitert. Das L-HBsAg ist, je nach Subtyp, mit 389 bis 400 Aminosäuren das größte der Oberflächenproteine, es trägt zusätzlich die preS1-Domäne (siehe Abbildung 1.1)<sup>[7-11]</sup>. Im Jahr 1965 wurde das erste Hepatitis B Antigen von Blumberg *et al.* entdeckt

und beschrieben<sup>[12]</sup>. Der Aufbau eines Viruspartikels ist schematisch in Abbildung 1.1 gezeigt.



**Abbildung 1.1: Schematische Übersicht des Hepatitis B-Viruspartikels.** Der 42 nm große-Viruspartikel beinhaltet die Oberflächenproteine (S-, M-, L-HBsAg), die Kapsidproteine (HBcAg), sowie die teilweise doppelsträngige DNA mit kovalent-gebundener Polymerase. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[13]</sup>.

Eine Besonderheit des HBV ist die Fähigkeit der Oberflächenproteine zusätzlich nichtinfektiöse Partikel zu bilden. Hierbei können zwei Arten unterschieden werden. Zum einen die sphärischen Partikel mit einem Durchmesser von 22 nm, welche hauptsächlich aus dem M- und S-Oberflächenprotein bestehen und zum anderen filamentöse Partikel, die alle drei Oberflächenproteine beinhalten<sup>[11]</sup>.

Der HBV wird aufgrund der Genomsequenz in verschiedene Genotypen eingeteilt. Der Unterschied zwischen den Genotypen ist auf > 7,5 % Nukleotidunterschiede festgelegt. Innerhalb der einzelnen Genotypen werden weitere Subgenotypen, wovon über 30 bekannt sind, klassifiziert. Diese müssen zwei Kriterien erfüllen: Die Nukleotiddivergenz muss zwischen 4 und 7,5 % liegen und eine gute *bootstrap*-Replikation muss gegeben sein<sup>[14-15]</sup>. Insgesamt sind acht Genotypen (Genotyp A bis Genotyp H) bekannt und gut charakterisiert<sup>[3, 16]</sup>. Ein neuer Genotyp (Genotyp I) konnte mittlerweile ebenfalls nachgewiesen werden, er ist jedoch bisher weniger bedeutend<sup>[16-17]</sup>. Zudem existiert ein weiterer Genotyp (Genotyp J), der aufgrund fehlender Nachweise von Infektionen noch nicht als relevanter Genotyp anerkannt ist<sup>[18-19]</sup>. Die fünf Genotypen A bis D verursachen etwa 95 % der viralen HBV-Infektionen weltweit (siehe Tabelle 1.1)<sup>[20]</sup>.

**Tabelle 1.1: Übersicht der prozentualen Anteile viraler HBV Infektionen im Zusammenhang mit den verschiedenen Genotypen.** Die zugrundeliegenden Daten wurden entnommen aus<sup>[20]</sup>.

Genotyp	Prozent
Genotyp A	16,9
Genotyp B	13,5
Genotyp C	26,1
Genotyp D	22,1
Genotyp E	17,6
Genotyp F	0,86
Genotyp G	0,04
Genotyp H	0,07
Genotyp I	0,32

Die Art des Genotyps bei der viralen HBV-Erkrankung hat einen Einfluss auf die Therapierbarkeit und die Schwere des Verlaufs. Sie ist zudem ein Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen HBV-Erkrankung<sup>[21-22]</sup>. Zudem ist eine Co-Infektion mit verschiedenen Genotypen möglich, sie wird bei ungefähr 10 % der Infizierten beobachtet<sup>[23-24]</sup>.

Für jeden Genotyp kann eine charakteristische geographische Verteilung beobachtet werden<sup>[15, 20]</sup>. Genotyp A ist weltweit vorzufinden, die Hauptinfektionen sind jedoch in Nord-West-Europa, Nordamerika und Zentralafrika zu beobachten<sup>[15, 20, 25]</sup>. Ebenfalls weltweit verbreitet ist Genotyp D. Seine Hauptausbreitungsgebiete sind der mittlere Osten, Nordafrika, Europa (Mittelmeerraum) und Asien<sup>[15, 20]</sup>. Genotyp B ist in Asien und Nordamerika verbreitet<sup>[25-27]</sup>. In Ostasien, also in Korea, China, Japan, Thailand und Vietnam, ist überwiegend der Genotyp C vorhanden<sup>[24, 26]</sup>. Genotyp E ist hauptsächlich auf dem afrikanischen Kontinent aber auch in Europa und der arabischen Halbinsel existent<sup>[15, 20]</sup>. Amerika und Polynesien sind das Ausbreitungsgebiet des Genotyps F<sup>[28]</sup>. Genotyp G war zunächst auf Mitteleuropa und die USA beschränkt, konnte mittlerweile aber auch in Nordamerika und Asien nachgewiesen werden<sup>[24, 28-29]</sup>. In Zentral- und Südamerika ist Genotyp H verbreitet<sup>[15, 30]</sup>. Genotyp I konnte bisher ausschließlich in Südostasien isoliert werden<sup>[17, 27]</sup>.

Ein Sequenzvergleich der verschiedenen Genotypen und der daraus für Myrcludex B abgeleiteten consensus-Sequenz ist für den Bereich HBVpreS/2-21 in Abbildung 1.2 dargestellt.

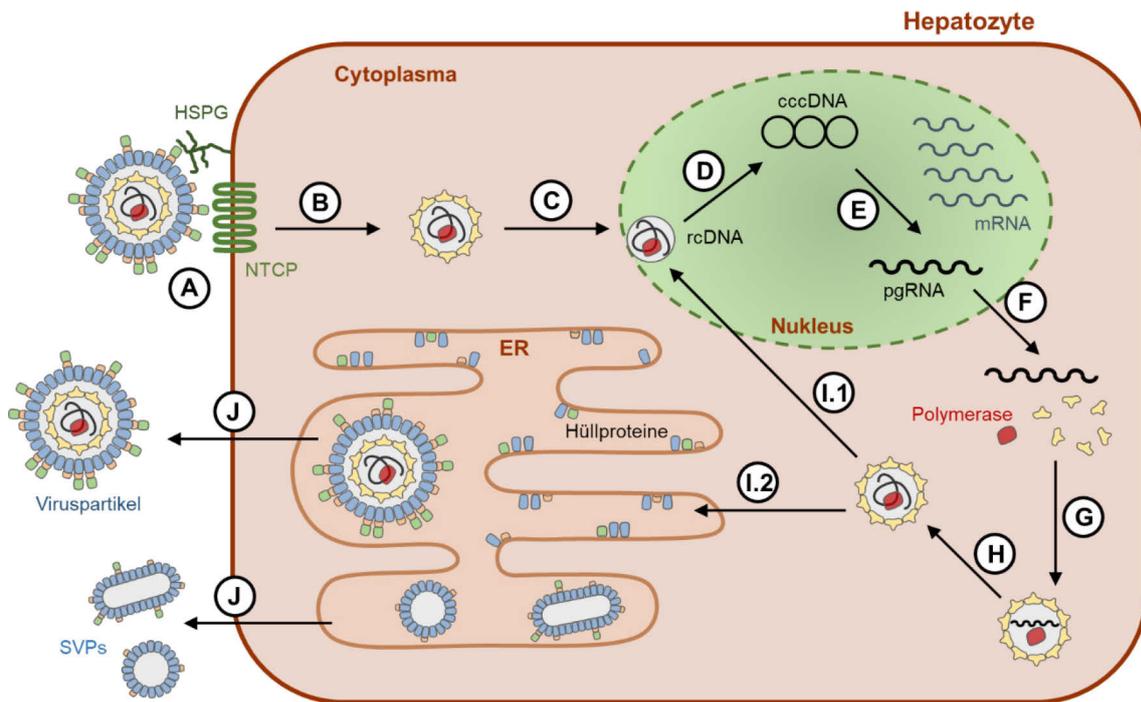
	-11	2	21
Genotyp A	-----	GTNLSVP <b>NPLGFFP</b>	DHQLDP
Genotyp B	GGWSSKPRKGMG	TNLSVP <b>NPLGFFP</b>	DHQLDP
Genotyp C	-----	GTNLSVP <b>NPLGFFP</b>	DHQLDP
Genotyp D	-----	GQNLS <b>TS</b> NPLGFFP	DHQLDP
Genotyp E	-----	GKNIS <b>TT</b> NPLGFFP	DHQLDP
Genotyp F	-----	GQNLSVP <b>NPLGFFP</b>	DHQLDP
Genotyp G	-----	GKNLS <b>AS</b> NPLG <b>FL</b> P	DHQLDP
Genotyp H	-----	GQNLSVP <b>NPLGFFP</b>	DHQLDP
Genotyp I	-----	GTNLSVP <b>NPLG<b>FL</b>P</b>	DHQLDP
Genotyp J	-----	GANLSVP <b>NPLGFF<b>PE</b></b>	DHQLDP
consensus	-----	GTNLSVP <b>NPLGFFP</b>	DHQLDP

**Abbildung 1.2: Sequenzalignement der verschiedenen HBV-Genotypen.** Die für die Bindung an Hepatozyten essentiellen Aminosäuren sind fett hervorgehoben. Positionen, an denen Sequenzunterschiede vorkommen, sind orange hinterlegt.

Die für die Bindung an Hepatozyten essentielle Domäne, also das Pharmakophor, besteht aus den Aminosäuren 9 bis 15 (Abbildung 1.2, fett)<sup>[31]</sup>. Dieser Bereich ist in allen Genotypen hochkonserviert. Lediglich bei zwei Genotypen (Genotyp G und I) ist hier eine Aminosäure-Substitution an Position 14 zu beobachten. Im Allgemeinen ist die Überschneidung der Sequenzen der Genotypen im gezeigten Bereich groß, teilweise sind sie sogar identisch. Weitere Unterschiede der Aminosäuren sind lediglich an Position 3 und Position 7/8 zu erkennen. Im zuletzt charakterisierten Genotyp J ist eine weitere Substitution an Position 16 aufgetreten, welche in den anderen Genotypen zuvor noch nicht beobachtet werden konnte.

Um effektive Behandlungsstrategien gegen HBV entwickeln zu können, ist die Kenntnis der zellulären Mechanismen, wie dem Replikationszyklus essentiell. Dieser beginnt mit der Interaktion der Viruspartikel mit Heparansulfatproteoglykanen (HSPGs) auf der Zelloberfläche der Leberzellen<sup>[32]</sup>. Es kann hierbei von einer niedrig affinen Bindung der HSPGs mit dem Viruspartikel gesprochen werden, welche durch Van-der-Waals-Kräfte hervorgerufen wird<sup>[33]</sup>. Diese Bindung wird durch die N-terminale Myristinsäure der Virussequenz unterstützt<sup>[32, 34]</sup>. Die folgende, durch die vorangegangene Interaktion katalysierte, spezifische Bindung an das Natrium-Taurocholat-Cotransportierende-Polypeptid (NTCP) findet mit hoher Affinität statt<sup>[33, 35]</sup>. Hierdurch kommt es zur Aufnahme des Virus in die Zelle<sup>[36]</sup>. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt<sup>[36-37]</sup>. Im Cytoplasma erfolgt anschließend die Freisetzung des viralen Nukleocapsids, welches die entspannte zirkuläre, teilweise doppelsträngige, DNA (rcDNA) enthält. Das Nukleocapsid wird entlang der Mikrotubuli transportiert und durch Akkumulation erfolgt die Freisetzung der rcDNA im Nukleus<sup>[32]</sup>. Im Folgenden wird die

kovalent geschlossene zirkuläre DNA (cccDNA) durch vollständige Reparatur der vier Stränge der rcDNA gebildet<sup>[32, 38]</sup>. Die cccDNA ist die Vorlage für alle viralen Transkripte von HBV und dadurch für die Chronizität verantwortlich<sup>[39]</sup>. Durch Transkription der cccDNA wird nun zum einen die pregenomische DNA (pgDNA) und zum anderen verschiedene subgenomische RNAs gebildet, die alle viralen Proteine, die für den HBV-Replikationszyklus benötigt werden, codieren<sup>[40-41]</sup>. An der Regulation der Transkription sind sowohl Wirtstranskriptionsfaktoren, als auch virale Proteine beteiligt und modulieren dadurch die virale Genexpression durch die Interaktion mit den viralen Promotoren der vier überlappenden offenen Leserastern (ORFs): 1. das *Core*-Gen, welches für das Nukleocapsidprotein (HBcAg) und das nicht strukturelle, sekretierte Protein HBeAg codiert (ORF-C), 2. das Polymerase-Gen, welches die reverse Transkriptase, RNase H und terminale Proteindomänen codiert (ORF-P), 3. das S-Gen, welches die viralen Oberflächenproteine codiert (ORF-S), 4. das X-Gen, welches das regulatorische X-Protein (HBxAg) codiert (ORF-X)<sup>[8, 32]</sup>. Nach der Transkription erfolgt die Freisetzung ins Cytosol. Dort erfolgt die Komplexbildung zwischen pgRNA und viraler Polymerase zu einem RNA-beinhaltetem Nukleocapsid. Anschließend erfolgt die Reifung des RNA-Nukleocapsids durch reverse Transkription<sup>[32, 40-41]</sup>. Das gereifte Nukleocapsid kann nun zum einen in den Nukleus reimportiert werden, wodurch die cccDNA weiter vermehrt werden kann. Zum anderen findet eine Umhüllung zur anschließenden Sekretion statt<sup>[32]</sup>. Hierzu werden die Hüllproteine co-translational ins endoplasmatische Retikulum (ER) inseriert. Im ER werden nun einerseits die gereiften RNA-Nukleocapside umhüllt, wodurch infektiöse Viruspartikel, auch Dane-Partikel genannt, gebildet werden. Andererseits werden subvirale sphärische oder filamentöse Partikel (SVPs) gebildet<sup>[32]</sup>. SVPs und infektiöse Viruspartikel werden anschließend durch Exocytose freigesetzt, wobei ein deutlicher Überschuss an SVPs vorliegt<sup>[40, 42]</sup>. Dieses Phänomen ist spezifisch für HBV und Grundlage der verschiedenen Impfstoffe<sup>[40]</sup>. Der Vorgang des HBV-Replikationszyklus ist in Abbildung 1.3 vereinfacht dargestellt.

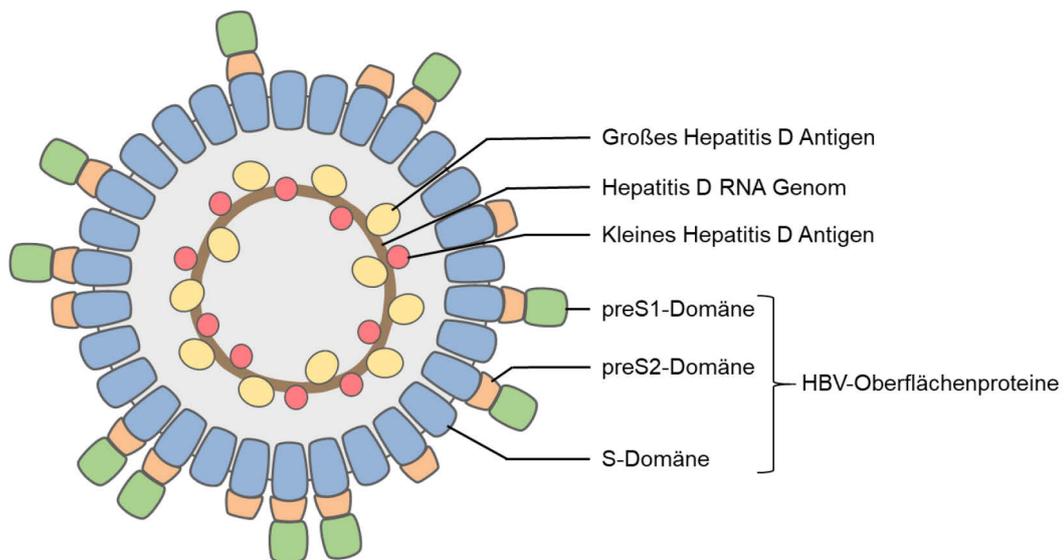


**Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung des Replikationszyklus von HBV.** (A) Bindung des Viruspartikels an HSPG und NTCP und Eintritt in die Zelle. (B) Freisetzung des Nucleocapsids im Cytoplasma. (C) Transport des Nucleocapsids zum Nucleus, dort Freisetzung der rcDNA in den Nucleus. (D) Bildung der cccDNA aus der rcDNA durch Reparaturmechanismen. (E) Transkription der viralen RNA. (F) Freisetzung der pgRNA ins Cytosol. (G) Komplexbildung von pgRNA und viraler Polymerase zu RNA-beinhaltetem-Nucleocapsid. (H) Reifung des RNA-Nucleocapsids durch reverse Transkription. (I1) Reimport des Nucleocapsids in den Nucleus. (I2) Import in ER und Umhüllung des Nucleocapsids durch co-translational eingeführte Hüllproteine. Hierbei werden aufgrund des Überschusses an Hüllproteinen ebenfalls SVPs gebildet, die kein Virusgenom beinhalten. (J) Sekretion der Viruspartikel und SVPs durch Exozytose. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[32-33, 39, 43]</sup>.

### 1.1.2 Hepatitis D Virus

Eine Erkrankung mit Hepatitis D (HDV) kann nur bei bereits bestehender HBV-Erkrankung eintreten. Es wird hierbei von einer Co-Infektion gesprochen. Die HDV-Infektion ist die schwerste Form einer Erkrankung an viraler Hepatitis<sup>[44]</sup>. Weltweit sind 12 bis 72 Millionen Menschen betroffen<sup>[45]</sup>.

Das HDV wurde Mitte der 1970er Jahre von Mario Rizzetto, einem italienischen Arzt, entdeckt. Es wird dem *Deltavirus Genus* zugeordnet<sup>[46-47]</sup>. Es handelt sich hierbei um einen defekten Satelliten-Virus, welcher keine eigene Hülle produzieren kann. Für eine Infektion wird die Hülle des HBV benötigt<sup>[47-48]</sup>. Mit einer Größe von 36 nm und einem offenen Leseraster stellt dieser Virus eine Besonderheit dar. Seine Struktur ähnelt hierbei der von Pflanzenpathogenen, im Gegensatz zu diesen codiert der HDV jedoch ein Protein<sup>[47, 49]</sup>. Aus dem offenen Leseraster gehen das kleine und das große Hepatitis D-Antigen (HDAg) hervor. Diese bilden zusammen mit dem RNA-Genom, welches einzelsträngig und zirkulär ist, ein Ribonukleoprotein (RNP), welches anschließend in die HBV-Hülle eingeschlossen wird<sup>[50]</sup>. Der Aufbau eines Viruspartikels ist schematisch in Abbildung 1.4 gezeigt.

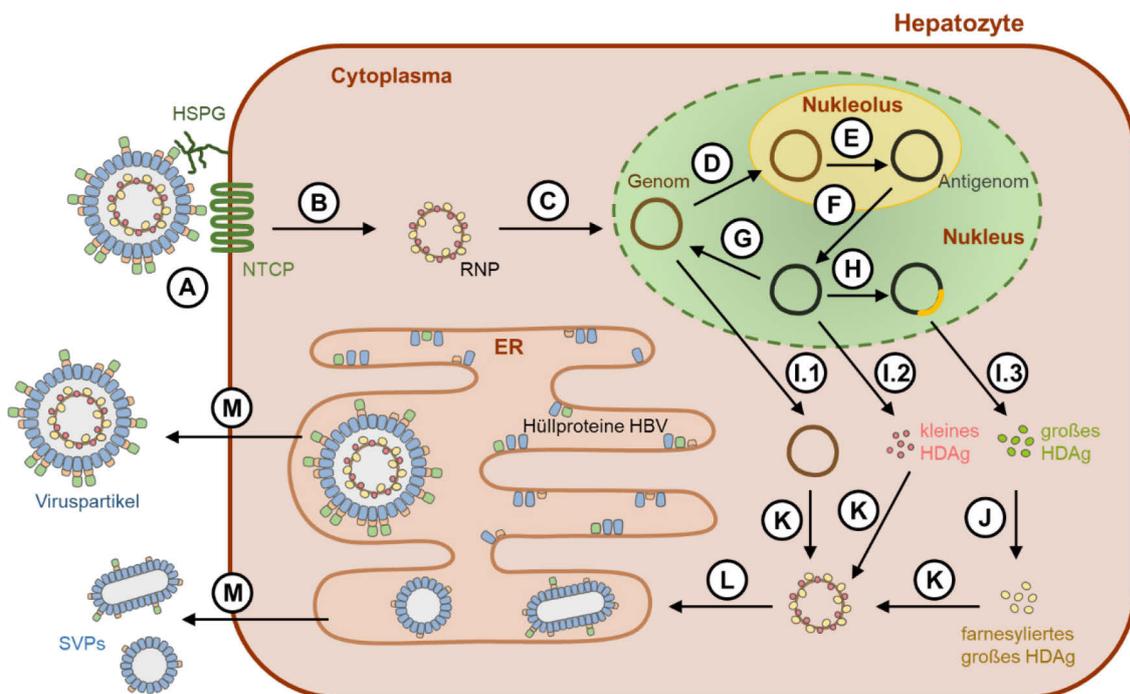


**Abbildung 1.4: Aufbau eines HDV-Partikels.** Das große und das kleine HDAg binden an das RNA-Genom von Hepatitis D und bilden so ein Ribonukleoprotein. Dieses wird in die virale Hülle des HBV verpackt, welche die HBsAgs trägt. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[13]</sup>.

Nach heutigem Stand sind acht HDV Genotypen (HDV-1 bis HDV-8) bekannt. Diese zeigen eine größere Variation in der Nukleotidsequenz als die HBV-Genotypen. Wie auch bei HBV gibt es Unterschiede im geographischen Vorkommen<sup>[47]</sup>. Der einzige weltweit vorkommende Genotyp ist HDV-1. Dieser betrifft auch den größten Anteil der Infizierten<sup>[51]</sup>. Die Genotypen HDV-2 und HDV-4 sind vor allem in Ostasien (Russland, Japan und Taiwan) verbreitet<sup>[52-54]</sup>. Auf dem afrikanischen Kontinent sind hauptsächlich die Genotypen HDV-5 bis HDV-8 vorzufinden<sup>[55-58]</sup>. Im Norden von Südamerika, der Amazonasregion von Brasilien, Peru, Kolumbien und Venezuela ist der Genotyp HDV-3 endemisch<sup>[59-62]</sup>. Der afrikanische Genotyp (HDV-8) konnte in dieser Region ebenfalls nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die Einführung dieses Genotyps durch die Sklaven, welche im 16. bis 18. Jahrhundert von Afrika nach Brasilien kamen, geschehen ist<sup>[63]</sup>. Unterschiede der verschiedenen Genotypen sind ebenfalls im Krankheitsverlauf und der Therapierbarkeit gegeben. Patienten, die mit HDV-1 infiziert sind, leiden häufig unter einem schweren Verlauf, während dagegen bei HDV-5-Infizierten meist ein milder Verlauf mit guter Therapierbarkeit eintritt<sup>[64]</sup>.

Der Replikationszyklus beginnt bei HDV, wie auch bei HBV, mit der Wechselwirkung der HBsAg der Virushülle mit HSPG auf der Zelloberfläche und dem Eintritt des Viruspartikels über NTCP in die Hepatozyte<sup>[35-36]</sup>. Nach dem Eintritt trennt sich das RNP von der Virushülle und migriert aufgrund eines Kernlokalisierungssignals in den Nukleus. Hier ermöglicht das kleine HDAg die Replikation über die DNA-abhängige RNA-Polymerase<sup>[47]</sup>. Die Vermehrung des Genoms findet anschließend über einen *Rolling-Circle*-Mechanismus statt, der zur Bildung eines Multimers führt. Dieses wird anschließend durch das Ribozym des Wirts gespalten und die Monomere ligieren in ihrer zirkulären Form<sup>[65]</sup>. Hierdurch entsteht aus dem Genom, das Antigenom, wobei es sich um ein Replikationsintermediat

mit negativer Polarität handelt. Aus dem Antigenom wird durch erneuten *Rolling-Circle-Mechanismus* das vervielfältigte Genom gebildet<sup>[66]</sup>. Das kleine HDAg wird durch den offenen Leserahmen des Antigenoms codiert. Das Stopcodon kann jedoch von der humanen Adenosin-Desaminase I zu einem Tryptophancodon umgeschrieben werden und dadurch der offene Leserahmen um 19 Aminosäuren verlängert werden, wodurch das große HDAg translatiert wird<sup>[67]</sup>. Diese Modifikation ist essentiell für HDV, da nur so das für die Interaktion mit den Hüllproteinen benötigte große HDAg gebildet werden kann<sup>[68]</sup>. Die beiden Antigene haben verschiedene Aufgaben während des Replikationszyklus des HDV: das kleine HDAg stimuliert die Genomreplikation, das große HDAg wirkt als transdominanter Inhibitor und verstärkt die Zusammensetzung von Viruspartikeln<sup>[69-70]</sup>. Posttranslational werden die beiden viralen Antigene modifiziert und bilden ein RNP mit dem replizierten viralen Genom. Anschließend erfolgt die Umhüllung mit den Hüllproteinen des HBV (HBsAg) im endoplasmatischen Retikulum und die Sekretion des vollständig assemblierten Virus<sup>[50, 68]</sup>. Der Replikationszyklus ist in Abbildung 1.5 vereinfacht dargestellt.



**Abbildung 1.5: Vereinfachte Darstellung des Replikationszyklus von HDV.** (A) Bindung des Viruspartikels an HSPG und NTCP und Eintritt in die Zelle. (B) Freisetzung des RNP im Cytoplasma. (C) Transport des RNP zum Nucleus und Freisetzung des Genoms (D) Migration des Genoms in Nucleolus aufgrund eines Kernlokalisierungssignals. (E) Bildung des Antigenoms, ein Replikationsintermediat mit negativer Polarität. (F) Vervielfältigung des Antigenoms durch *Rolling-Circle-Mechanismus* um Nucleus. (G). Vervielfältigung des Genoms durch *Rolling-Circle-Mechanismus* aus dem Antigenom. (H) Editierung des Stopcodons zu einem Tryptophancodon durch die humane Adenosid-Desaminase I und Verlängerung des offenen Leserahmens um 19 Aminosäuren. (I.1) Transport des Genoms aus dem Nucleus ins Cytoplasma. (I.2) Codierung des kleinen HDAg aus dem Antigenom. (I.3) Codierung des großen HDAg aus dem editierten Antigenom. (J) Prenylierung des großen HDAg durch Farnesylierung. (K) Bildung des RNP aus Genom, kleinem und farnesyliertem großen HDAg. (L) Import in ER und Umhüllung des RNP durch die Hüllproteine des HBV. (M) Sekretion der Viruspartikel und SVPs durch Exozytose analog zu HBV. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[68, 71]</sup>.

Während des Replikationszyklus des HDV ist die Farnesylierung des großen HDAg essentiell für die Bindung an die Hüllproteine des HBV<sup>[72]</sup>. Im Prenylierungsschritt des großen HDAg wird ein C15-Terpen-Rest (Farnesylrest) auf das Cystein der Proteinstruktur übertragen. Die Erkennungssequenz ist hierfür das Ca1a2X-Motiv (C: Cystein, a: aliphatische Aminosäure, X: C-terminale Aminosäure)<sup>[73-74]</sup>.

### 1.1.3 Behandlungsstrategien für Hepatitis B und D

Obwohl zur Prophylaxe eine effektive Impfung gegen Hepatitis B existiert, sind vor allem die chronischen Formen von Hepatitis B und D ein unbestreitbares weltweites Gesundheitsproblem<sup>[1, 75-77]</sup>

In den meisten Fällen der aktuellen Behandlungsmöglichkeiten führt die Therapie nicht zur Heilung, sondern ausschließlich zur Reduktion der Viruslast<sup>[11, 78]</sup>. Zur Therapie von HBV und HDV sind im Grunde drei verschiedene Wirkstoffklassen zugelassen: Interferon, Virostatika und Eintrittsinhibitoren<sup>[27, 79]</sup>.

Bei der Behandlung einer chronischen Hepatitis B-Erkrankung mit Virostatika, wozu Nukleosidische (NRTI) und Nukleotidische (NtRTI) reverse Transkriptase-Inhibitoren zählen, wird lediglich die Viruslast gesenkt. Zudem besteht bei länger andauernder Therapie mit Virostatika das Problem der Ausbildung von Resistenzen, welches bei neueren Medikamenten dieser Art jedoch geringer ist<sup>[27, 78, 80-81]</sup>. Die Wirkweise dieser antiviralen Substanzen beruht darauf, dass sie während der Replikation in den DNA-Strang eingebaut werden, aber strukturell bei der Elongation der DNA mitwirken. Dies führt zum Abbruch und zur anschließenden Degradation der Virus-DNA<sup>[82-85]</sup>. Diese Wirkweise führt zu einer potenten Inhibition, da infizierte Zellen eine stark erhöhte Biosynthese aufweisen.

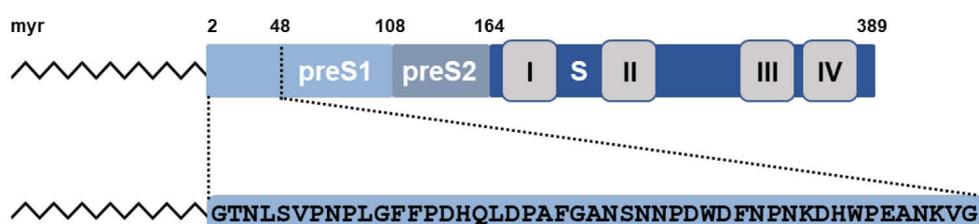
Eine andere Möglichkeit der Behandlung ist mittels Interferontherapie, wodurch die zelluläre Immunantwort gegen virale RNA moduliert wird. Die Wirkweise ist hierbei ein komplexes Zusammenspiel aus der Aktivierung natürlicher Killerzellen und der Stimulation infizierter und umliegender Zellen. Dies führt dazu, dass stärkere Nebenwirkungen auftreten können. Die Therapie mit Interferon dauert mindestens 12 Monate, da häufig erst dann eine partielle Serokonversion eintritt. Der Endpunkt der Therapie ist erst erreicht, wenn eine vollständige Serokonversion vorliegt<sup>[82, 86]</sup>.

In vielen Fällen wird standardmäßig die Kombinationstherapie verschiedener Wirkstoffe und Wirkstoffklassen angewendet<sup>[11, 78]</sup>. Einige vielversprechende Therapieoptionen, die auch andere Wirkweisen und Ziele beinhalten, befinden sich aktuell noch in klinischen Studien<sup>[87-88]</sup>. Eine Übersicht der aktuell zugelassenen Wirkstoffe gegen HBV und HDV ist in Tabelle 1.2 gezeigt.

**Tabelle 1.2: Zugelassene Therapeutika gegen HBV und HDV.** Aufgelistet ist der jeweilige Wirkstoff mit Wirkstoffklasse und Wirkort, sowie die Angabe der Zulassung gegen HBV oder HDV.

Wirkstoff	Klasse	Ziel	Einsatz
IFN- $\alpha$	Interferon	Interferonrezeptoren	HBV/HDV
PEG-IFN- $\alpha$	Interferon	Interferonrezeptoren	HBV/HDV
Lamivudin	NRTI	virale Polymerase	HBV
Tenofovir	NtRTI	virale Polymerase	HBV
Adefovir	NtRTI	virale Polymerase	HBV
Entecavir	NRTI	virale Polymerase	HBV
Telbivudin	NRTI	virale Polymerase	HBV
Bulevirtide	Eintrittsinhibitor	NTCP	HDV

Der einzige aktuell zugelassene Eintrittsinhibitor, dessen Ziel NTCP ist, ist der Wirkstoff Bulevirtide (auch Myrcludex B, Handelsname: Hepcludex®). Dieser ist bisher auch der einzige Wirkstoff in der Hepatitis D-Therapie und wurde 2020 von der EMA zugelassen<sup>[79]</sup>. Die Sequenz des N-acetylierten Lipopeptids Myrcludex B ist von der PreS1-Domäne des HBsAgs abgeleitet (siehe Abbildung 1.6). Diese bindet an NTCP und blockiert dadurch die Aufnahme von HBV und HDV in die Hepatozyten<sup>[11, 80-81, 89-90]</sup>. Der genaue Eintrittsmechanismus ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt<sup>[78]</sup>. Es ist bekannt, dass Myrcludex B neben der essentiellen Domäne, Aminosäuren 9-15 in der Sequenz, ebenso eine akzessorische Domäne im Bereich der Aminosäuren 27-48 besitzt<sup>[91-92]</sup>. Ohne die essentielle Domäne findet keine Bindung an NTCP statt. Die genaue Funktion der akzessorischen Domäne ist bisher jedoch nicht aufgeklärt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass die Bindung und Infektionsinhibition bei Vorhandensein dieser Sequenz besser ist, als ohne<sup>[91-92]</sup>.



**Abbildung 1.6: Struktur der HBsAg Domäne und der Peptidsequenz des Eintrittsinhibitors Myrcludex B.** In der S-Domäne (AS 164-389) befinden sich die vier Transmembrandomänen I-IV. Die zwischen den Transmembrandomänen II und III vorhandene Disulfidbrücke bildet die sogenannte antigene *loop*-Region, welche auf der extrazellulären Membranoberfläche lokalisiert ist. Die AS 108-164 bilden die preS2-Domäne. An die preS1-Domäne (AS 2-108) ist N-Terminal Myristinsäure konjugiert. Myrcludex B besteht aus den AS 2-48 der preS1-Domäne. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[11, 93]</sup>.

Bereits von Gripon *et al.* konnte gezeigt werden, dass von der HBVpreS1-Domäne abgeleitete, 47 Aminosäuren beinhaltende und N-Terminal acetylierte Peptide eine Inhibition der HBV-Infektion *in vitro* bewirken können<sup>[94]</sup>. 2010 wurde Myrcludex B, die

consensus-Sequenz aus acht HBV-Genotypen, entwickelt. Bei der Inhibition von HBV in HepaRG-Zellen konnte hierbei eine halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) von 0,14 nM erreicht werden<sup>[91]</sup>. Die Wirksamkeit von Myrcludex B konnte im Folgenden ebenfalls *in vivo* bestätigt werden<sup>[95]</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Anreicherung in der Leber stattfindet<sup>[96]</sup>. In verschiedenen klinischen Studien konnte die Wirksamkeit von Myrcludex B gegen HDV als Kombinationstherapie mit PEG-IFN- $\alpha$  oder Tenofovir bestätigt werden<sup>[97-99]</sup>.

In der Forschung spielen NTCP-Eintrittsinhibitoren eine große Rolle, da NTCP als Rezeptor für HBV und HDV identifiziert werden konnte (siehe Kapitel 1.2). Es werden hierbei verschiedene Substanzklassen mit unterschiedlichen Targets betrachtet. Zum einen verschiedene Antikörper, wie zum Beispiel HBIG, die mit der PreS1-Sequenz und dem S-Protein interagieren. Zum anderen werden Bindungsinhibitoren (Heparin, Suramin, SALP und weitere), die teilweise für andere Indikationen bereits zugelassen sind, untersucht. Die Targets sind vielfältig, von HSPG, über alle HBV-Oberflächenproteine und ebenso der PreS1-Sequenz<sup>[100]</sup>. In ersten präklinischen Studien konnten hier positive Ergebnisse der Inhibition des Viruseintritts gezeigt werden<sup>[101]</sup>. Ebenso werden NTCP-Substratinhibitoren und allosterische NTCP-Inhibitoren betrachtet. Auf diese wird im folgenden Kapitel (Kapitel 1.2) ausführlicher eingegangen.

Ein weiterer Angriffspunkt bei der Therapie von HDV ist der Prenylierungsschritt des großen HDAg. Wird die Farnesylierung in diesem Schritt unterbunden, kann die Anlagerung des RNP an die Hüllproteine nicht stattfinden und somit wird die Bildung von infektiösen Partikeln unterdrückt<sup>[72, 102]</sup>. Ein Farnesyltransferase-Hemmer ist zum Beispiel Lonafarnib, der in verschiedenen klinischen Phase 2 Studien auf Wirkung, Nebenwirkungen und zur Dosisfindung untersucht wurde. In einer randomisierten Machbarkeitsstudie konnte die Wirkung gegen HDV bereits gezeigt werden<sup>[103]</sup>. Hierbei wurden Monotherapien mit höheren Dosen und unter anderem Kombinationstherapien aus Ritonavir und Lonafarnib mit und ohne IFN- $\alpha$  betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass bei Behandlung mit Lonafarnib bei chronischer HDV-Erkrankung die Virusmenge reduziert und somit die Unterdrückung des Prenylierungsschrittes eine wirksame Methode zur Behandlung von HDV sein könnte<sup>[103-105]</sup>. Verschiedene weitere Studien belegen ebenfalls die Wirkung und zeigen gute Effekte bei der Kombinationstherapie<sup>[106]</sup>.

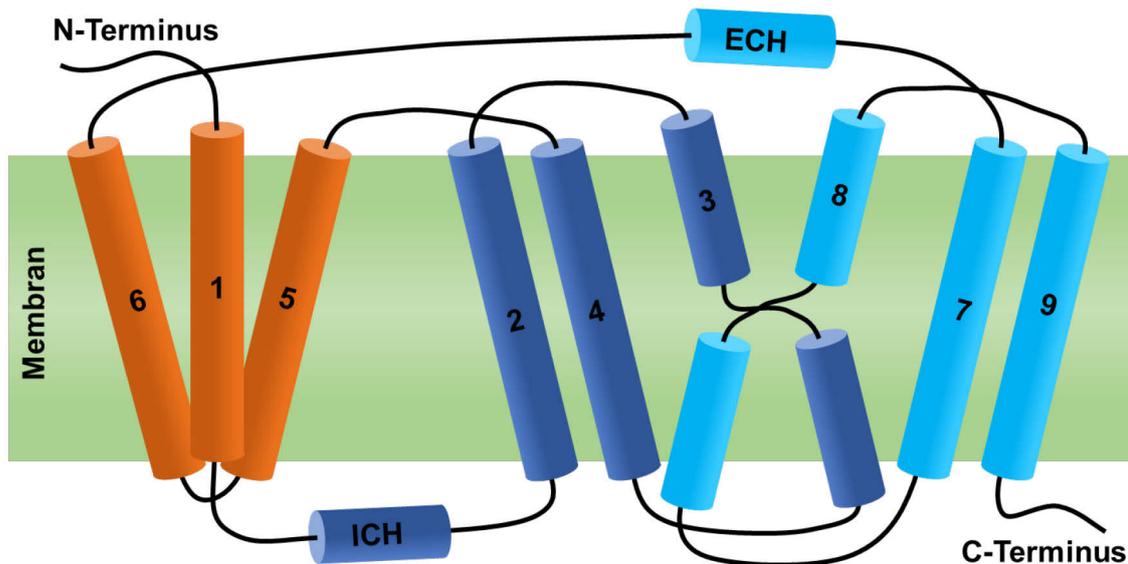
## 1.2 Natrium-Taurocholat-Cotransportierendes-Polypeptid

Das Natrium-Taurocholat-Cotransportierende-Polypeptid (NTCP) ist ein Gallensalztransporter mit Taurocholsäure als Hauptsubstrat. Es zählt zur *solute carrier family 10* (SLC10) und wird daher auch als SLC10A1 bezeichnet<sup>[107]</sup>. Das menschliche NTCP besteht aus 349 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 56 kDa<sup>[108]</sup>. Lokalisiert ist das NTCP hauptsächlich in der basolateralen Membran der Hepatozyten. Das

Transmembranprotein co-transportiert Gallensäuren mit Natriumionen aus dem Blut in Hepatozyten und ist somit in seiner Rolle entscheidend für die Aufnahme der Gallensäuren. Dadurch übt es einen Einfluss auf den enterohepatischen Kreislauf aus (siehe Kapitel 1.3)<sup>[43, 109-110]</sup>. Neben dem Transport konjugierter Gallensäuren können von NTCP auch andere Stoffe, wie Schilddrüsenhormone, Steroide, Xenobiotika oder leberspezifische Wirkstoffe in Hepatozyten aufgenommen werden<sup>[107, 111-112]</sup>.

Nachdem NTCP bereits in den 1990er Jahren als Gallensäuretransporter entdeckt wurde, war die Charakterisierung von Yan *et al.* als Rezeptor für die Aufnahme des HBV in Hepatozyten im Jahr 2012 für das Feld entscheidend<sup>[35, 113]</sup>. Dies konnte im Jahr 2014 von Ni *et al.* bestätigt und zur Erstellung verschiedener NTCP-exprimierender Zelllinien genutzt werden<sup>[36]</sup>. Somit stehen für die weitere Entwicklung stabile Zellsysteme zur Verfügung. Die Auswirkungen der Inhibition des NTCP-gesteuerten Gallensäuretransports *in vivo*, durch zum Beispiel Myrcludex B, ist bisher noch nicht bekannt, für die weitere Forschung aber von großer Bedeutung<sup>[89]</sup>. Es konnte hierbei bereits gezeigt werden, dass diese nicht vollständig unabhängig voneinander sind<sup>[36]</sup>.

Durch die enorme Weiterentwicklung der bioinformatischen Werkzeuge zur Vorhersage für Proteinstrukturen in den letzten Jahren, konnten verschiedene dreidimensionale NTCP-Strukturen erstellt und die Membrantopologie, die Konformation des Rezeptors und die Mechanismen des Gallensäuretransportes und der HBV/HDV-Bindung diskutiert werden<sup>[114-116]</sup>. Im Jahr 2022 publizierte Goutam *et al.* eine kryoelektronenmikroskopische Aufnahme des NTCP, bei dem eine NTCP consensus-Sequenz, welche eine höhere Stabilität gegenüber der Wildtyp-Sequenz aufweist, analysiert wurde<sup>[117]</sup>. Diese wurde durch den Austausch einzelner Aminosäuren erstellt und besitzt 98 % identische Aminosäuren im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz. Durch diese Aufnahmen war es möglich, eine der vorhergesagten Struktureigenschaften zu bestätigen und genauer aufzuklären. Der NTCP besteht aus neun transmembranen  $\alpha$ -Helizes (TM1-TM9). Diese werden durch eine extrazelluläre  $\alpha$ -Helix (ECH) und eine intrazelluläre  $\alpha$ -Helix (ICH) verknüpft, die annähernd parallel zur Zellmembran sind. Zudem gibt es einen unstrukturierten extrazellulären Amino- und einen intrazellulären Carboxy-Terminus. Im Allgemeinen sind die Transmembrandomänen in zwei strukturelle Domänen aufgeteilt. TM1, TM5 und TM6 bilden hierbei die Panel-Domäne. Die Kerndomäne besteht aus zwei Helixbündeln (TM2-TM4 und TM7-TM9), die eine pseudo-zweidimensionale Symmetrie aufweisen. Die Mitte bilden hierbei TM3 und TM8, die aneinander gewunden sind und eine charakteristische X-Struktur ausbilden<sup>[117]</sup>. Die Topologie von NTCP ist schematisch in **Abbildung 1.7** dargestellt.

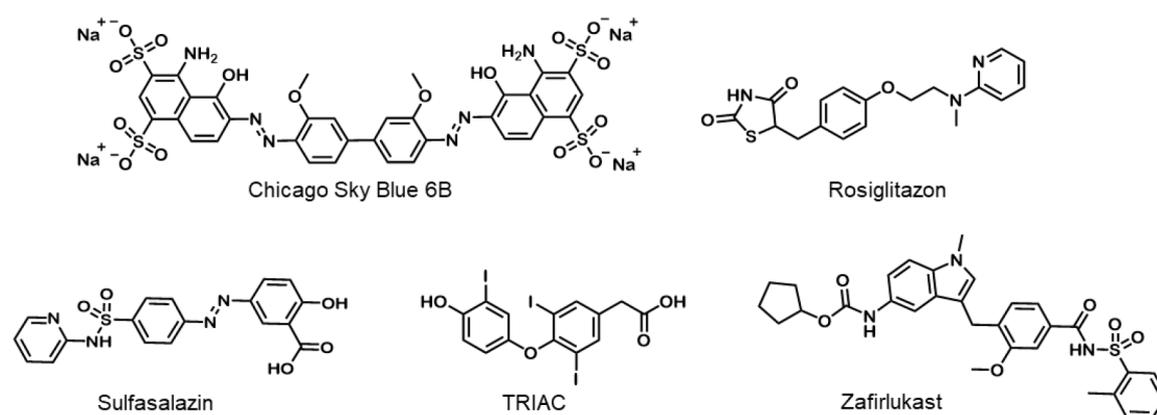


**Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Membrantopologie des NTCP.** Die Panel-Domäne bestehend aus TM1, TM5 und TM6 ist in orange dargestellt, die beiden Helixbündel der Kerndomäne mit pseudo-zweidimensionaler Symmetrie in dunkelblau (TM2-TM4) und hellblau (TM7-TM9). Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[117]</sup>.

Die Bindestellen, die vermutlich für die Bindung von Natrium verantwortlich sind, befinden sich alle innerhalb der Kerndomäne (Na1: S105, N106, T123 und E257; Na2: Q68 und Q261)<sup>[117]</sup>. Dies konnte bereits in Kristallstrukturen von prokaryotischen SLC10-Homologen gezeigt werden<sup>[118]</sup>. Anhand der Daten verschiedener struktureller Darstellungen und NTCP-Mutagenese wird vermutet, dass diese beiden Natrium-Ionen am Gallensäuretransport beteiligt sind. Ebenso wird angenommen, dass das über alle Spezies hochkonservierte Serin (S267) für die Gallensäurebindung verantwortlich ist, da gezeigt werden konnte, dass eine Mutation an dieser Position zur Inaktivierung von NTCP führt<sup>[117, 119]</sup>. Die kritische Region für die Bindung des HBV-Bindungsmotifs liegt innerhalb der Panel-Domäne. Es handelt sich hierbei um die Aminosäuren 157-165 (Sequenz: KGIVISLVL), die sich in TM5 befinden. Unterstützt wird die Bindung vermutlich von dem extrazellulären Bereich der Aminosäuren 84-87 (Sequenz: RLKN)<sup>[117, 119-120]</sup>.

NTCP ist ein therapeutisches Zielmolekül bei HBV- und HDV-Infektionen. Zur Erstellung von Pharmakophoren waren Gallensäuren zunächst naheliegende Substrate für ein *in silico*-Design. Durch Screening und Modeling konnten Greupnik *et al.* mögliche Pharmakophoreigenschaften identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass in ihrem Modell ein mögliches Pharmakophor aus drei hydrophoben Bereichen und zwei Wasserstoffbrücken-Akzeptoren besteht, welche in ausreichendem Abstand zueinander verknüpft sind und eine negative Ladung aufweisen<sup>[121]</sup>. In einer anderen *in silico* Studie von Dong *et al.* wurde in einem Screening von in verschiedenen therapeutischen Bereichen von der FDA zugelassene Medikamente nach Inhibitoren für NTCP gesucht und diese anschließend weiter charakterisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass zwei hydrophobe Bereiche und ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor benötigt wird, was zum Teil

mit den zuvor gezeigten Ergebnissen übereinstimmt, jedoch konnte die Notwendigkeit der negativen Ladung nicht bestätigt werden<sup>[122]</sup>. Zusammenfassend konnten durch *in silico*-Studien frühzeitig wichtige Hinweise auf für die Inhibition benötigte Strukturelemente aufgezeigt werden. Einige bereits zugelassene Medikamente, die eine NTCP-Inhibition vollziehen, konnten identifiziert werden<sup>[123]</sup>. Im Jahr 2017 wurde ein funktionelles Screening von 1280 von FDA und EMA zugelassener Substanzen, zum einen auf Inhibition der Gallensäure-Aufnahme und zum anderen auf vorhandene Wechselwirkung mit Myrcludex B um die Bindestelle an NTCP, durchgeführt. Hierbei konnten von Donkers *et al.* fünf potentielle NTCP-Inhibitoren, die *in vitro* eine IC<sub>50</sub> kleiner 10 µM aufweisen, aufgezeigt werden<sup>[124]</sup>. Diese fünf Kandidaten sind: Chicago Sky Blue 6B, Rosiglitazon, Sulfasalazin, TRIAC und Zafirlukast, gezeigt in Abbildung 1.8.



**Abbildung 1.8:** Darstellung der von Donkers *et al.* über funktionelles Screening identifizierten NTCP-Inhibitoren aus 1280 von FDA und EMA für andere Indikationen zugelassenen Medikamenten<sup>[124]</sup>.

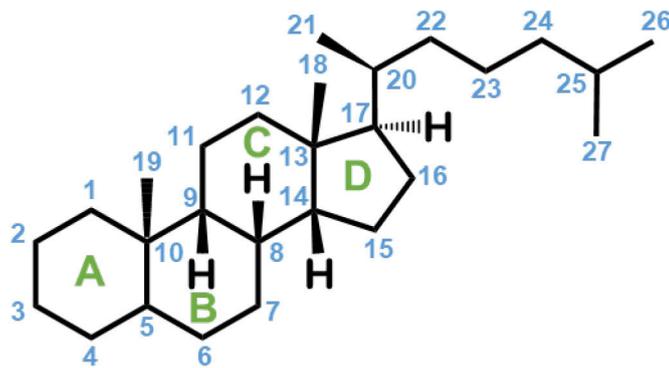
Es ist davon auszugehen, dass hierbei aufgrund der unterschiedlichen Struktur der Substanzen sowohl kompetitive als auch nicht-kompetitive Inhibitoren aufgezeigt werden. Die Gemeinsamkeit aller sind die aromatischen Ringsysteme und eine große Anzahl an Heteroatomen. Die Identifikation dieser *small molecule* NTCP-Inhibitoren ist für die weitere Entwicklung von HBV/HDV-Inhibitoren essentiell<sup>[124]</sup>.

Weitere potentielle HBV/HDV-Inhibitoren, die mit NTCP interagieren, sind Gallensäuredimere unterschiedlicher Verknüpfungsart. Dies konnte von Liu *et al.* gezeigt werden, die verschiedene Gallensäuredimere auf ihre HBV-Inhibition, sowie ihre Bindung an NTCP untersucht haben<sup>[125]</sup>.

### 1.3 Gallensäuren und Gallensäuresalze

Im Allgemeinen handelt es sich bei Gallensäuren, wie auch bei Steroiden, um die wichtigsten Cholesterolderivate<sup>[126]</sup>. In Säugetieren sind alle Gallensäuren C<sub>24</sub>-5β-Gallensäuren, also Cholansäuren<sup>[127]</sup>. Ihr Grundgerüst wird, wie in Abbildung 1.9 gezeigt, aus drei Hexan- (A bis C) und einem Pentanring (D) aufgebaut, die direkt miteinander

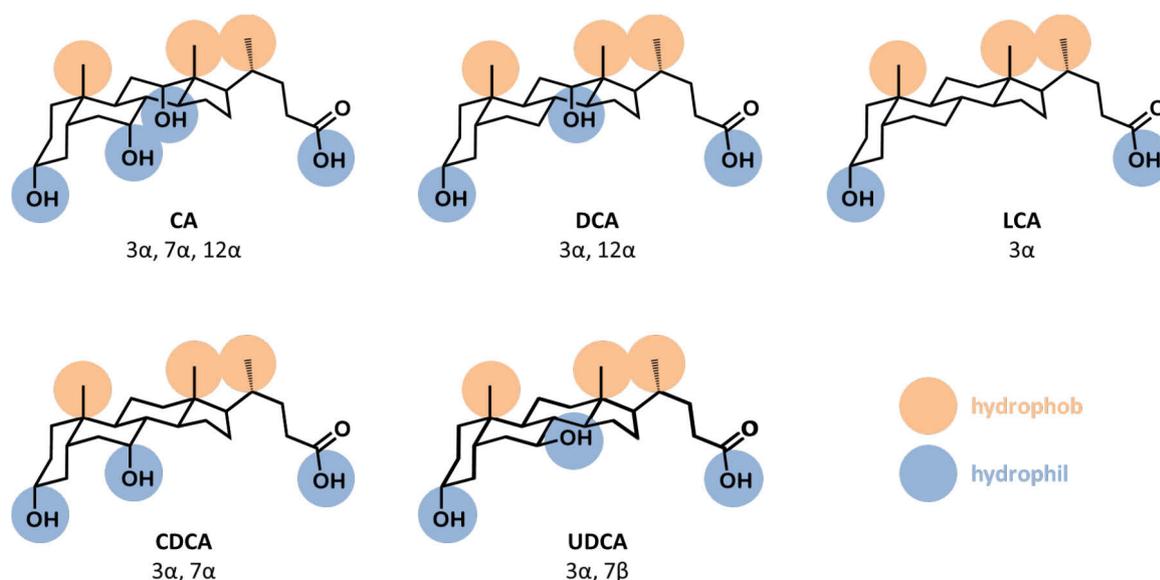
verknüpft sind. Weiterhin ist bei jeder Gallensäure eine Pentanseitenkette an Ring D vorzufinden<sup>[127-128]</sup>. Die Unterschiede der verschiedenen Gallensäuren bestehen in verschiedener Anzahl und Stereochemie der Hydroxy-Gruppen an den Positionen 3, 6, 7 und 12<sup>[128-130]</sup>. Diese sind ebenfalls verantwortlich für die Löslichkeit. Hierbei führt vor allem eine Hydroxylierung an Position 7 $\beta$  oder 6  $\alpha/\beta$  zu einer signifikanten Steigerung, weshalb UDCA die am besten wasserlösliche Gallensäure darstellt<sup>[131]</sup>.



**Abbildung 1.9: Standardnummerierung der Kohlenstoffatome in Gallensäuren am Beispiel von Cholestan**, dem Grundkörper der Gallensäuren und Steroide<sup>[131]</sup>.

Anhand der Orientierung des H-Atoms an Position 5 kann zwischen Gallensäuren und Steroiden unterschieden werden. Während dies bei Gallensäuren  $\beta$ -orientiert ist und somit die Ringe A und B cis-verknüpft sind, ist es bei Steroiden  $\alpha$ -orientiert und die Ringe besitzen dadurch eine trans-Verknüpfung<sup>[128]</sup>. Dies führt ebenfalls zu unterschiedlichen 3D-Konformationen. Während Steroide annähernd planar sind, erscheinen Gallensäuren eher bulkig und werden als biplanar bezeichnet (siehe Abbildung 1.10)<sup>[132]</sup>.

Aufgrund ihrer Konformation sind Gallensäuren amphiphile Moleküle und wirken als Detergenzien. Sie bilden eine konvexe hydrophobe Oberseite und eine konkave hydrophile Unterseite aus (siehe Abbildung 1.10). Zusätzlich besitzen sie eine negativ geladene und somit ionisierte Seitenkette<sup>[128, 131]</sup>. Durch die amphiphilen Eigenschaften können abhängig vom pH-Wert und der Temperatur Mizellen bei Konzentrationen von 0,6 bis 10 mM ausgebildet werden, die wichtig für die physiologische Funktion der Gallensäuren sind<sup>[128]</sup>. Aufgrund der Mizellenbildung und damit der Wirkung als Detergenzien, sind Gallensäuren und ihre Salze für die Aufnahme von Lipiden, Fettsäuren und fettlöslichen Vitaminen aus der Nahrung essentiell<sup>[126]</sup>. Zudem kann dadurch die Aufnahme von Medikamenten über verschiedene biologische Barrieren, wie die Blut-Hirn-Schranke oder die Haut, gesteigert werden<sup>[129]</sup>.



**Abbildung 1.10: Darstellung der verschiedenen Gallensäuren in Sesselkonfiguration.** Aufgrund der 5β-Verknüpfung der Ringe A und B kommt es bei allen Gallensäuren zur räumlichen Trennung der hydrophilen und hydrophoben Bestandteile. Dies resultiert in ihren amphiphilen Eigenschaften. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[131, 133]</sup>.

Die Synthese der Gallensäuren aus Cholesterol findet in den Hepatozyten und somit in der Leber statt. Aus diesem Grund sind Gallensäuren die Hauptabbauprodukte von Cholesterol und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Lipoproteinlevels<sup>[129]</sup>. Durch ihre physiologische Funktion in der Cholesterolhomeostasis kann die Anreicherung von Cholesterol, Triglyceriden und toxischen Metaboliten in der Leber verhindert werden<sup>[127]</sup>. Die Umwandlung von Cholesterol zu Gallensäuren beinhaltet Hydroxylierung, Sättigung der Doppelbindung an C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>, Epimerisierung der Doppelbindung an C<sub>3</sub> und oxidative Abspaltung einer 3-Kohlenstoffeinheit an der Seitenkette<sup>[127]</sup>. Dieser Katabolismus von Cholesterol zu den verschiedenen Gallensäuren ist somit eine mehrstufige Reaktion, bei der insgesamt 17 Enzyme, darunter fünf Hydroxylasen, beteiligt sind<sup>[126-127, 130]</sup>. Es kann zwischen zwei verschiedenen Hauptreaktionswegen unterschieden werden, die beide in den Hepatozyten starten: dem klassischen Reaktionsweg (auch neutraler Reaktionsweg) und dem alternativen Reaktionsweg (auch saurer Reaktionsweg, da saure Zwischenprodukte gebildet werden)<sup>[126-127]</sup>.

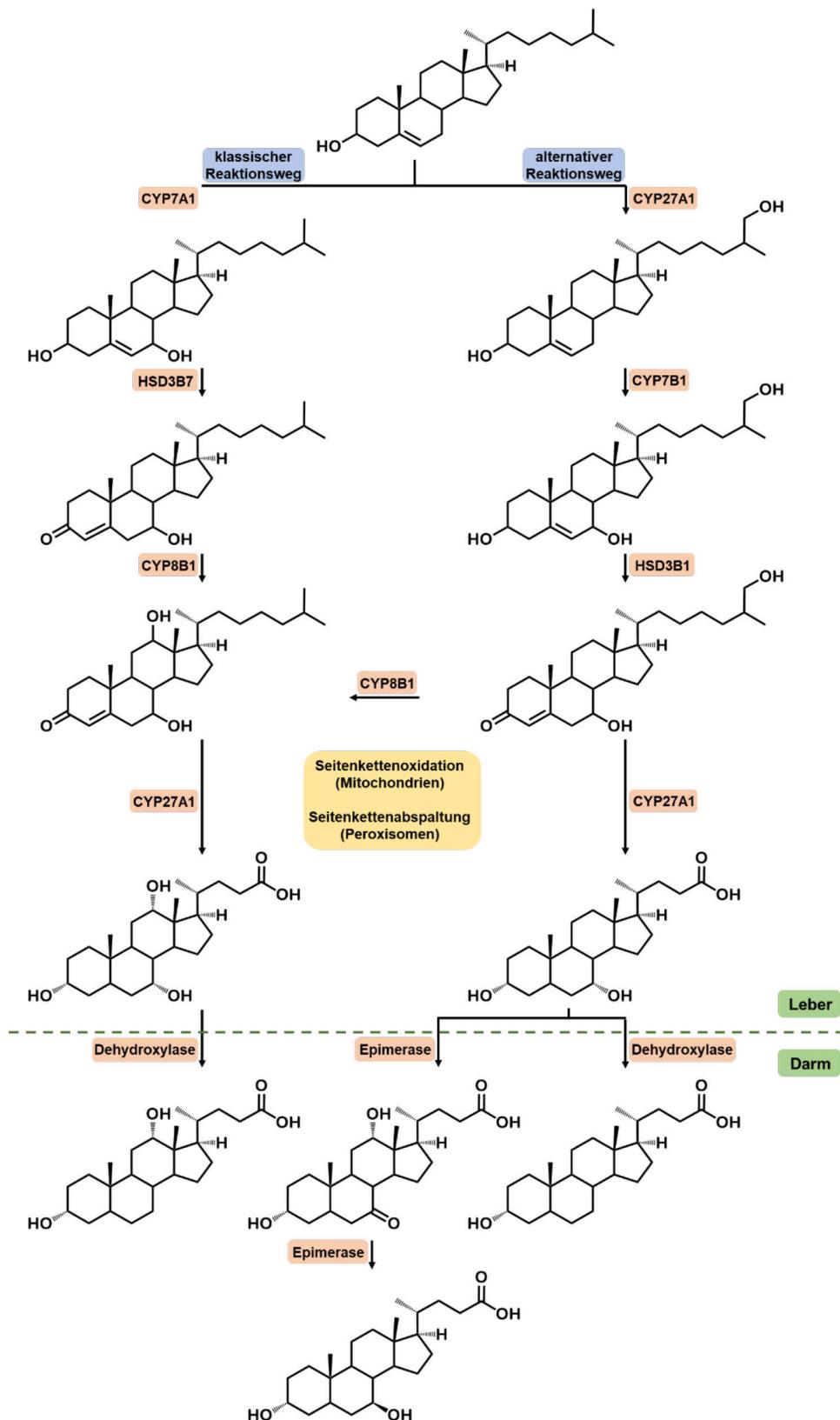
Der klassische Reaktionsweg ist der Hauptreaktionsweg der Gallensäurebiosynthese<sup>[126]</sup>. Dieser besteht aus einer Kaskade mit 14 Schritten, die von verschiedenen Enzymen im Cytoplasma, den Mikrosomen, den Mitochondrien und den Peroxisomen katalysiert werden<sup>[134]</sup>. Er beginnt mit der Modifikation des Steroidgrundgerüsts durch das Enzym Cholesterol-7α-Hydroxylase (CYP7A1), welches ein Cytochrom P450 Enzym des endoplasmatischen Retikulums ist und den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gallensäurebiosynthese darstellt<sup>[135-136]</sup>. Hierdurch wird Cholesterol selektiv zu 7α-Hydroxycholesterol umgesetzt. Darauf folgt die Oxidation der Seitenkette in den Mitochondrien und anschließend die Abspaltung dieser in den Peroxisomen<sup>[126-127, 137]</sup>.

Der alternative Reaktionsweg startet mit der Oxidation der Seitenkette durch die Sterol-27-hydroxylase (CYP27A1), welches ein mitochondriales Cytochrom P450 Enzym ist. Anschließend folgt die Modifikation des Steroidgrundgerüsts und die oxidative Abspaltung der Seitenkette<sup>[127, 137]</sup>. Über den alternativen Reaktionsweg werden ungefähr 9 % der Gallensäuren in menschlichen Hepatozyten synthetisiert<sup>[138]</sup>.

Die unspezifische mikrosomale Sterol-12 $\alpha$ -hydroxylase (CYP8B1) ist zudem in beiden Reaktionswegen für viele Hydroxylierungsschritte an Position C<sub>3</sub>, C<sub>7</sub> oder C<sub>12</sub> verantwortlich, wodurch das Verhältnis von CA und CDCA, welches ungefähr 3:1 ist, reguliert wird<sup>[126]</sup>. Eine allgemeine, vereinfachte Übersicht der Gallensäurebiosynthese ist in Abbildung 1.11 gezeigt. Durch Störungen im Gallensäuremetabolismus können cholestatische Leberkrankheiten, Dyslipidämie, Fettlebererkrankungen, Herz-Kreislaufkrankheiten und Diabetes hervorgerufen werden<sup>[127]</sup>.

Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA) werden direkt aus Cholesterol in der Leber gebildet und sind demnach primäre Gallensäuren. Die meisten Gallensäuren (im Verhältnis 3:1<sup>[131]</sup>) werden nach der Biosynthese in der Leber an Position C<sub>24</sub> an Glycin oder Taurin konjugiert, wodurch Gallensalze gebildet werden. Diese sind unter den meisten physiologischen Bedingungen negativ geladen und steigern somit die Löslichkeit in wässrigen Systemen<sup>[126, 130]</sup>. Anschließend werden Gallensäuren und Gallensäuresalze in die Gallenblase abgegeben, dort aufkonzentriert und in den Darm freigesetzt. Im Darm werden diese wieder dekonjugiert und durch Enzyme der Darmbakterien weiter metabolisiert, wodurch die sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA) durch Entfernung der Hydroxylgruppe an C<sub>7</sub> gebildet werden. Bei Ursodesoxycholsäure (UDCA) kann von einer tertiären Gallensäure gesprochen werden, welche durch Epimerisierung von 7-Ketolithocholsäure im Darm gebildet wird<sup>[126, 131, 139]</sup>.

Insgesamt werden mehr als 95 % aller Gallensäuren durch aktive Absorption am Ende des Dünndarms über den Gallensäure-spezifischen Transporter, den apikalen natriumabhängigen Gallensäuretransporter (ASBT), und durch passive Absorption im Colon resorbiert. Dadurch werden diese Gallensäuren durch die Pfortader in die Leber rezirkuliert. Während ungefähr 50 % der produzierten DCA resorbiert werden, werden der Großteil der produzierten LCA und UDCA über den Kot ausgeschieden<sup>[127, 131]</sup>. Dieser Vorgang wird auch als enterohepatische Zirkulation bezeichnet, welche 4-12-mal am Tag wiederholt und durch das auf der Oberfläche der Hepatozyten befindliche und bereits in Kapitel 1.2 näher erläuterte NTCP unterstützt wird<sup>[78, 131]</sup>. Zur Regulation der NTCP-Expression und der Gallensäuresynthese offeriert der nukleare Farnesoid X Rezeptor (FXR) einen negativen Feedback-Mechanismus, auch Endprodukt-Hemmung genannt, bei dem CDCA vor LCA, DCA und CA der stärkste Ligand ist<sup>[126-127, 130-131]</sup>.



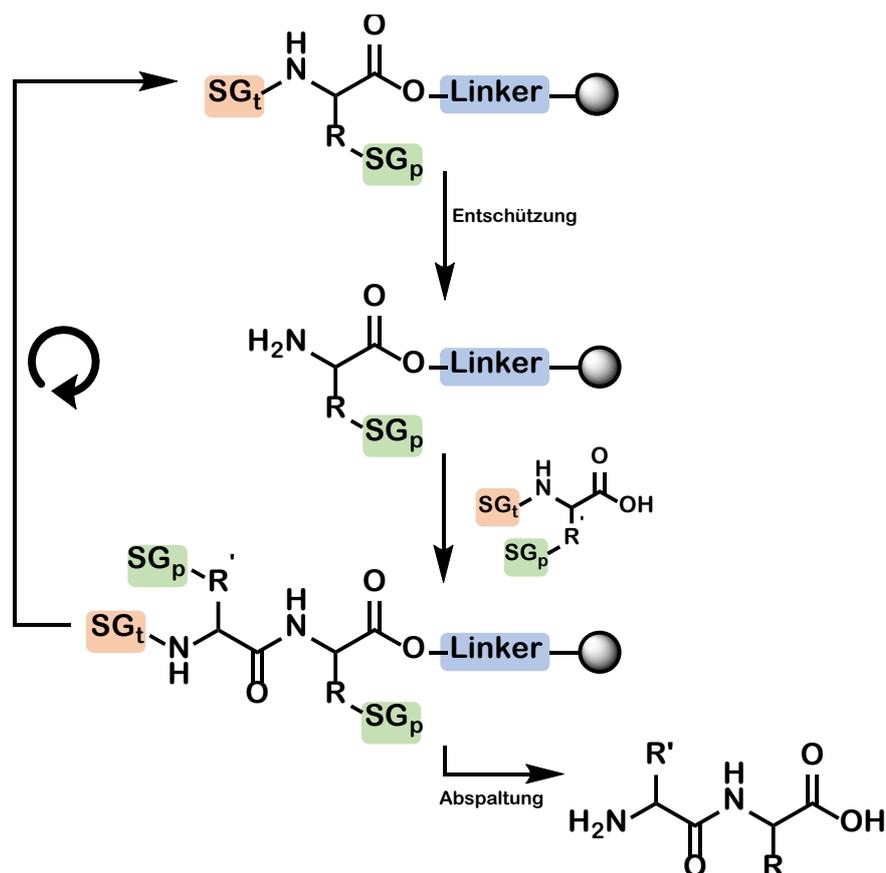
**Abbildung 1.11: Allgemeine Darstellung der unterschiedlichen Reaktionswege der Gallensäurebiosynthese.** An der Gallensäurebiosynthese sind verschiedene CYP P450-Enzyme beteiligt. Innerhalb der Leber werden direkt aus Cholesterin die primären Gallensäuren CA und CDCA gebildet. Durch weitere Umwandlungen im Darm werden die sekundären Gallensäuren DCA und LCA, sowie die tertiäre Gallensäure UDCA gebildet. An diesem Prozess sind Reaktionsschritte wie Dehydroxylierung, Dehydrogenierung und Epimerisierung beteiligt. Anschließend werden die Gallensäuren ausgeschieden oder in die Leber zurückgeführt (enterohepatischer Kreislauf). Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[130-132, 137]</sup>.

Gallensäuren und Gallensäurederivate werden als therapeutische Mittel für die Behandlung von chronischen Leberkrankheiten, Fettleibigkeit und Diabetes eingesetzt<sup>[126]</sup>. Hierbei wird oftmals die Physiologie des Gallensäuretransportes genutzt um die Gallensäuren als Transporter für Pharmazeutika einzusetzen<sup>[128]</sup>. Auch Gallensäuredimere sind aufgrund ihrer Eigenschaften biologisch aktiv und somit attraktive Verbindungen für die Therapie<sup>[140]</sup>. Gallensäuredimere wurden zunächst als Synthesenebenprodukte isoliert, sind aber auch in der Natur vorzufinden<sup>[141]</sup>. Eine antivirale, antibakterielle, und antifungale Wirkung, sowie die Wirksamkeit gegen Malaria konnte bereits gezeigt werden<sup>[142-145]</sup>. Ebenso können auch Gallensäuredimere als potente Drug-carrier und Cholesterolsenkende Medikamente eingesetzt werden<sup>[140]</sup>. Zudem ist die Verwendung sowohl der Monomere also auch der Dimere als Katalysator für verschiedene Reaktionen möglich<sup>[146]</sup>. Des Weiteren konnte bereits eine HBV-Infektionsinhibition der Gallensäuredimere *in vitro* gezeigt werden<sup>[125]</sup>.

#### 1.4 Peptidsynthese

Die Synthese von Peptiden und Proteinen erfolgt aus Aminosäuren. In der Natur werden diese vom Amino- (N-) zum Carboxy-Terminus (C-) aufgebaut (Proteinbiosynthese). Bei Peptidsynthesen wird die Synthese entgegengesetzt, vom C- zum N-Terminus durchgeführt, hierbei können sowohl natürliche und unnatürliche Aminosäuren als auch andere synthetische Bausteine eingesetzt werden. Wichtig dabei ist, dass die reaktiven Gruppen entsprechend geschützt sind, um ein einheitliches Produkt in guter Ausbeute zu erhalten<sup>[147]</sup>.

Die Festphasenpeptidsynthese (SPPS) wurde 1963 von Robert Bruce Merrifield entwickelt, der hierfür 1984 den Chemie-Nobelpreis erhielt<sup>[148]</sup>. Bei der SPPS können zwei bevorzugte Varianten unterschieden werden, die jedoch auf dem gleichen Prinzip aufbauen: Zum einen die ursprünglich von Merrifield<sup>[149]</sup> entwickelte Boc/Bzl-Strategie und zum anderen die Fmoc/*t*Bu-Strategie, die durch die Entwicklung der Fmoc-Schutzgruppe von Carpino 1970 ermöglicht wurde<sup>[150]</sup>. Beide Verfahren beruhen darauf, dass die temporäre Aminoschutzgruppe (SG<sub>t</sub>) orthogonal zur permanenten Schutzgruppe der Aminosäureseitenketten (SG<sub>p</sub>) ist, sodass der N-Terminus zur weiteren Reaktion entschützt werden kann, die reaktiven Seitenketten der Aminosäuren aber geschützt bleiben. Die Durchführung der heutzutage standardmäßig verwendeten Fmoc/*t*Bu-Strategie ist in Abbildung 1.12 schematisch dargestellt.

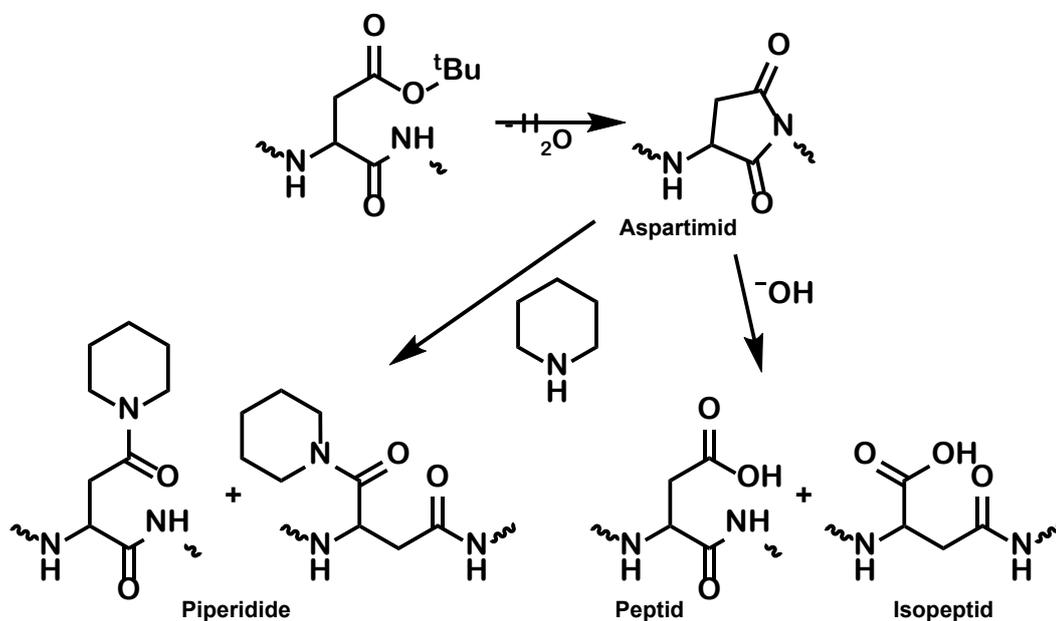


**Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese:**  $SG_t$ : temporäre Schutzgruppe,  $SG_p$ : permanente Schutzgruppe.

Das Peptid wird an einem Polymer mit Linker, der festen Phase, aufgebaut. Diese wird je nach verwendetem Verfahren, Peptidlänge, gewünschten Modifikationen und C-Terminus ausgewählt. Anschließend werden schrittweise die geschützten Aminosäuren an die wachsende Peptidkette angefügt. Als temporäre Schutzgruppe dient hierbei entweder die säurelabile Boc-Schutzgruppe (Boc/Bzl-Strategie), die mit TFA abgespalten werden kann, oder die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe (Fmoc/*t*Bu-Strategie), welche mit Piperidin abgespalten wird. Nach der Entfernung der temporären Schutzgruppe wird die nächste Aminosäure mit aktivierter Carboxy-Funktion zugegeben. Hierzu stehen verschiedene Klassen an Aktivierungsreagenzien zur Verfügung: Die ersten eingesetzten Aktivierungsreagenzien waren Carbodiimide wie DCC, DIC und EDC. Der Vorteil hierbei ist, dass als Nebenprodukt ein Harnstoffderivat entsteht, welches bei der Aufreinigung leicht abgetrennt werden kann. Der Nachteil ist jedoch, dass eine Racemisierung möglich ist. Dies kann durch Zugabe weiterer Reagenzien wie zum Beispiel HOBt unterdrückt werden. Eine Weiterentwicklung sind Aminium- beziehungsweise Uronium-Salze (HBTU, HATU und COMU), oder Phosphonium-Salze (PyBOP, PyAOP), wobei es sich um Salze nicht nukleophiler Anionen handelt. Es wird hier ebenfalls ein Aktivester gebildet, jedoch kann aufgrund der sterischen Beschaffenheit keine Racemisierung auftreten<sup>[151-152]</sup>.

Nach dem vollständigen Aufbau des Peptids an der festen Phase erfolgt die Abspaltung mit gleichzeitiger Entschützung der Aminosäureseitenketten. Hierzu wird bei der Boc/Bzl-Strategie Flusssäure verwendet. Bei der Fmoc/*t*Bu-Strategie kann die Abspaltung mit TFA erfolgen, was deutlich milder ist. Aus diesem Grund findet die Fmoc/*t*Bu-Strategie heutzutage vermehrt Einsatz.

Bei der Synthese von Myrcludex B und den verschiedenen Derivaten mittels SPPS können verschiedene Nebenprodukte auftreten. Ein bekanntes Problem ist hierbei die Aspartimidbildung bei Asparaginsäure (Asp(O*t*Bu)). Hierbei greift der Stickstoff der C-terminal gelegenen Peptidbindung die Carboxylgruppe der Asparaginsäure an und es kommt zur Ausbildung eines Imids (siehe Abbildung 1.13). Hierdurch wird ein um 18 g/mol zu leichtes Produkt gebildet, da die Ausbildung des Imids unter Abspaltung von Wasser stattfindet. Eine Katalyse der Reaktion erfolgt durch Säuren und Basen<sup>[153-154]</sup>.



**Abbildung 1.13: Aspartimidbildung bei der SPPS und die daraus resultierenden Nebenprodukte.**

Das bei der Synthese entstehende Aspartimid kann durch basische Ringöffnung zum einen zurück zur  $\alpha$ -Aminosäure und so zum Ursprungspeptid, zum anderen zur  $\beta$ -Aminosäure und dadurch zu einem Isopeptid reagieren. Eine weitere Möglichkeit der Ringöffnung besteht durch Piperidinanlagerung und somit der Ausbildung von Piperididen in beiden zuvor genannten Konformationen. Die Ausbildung von Aspartimid ist abhängig von der Sequenz der Peptide und wird durch die Aminosäuren Glycin, Serin, Threonin und Asparagin (Asn(Trt)) begünstigt<sup>[153-154]</sup>. Neben der Aminosäure Prolin ist die Ausbildung von Aspartimid aus sterischen Gründen nicht möglich<sup>[155]</sup>. Zusätzlich zur Sequenz ist auch die Länge des Peptids und die Position der Asparaginsäure in der Peptidkette von Bedeutung, da mit zunehmender Länge mehr Abspaltzyklen mit Piperidin durchgeführt werden und somit die Wahrscheinlichkeit der Aspartimidbildung steigt. Durch die Zugabe

von Ameisensäure zur Piperidinlösung kann die Bildung minimiert, jedoch nicht vollständig unterdrückt werden<sup>[155]</sup>. Eine weitere Möglichkeit zur Minimierung der Aspartimidbildung ist die Zugabe von HOBt oder Oxyma zur Piperidinlösung<sup>[153-154]</sup>. Durch die Verwendung von Piperazin statt Piperidin ist es ebenfalls möglich, die Aspartimidbildung zu verringern. Hierbei besteht jedoch das Problem, dass aufgrund der schwächeren Base auch die Fmoc-Entschützung langsamer abläuft und somit unter Umständen nicht vollständig ist. Dies würde zu einer vermehrten Bildung von Abbruchsequenzen führen<sup>[156]</sup>. Zur Verminderung der Aspartimidbildung ist der Einsatz von sterisch anspruchsvolleren Asparaginsäure-Seitenketten-Schutzgruppen möglich<sup>[157-158]</sup>. Ebenso können Schutzgruppen wie Hmb, Dmb, oder Pseudoproline am Peptidrückgrat eingesetzt werden, um dieses zu blockieren und die Löslichkeit zu steigern. Hierbei besteht jedoch das Problem, dass diese eine sehr schlechte Kopplungseffizienz aufweisen, weshalb sie lediglich als Dipeptide eingesetzt werden können<sup>[159-160]</sup>. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von Dipeptid-Bausteinen bestehend aus Asp(OtBu) und der entsprechend geschützten folgenden Aminosäure<sup>[161]</sup>. Die Entwicklung weiterer Seitenketten- und Peptidrückgrat-Schutzgruppen, sowie verschiedener fertiger Bausteine zur Verbesserung der Synthese mittels SPPS ist auch heutzutage noch aktuell<sup>[162]</sup>.

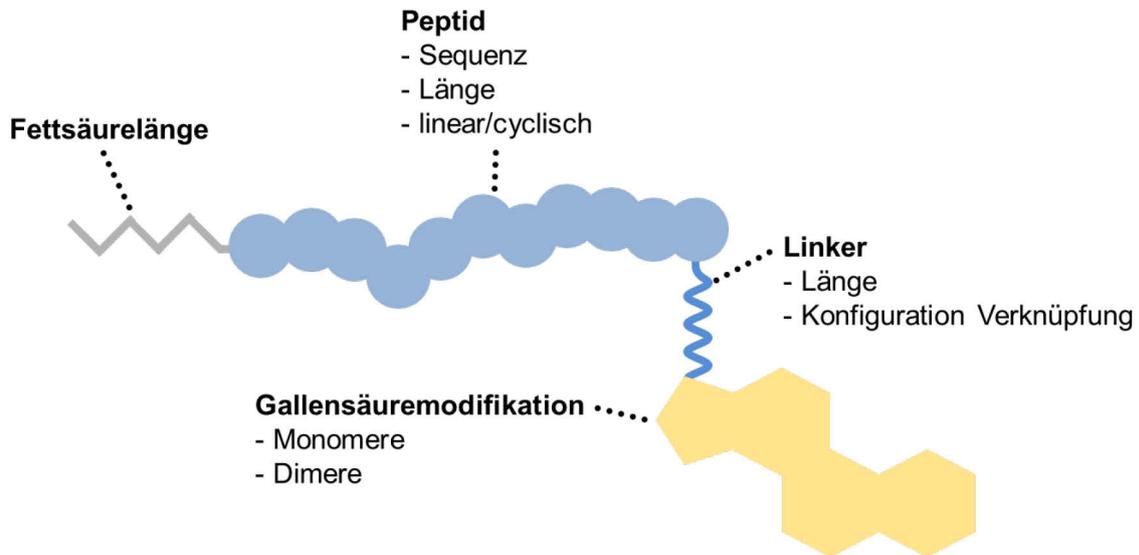
## 2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene HBV/HDV-Eintrittsinhibitoren, welche an den bereits zugelassenen peptidischen, aus 47 Aminosäuren bestehenden, HDV-Eintrittsinhibitor Hepcludex® (Mycludex B) angelehnt sind, synthetisiert und untersucht werden.

Ausgangspunkt war jeweils eine auf 20 Aminosäuren gekürzte Peptidsequenz der HBVpreS1-Sequenz, an die D-Tyrosin zur Radiomarkierung und L-Lysin zur Konjugation der Gallensäuremodifikationen angefügt wurde (HBVpreS/2-21-yK). In den verschiedenen Abschnitten wurden nun verschiedene Parameter variiert, um ihren Einfluss auf die HDV-Infektionsinhibition zu untersuchen und im besten Fall die inhibitorische Aktivität der verschiedenen Peptide und Konjugate zu erhöhen.

Im ersten Schritt wurde die Peptidsequenz näher charakterisiert, indem die verschiedenen Genotypsequenzen und andere Varianten synthetisiert wurden. Ebenso wurden anhand der HBVpreS/2-21-yK-Sequenz verschiedene Fettsäurelängen näher betrachtet.

Der größte Teil der Arbeit befasst sich jedoch mit der Synthese verschiedener Gallensäure-Peptid-Konjugate. Zunächst wurden die verschiedenen natürlich vorkommenden Gallensäuremonomere an das Peptid gekoppelt. Hierbei wurde in einem nächsten Schritt ebenso die Position (C- oder N-terminal) und die Wechselwirkungen mit Myristinsäure näher untersucht. Zudem wurde die Konfiguration des Lysins an der C-terminalen Konjugationsstelle genauer betrachtet. Des Weiteren wurden Linker verschiedener Längen zur Variation des Abstands zwischen Peptid und monomerer Gallensäure eingefügt. Hier wurden ebenfalls verschiedene cyclisierte Derivate mit unterschiedlicher Position der Konjugation der Gallensäure synthetisiert. Als nächstes folgte die Synthese verschiedener Gallensäuredimere. Bei diesen wurden verschiedene Verknüpfungsarten untersucht: direkte Kopf-Schwanz-Verknüpfung über Ester oder Amide, Kopf-Schwanz-Verknüpfung mit einem zusätzlichen Linker zwischen den beiden Gallensäurebausteinen oder Schwanz-Schwanz-Verknüpfung über verschiedene Linker. Die verschiedenen, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten, Modifikationen sind in Abbildung 2.1 schematisch gezeigt.



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Gallensäure-Peptidderivate mit den verschiedenen innerhalb dieser Arbeit variierten Parametern.**

Alle synthetisierten Peptide und Gallensäure-Peptid-Konjugate wurden in einem HDV-Infektionsinhibitionsassay auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Zusätzlich wurden verschiedene physikochemische Parameter, wie der LogD-Wert und der isoelektrische Punkt, bestimmt und weitere *in vitro* Experimente zur Untersuchung der Stabilität und Cytotoxizität durchgeführt. Mit Hilfe von *in vivo* Experimenten sollte abschließend eine genauere Charakterisierung verschiedener Gallensäure-Peptid-Konjugate, zur Ermittlung der Verteilung im Körper und der Stabilität, durchgeführt werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Vergleich der HBV-Genotypen und der Fettsäurelänge

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich eine auf 20 Aminosäuren gekürzte HBVpreS1-Sequenz verwendet (HBVpreS/2-21-yK). Zur Untersuchung der inhibitorischen Aktivität gegenüber HDV wurde für jeden Genotyp die entsprechende Sequenz synthetisiert und am N-Terminus mit Myristinsäure konjugiert. Zusätzlich zur Sequenz wurden D-Tyrosin und Lysin am C-Terminus angefügt. Über Lysin konnten aufgrund des  $\epsilon$ -Amins einfache peptidchemische Konjugationen durchgeführt werden und D-Tyrosin wurde zur radioaktiven Markierung mittels Chloramin-T-Methode benötigt. Ebenso wurden bei ein paar Genotypen weitere Subtypen gewählt, oder eine zusätzliche Mutation in der Sequenz eingeführt. Die synthetisierten Peptide sind mit Sequenz, erwartetem und gemessenem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Molekulargewicht in Tabelle 3.1 aufgeführt.

**Tabelle 3.1: Liste der synthetisierten Peptide der verschiedenen Genotypen.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide. Alle Positionen, an denen Sequenzunterschiede vorliegen sind in orange hervorgehoben. Die Fehlsequenz, mit Austausch von zwei Aminosäuren, ist rot hinterlegt.

---

#### HBVpreS/2-21-yK (consensus)

$M_W = 2666,08 \text{ g/mol}$  myr-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPyK-Amid  
 $m/z_{\text{calc}} = 1333,2230 [M+2H]^{2+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1333,1842 [M+2H]^{2+}$

---

#### HBVpreS/-11-21-yK (Genotyp B)

$M_W = 3838,44 \text{ g/mol}$  myr-GGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPyK-Amid  
 $m/z_{\text{calc}} = 1279,6818 [M+3H]^{3+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1279,0073 [M+3H]^{3+}$

---

#### HBVpreS/-11-21(L5S,S6L)-yK

$M_W = 3838,44 \text{ g/mol}$  myr-GGWSSKPRKGMGTNSLVPNPLGFFPDHQLDPyK-Amid  
 $m/z_{\text{calc}} = 1279,6818 [M+3H]^{3+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1279,6795 [M+3H]^{3+}$

---

#### HBVpreS/2-21-yK (Genotyp D)

$M_W = 2685,08 \text{ g/mol}$  myr-GQNLSTSNPLGFFPDHQLDPyK-Amid  
 $m/z_{\text{calc}} = 1342,7077 [M+2H]^{2+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1342,6697 [M+2H]^{2+}$

---

#### HBVpreS/-11-21-yK (Genotyp D+11)

$M_W = 3857,40 \text{ g/mol}$  myr-GGWSSKPRKGMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPyK-Amid  
 $m/z_{\text{calc}} = 1286,0049 [M+3H]^{3+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1286,0030 [M+3H]^{3+}$

---

**HBVpreS/2-21-yK (Genotyp E)**

$M_W = 2699,11 \text{ g/mol}$

myr-GKNI**STT**NPLGFFPDHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1349,7338 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1349,7098 [M+2H]^{2+}$

---

**HBVpreS/2-21-yK (Genotyp F/H)**

$M_W = 2693,10 \text{ g/mol}$

myr-G**Q**NLSV**P**NPLGFFPDHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1346,7285 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1346,6861 [M+2H]^{2+}$

---

**HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G)**

$M_W = 2621,04 \text{ g/mol}$

myr-GK**N**LSAS**N**NPLG**F**L**P**DPHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1310,7285 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1310,7032 [M+2H]^{2+}$

---

**HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G, L14F)**

$M_W = 2655,06 \text{ g/mol}$

myr-GK**N**LSAS**N**NPLG**F**F**P**DPHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1327,7206 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1327,6801 [M+2H]^{2+}$

---

**HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G2)**

$M_W = 2651,06 \text{ g/mol}$

myr-GK**N**LS**T**S**N**NPLG**F**L**P**DPHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1325,7338 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1325,7016 [M+2H]^{2+}$

---

**HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G2, L14F)**

$M_W = 2685,08 \text{ g/mol}$

myr-GK**N**LS**T**S**N**NPLG**F**F**P**DPHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1342,7259 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1342,6929 [M+2H]^{2+}$

---

**HBVpreS/2-21-yK (Genotyp I)**

$M_W = 2632,06 \text{ g/mol}$

myr-G**T**NLSV**P**NPLG**F**L**P**DPHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1316,2308 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1316,2215 [M+2H]^{2+}$

---

**HBVpreS/2-21-yK (Genotyp J)**

$M_W = 2650,08 \text{ g/mol}$

myr-GANLSV**P**NPLG**F**F**P**EHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1325,2256 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1325,2172 [M+2H]^{2+}$

---

**HBVpreS/2-21-yK (T3K, consensus)**

$M_W = 2693,15 \text{ g/mol}$

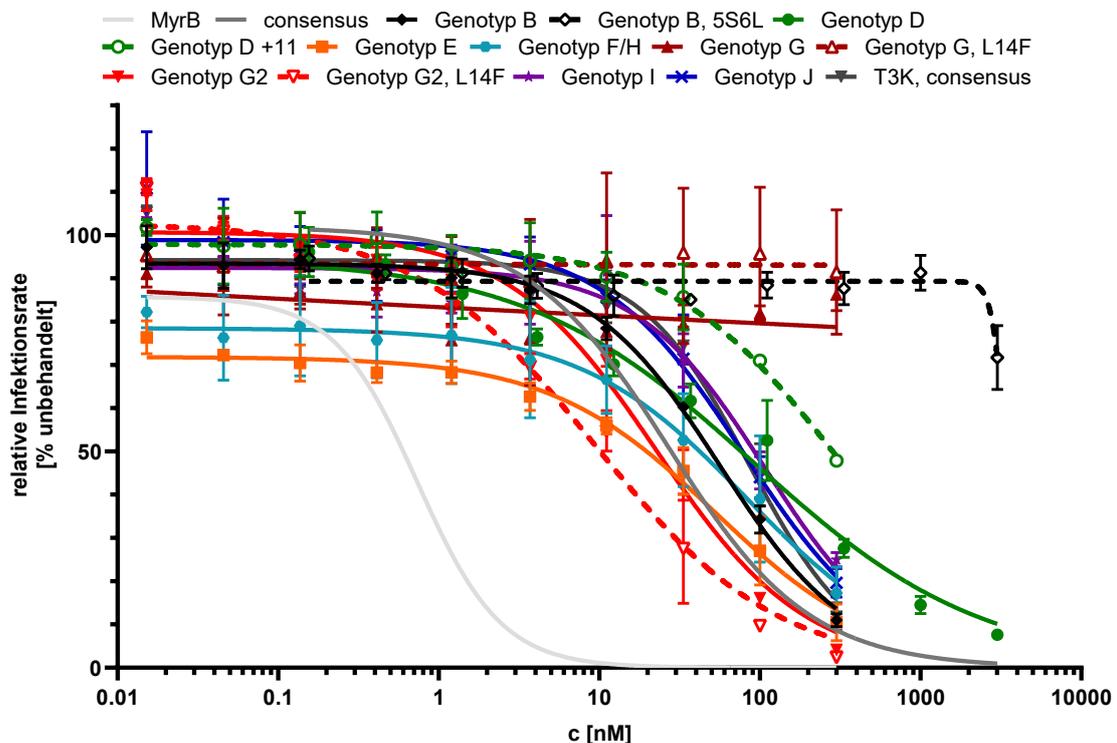
myr-GK**N**LSV**P**NPLGFFPDHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1346,7467 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1346,7423 [M+2H]^{2+}$

---

Anhand der in Tabelle 3.1 gezeigten Peptidsequenzen ist erkennbar, dass die Sequenzen, im auf 20 Aminosäuren gekürzten Bereich der preS1-Domäne, hochkonserviert sind und lediglich an vier Positionen (orange hinterlegt) Sequenzunterschiede auftreten. Zudem ist Genotyp B am N-Terminus verlängert (Aminosäuren -11 bis 1). Diese wurden zur Untersuchung des Einflusses zusätzlich auf Genotyp D übertragen. Eine weitere Mutation wurde bei Genotyp G durchgeführt. Dieser und Genotyp I beinhalten als einzige Genotypen an Position 14 die Aminosäure Leucin und somit kein Phenylalanin, weshalb als Vergleich ebenfalls Peptide mit Phenylalanin an dieser Position (Genotyp G, L14F und Genotyp G2, L14F) synthetisiert wurden. Alle Peptide konnten im Rahmen dieser Arbeit in guter Ausbeute und Reinheit synthetisiert werden. Anschließend wurden diese in einem HDV-Infektionsinhibitionsassay weiter untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.1 gezeigt und die daraus ermittelten  $IC_{50}$ -Werte in Tabelle 3.2 zusammengefasst.



**Abbildung 3.1:** Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der verschiedenen Genotypen im Bereich HBVpreS/2-21-yK und der von Myrcludex B abgeleiteten gekürzten consensus-Sequenz. Verwendung von Myrcludex B als Referenzsubstanz. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM beziehungsweise 3000 - 0,156 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

**Tabelle 3.2: Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte der verschiedenen Genotypen.**

Substanz	IC <sub>50</sub> [nM]
HBVpreS/2-21-yK (consensus)	26,9
HBVpreS/-11-21-yK (Genotyp B)	56,3
HBVpreS/-11-21(L5S,S6L)-yK	n.b.
HBVpreS/2-21-yK (Genotyp D)	91,9
HBVpreS/-11-21-yK (Genotyp D+11)	298,5
HBVpreS/2-21-yK (Genotyp E)	52,5
HBVpreS/2-21-yK (Genotyp F/H)	82,3
HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G)	n.b.
HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G, L14F)	n.b.
HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G2)	22,5
HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G2, L14F)	9,4
HBVpreS/2-21-yK (Genotyp I)	107,2
HBVpreS/2-21-yK (Genotyp J)	79,5
HBVpreS/2-21-yK (T3K, consensus)	85,2

Bei den in Abbildung 3.1 dargestellten Ergebnisse war zu erkennen, dass keine der HBVpreS/2-21-yK-Sequenzen die inhibitorische Aktivität von Myrcludex B erreicht (HBVpreS/2-48). Ebenso war zu erkennen, dass es Unterschiede in der inhibitorischen Aktivität der verschiedenen Genotypen gibt, auf welche im Folgenden genauer eingegangen wird.

Bei Genotyp B, der um elf Aminosäuren verlängerten consensus-Sequenz, war eine Verringerung der inhibitorischen Aktivität zu sehen. Dies kann ebenfalls bei Vergleich der inhibitorischen Aktivität von HBVpreS/-11-21-yK (Genotyp D) und HBVpreS/-11-21-yK (Genotyp D+11) bestätigt werden. Bei den um 11 Aminosäuren verlängerten Peptiden wurde der Abstand zwischen Myristinsäure und essentieller Domäne vergrößert. Dies scheint einen negativen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität zu haben. Hierbei ist es möglich, dass die Interaktion mit NTCP, nach der reversiblen Bindung von Myristinsäure an HPSG, gestört ist (siehe Kapitel 1.2). Dadurch ist die Aufnahme der Peptide in die Zelle und damit verbunden auch die inhibitorische Aktivität vermindert. Bei dem Peptid HBVpreS/-11-21(L5S,S6L)-yK wurden die Aminosäuren an Position 5 und 6 getauscht. Dies führt zu einem vollständigen Verlust der inhibitorischen Aktivität. Diese Positionen befinden sich direkt vor der bindenden Domäne und der Austausch scheint einen negativen Einfluss auszuüben, sodass keine Inhibition mehr stattfindet. Bei Betrachtung der Peptide der verschiedenen Genotypen mit gleicher Länge (HBVpreS/2-21-yK) sind an Position 3 der Sequenz vier unterschiedliche Aminosäuren verwendet worden. Diese sind Glutamin (Genotyp D und F/H), Lysin (Genotyp E und Genotyp G), Alanin (Genotyp J) und Threonin, welches in allen verbleibenden Genotypen und auch der consensus-Sequenz

enthalten ist. Die geringste inhibitorische Aktivität mit  $IC_{50} = 91,9$  nM (Genotyp D) und  $IC_{50} = 82,3$  nM (Genotyp F/H) zeigten hierbei die Peptide mit Glutamin. Bei Lysin und Threonin war kein eindeutiger Trend erkennbar. Daher ist zu vermuten, dass auch die anderen Positionen, an denen Unterschiede vorliegen einen Einfluss auf die Inhibition der Infektion haben. Die nächsten Sequenzvariationen liegen in Position 6 und 7 vor. In der consensus-Sequenz, wie auch bei Genotyp B, Genotyp F/H, Genotyp I und Genotyp J, liegen hier Valin und Prolin vor. Bei Genotyp D und Genotyp G2 sind es Threonin und Serin, bei Genotyp E zwei Mal Prolin und bei Genotyp G1 Alanin und Serin. Es war zu erkennen, dass bei der Variante bei Genotyp G1 der vollständige Verlust der Infektionsinhibition eintritt, was ansonsten bei keinem anderen Genotyp der Fall war. Dies ist möglicherweise auf den sterischen Anspruch der Aminosäuren und der damit zusammenhängenden räumlichen Struktur des Peptids zurückzuführen. Während Threonin mit einem Hydroxyethyl- und Valin mit einem Isopropyl-Rest zwei ähnlich große Reste tragen, enthält Alanin lediglich einen sterisch weniger anspruchsvollen Methyl-Rest. Dies könnte einen Einfluss auf die Struktur des Peptids und die Bindung an NTCP und die damit verbundene Virusinhibition haben. Die stärkste inhibitorische Aktivität mit einem  $IC_{50}$  von 9,4 nM zeigt die Variante von Genotyp G2. Bei einem Vergleich der beiden Peptide HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G2) und HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G2, L14F) ist der einzige Unterschied der Tausch der Aminosäure in Position 14 von Leucin, das dort in diesem Genotyp vorkommt, mit Phenylalanin, welches in den verschiedenen Genotypsequenzen hauptsächlich dort auftritt. Diese Position befindet sich innerhalb der essentiellen Domäne, dennoch wurde durch den Austausch die inhibitorische Aktivität nicht vollständig aufgehoben und war mit  $IC_{50} = 22,5$  nM vergleichbar mit der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Sequenz. Auch bei Genotyp I befindet sich an Position 14 Leucin, mit 107,2 nM war der  $IC_{50}$ -Wert hier zwar schlechter und damit die inhibitorische Aktivität vermindert, jedoch ebenso nicht vollständig aufgehoben. Dennoch zeigt die hauptsächlich an Position 14 vorkommende Aminosäure Phenylalanin in allen Fällen eine bessere inhibitorische Aktivität als Leucin. Die gute inhibitorische Aktivität von Genotyp G2 ist möglicherweise auf die Kombination der basischen Aminosäure Lysin in Position 2 mit den beiden Aminosäuren Threonin und Valin, welche polar und ungeladen sind, zurückzuführen. Durch die positive Ladung von Lysin könnte die Interaktion mit der Zelloberfläche verstärkt und die Aufnahme verbessert werden. Bei Austausch der Aminosäuren Threonin und Serin durch die hydrophoben Aminosäuren Valin und Prolin, wie in der consensus-Sequenz (HBVpreS/2-21-yK (T3K, consensus)), tritt eine Verschlechterung der HDV-Infektionsinhibition ein und der positive Effekt von Lysin wurde wieder aufgehoben.

Für eine bessere Vergleichbarkeit mit Myrcludex B wurde für die weiteren Synthesen HBVpreS/2-21-yK (consensus) als Ausgangspunkt verwendet, auch wenn dieses Peptid mit  $IC_{50} = 26,9 \text{ nM}$  eine leicht verminderte HDV-Infektionsinhibition *in vitro* gegenüber den beiden HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G2)-Peptiden zeigt.

Im Folgenden wurde der Einfluss der am N-Terminus gekoppelten Fettsäure überprüft. Hierzu wurden an den N-Terminus von HBVpreS/2-21-yK (consensus) anstatt Myristinsäure ( $C_{14}$ ) verschiedene Fettsäuren von  $C_{10}$  bis  $C_{18}$  gekoppelt. Die synthetisierten Peptide sind mit Sequenz, erwartetem und gemessenem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Molekulargewicht in Tabelle 3.3 gelistet.

**Tabelle 3.3: Liste der synthetisierten Peptide mit verschiedenen Fettsäurelängen.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide.

---

### **$C_{10}$ -HBVpreS/2-21-yK (consensus)**

$M_W = 2609,97 \text{ g/mol}$

$C_{10}$ -GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1305,1917 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1305,1357 [M+2H]^{2+}$

---

### **$C_{12}$ -HBVpreS/2-21-yK (consensus)**

$M_W = 2638,02 \text{ g/mol}$

$C_{12}$ -GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1319,2074 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1319,1503 [M+2H]^{2+}$

---

### **$C_{16}$ -HBVpreS/2-21-yK (consensus)**

$M_W = 2694,13 \text{ g/mol}$

$C_{16}$ -GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1347,2387 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1347,1827 [M+2H]^{2+}$

---

### **$C_{18}$ -HBVpreS/2-21-yK (consensus)**

$M_W = 2722,18 \text{ g/mol}$

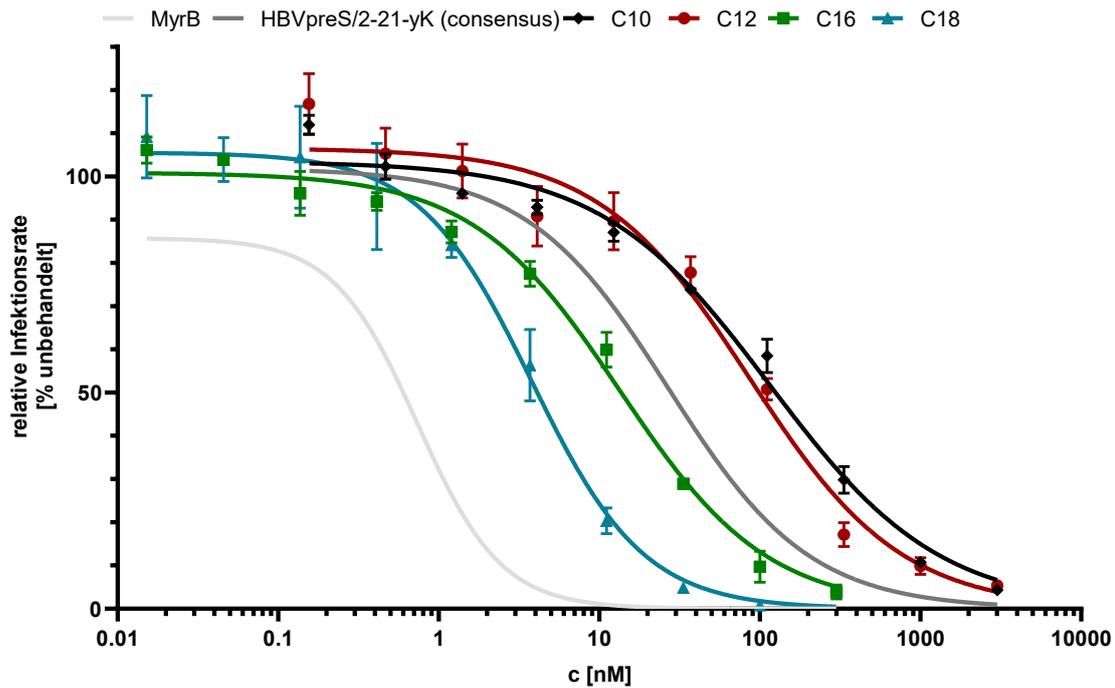
$C_{18}$ -GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPyK-Amid

$m/z_{\text{calc}} = 1361,2543 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1361,1978 [M+2H]^{2+}$

---

Die vier Peptide konnten im Rahmen dieser Arbeit mit peptidchemischen Methoden in guter Ausbeute und Reinheit synthetisiert werden. Die Ergebnisse des darauffolgenden HDV-Infektionsinhibitionsassays werden in Abbildung 3.2 gezeigt und die daraus berechneten  $IC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 3.3 gelistet.



**Abbildung 3.2:** Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit unterschiedlicher Länge der am C-Terminus konjugierten Fettsäure. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM bei C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> beziehungsweise 3000 - 0,156 nM bei C<sub>10</sub> und C<sub>12</sub>. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

**Tabelle 3.4:** Auflistung der IC<sub>50</sub>-Werte der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit unterschiedlicher Länge der am C-Terminus konjugierten Fettsäure.

Substanz	IC <sub>50</sub> [nM]
C <sub>10</sub> -HBVpreS/2-21-yK (consensus)	115,3
C <sub>12</sub> -HBVpreS/2-21-yK (consensus)	86,5
C <sub>16</sub> -HBVpreS/2-21-yK (consensus)	13,4
C <sub>18</sub> -HBVpreS/2-21-yK (consensus)	3,8

Es war zu erkennen, dass keines der mit verschiedenen Fettsäuren konjugierten HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide die inhibitorische Aktivität von Myrcludex B erreicht. Die beste HDV-Inhibition zeigt, mit einem IC<sub>50</sub> = 3,8 nM, das mit Stearinsäure (C<sub>18</sub>) konjugierte Peptid. Mit abnehmender Länge der Fettsäure sinkt auch die inhibitorische Aktivität der Peptide. Dies ist allerdings nicht ausschließlich auf eine Infektionsinhibition zurückzuführen. Wie bereits bei der Entwicklung und Charakterisierung von Myrcludex B festgestellt werden konnte, steigt mit zunehmender Fettsäurelänge auch die Cytotoxizität<sup>[96]</sup>. Da Myristinsäure die Fettsäure ist, die auch bei der natürlichen Modifikation an die Oberflächenproteine des HBV konjugiert wird und diese mit IC<sub>50</sub> = 26,9 nM einen gut verwendbaren Startwert für weitere Modifikationen liefert, wurde die Konjugation von Myristinsäure verwendet<sup>[163]</sup>. Ebenso war dadurch zu erwarten, dass die erste Interaktion der zu entwickelnden Eintrittsinhibitoren mit HSPG auf der

Zelloberfläche der Hepatozyten nicht vermindert wird. Ein weiterer positiver Aspekt ist dadurch auch, dass der gleiche Aufbau wie bei Myrcludex B verwendet wurde und somit ein ähnliches Verhalten zum Beispiel in der Bioverteilung zu erwarten war.

Zusammenfassend wurde, sowohl bei der Wahl des Genotyps als auch bei der Auswahl der Fettsäure, in beiden Fällen nicht die Modifikation mit der höchsten inhibitorischen Aktivität gewählt. Bei den verschiedenen Genotypen wurde die gekürzte, bereits in Myrcludex B charakterisierte consensus-Sequenz gewählt, da hier eine gute Vergleichbarkeit und ein ähnliches Verhalten zu erwarten ist. Als konjugierte Fettsäure wurde mit Myristinsäure ebenso die Modifikation wie in Myrcludex B gewählt, da diese der natürlichen Modifikation entspricht und somit eine gute Interaktion mit den HSPG auf der Zelloberfläche und darauf aufbauend eine gute NTCP-Inhibition zu erwarten ist. Für die folgenden Versuche und Modifikationen wurde somit ein um 28 Aminosäuren verkürztes Derivat von Myrcludex B verwendet. Hierbei ist die essentielle Domäne (AS 9 - 15) weiterhin vorhanden, die akzessorische Domäne jedoch nicht.

### **3.2 Konjugation verschiedener Gallensäurederivate zur Steigerung der HDV/HBV-Inhibition**

Wie in Kapitel 1.2 erläutert, dient NTCP der Aufnahme von HBV/HDV in Hepatozyten, zugleich jedoch auch der Aufnahme von Gallensäuren. Der genaue Mechanismus der Aufnahme ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt zudem ist die Struktur der Bindetasche noch nicht aufgeklärt. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass verschiedene Gallensäuren in der Lage sind, die HBV-Infektion bei geeigneter Konzentration zu inhibieren<sup>[36]</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, durch Konjugation eines HBV/HDV-inhibierenden Peptids (HBVpreS/2-21-yK) mit verschiedenen Gallensäuren die HDV-Infektionsinhibition zu erhöhen. Hierzu wurden neben den käuflich erwerbbaeren Gallensäuremonomeren verschiedene dimere Gallensäurederivate synthetisiert und an das Peptid konjugiert. Ebenso wurde der Einfluss der Konfiguration des Lysinrests, über den die Gallensäuren verknüpft wurden, näher untersucht.

#### **3.2.1 Konjugation verschiedener Gallensäuremonomere**

Im ersten Schritt wurde Myrcludex B am C-Terminus mit Lysin erweitert und dort die Gallensäure UDCA gekoppelt. Hierdurch soll überprüft werden, ob durch die zusätzliche Gallensäuremodifikation eine weitere Steigerung der inhibitorischen Aktivität möglich ist. Die Sequenz des Produkts, das Molekulargewicht und LC-MS-Daten sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

**Tabelle 3.5: Daten der Konjugation von UDCA an MyrB.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, das erwartete und gemessene Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz des Peptid-Konjugats.

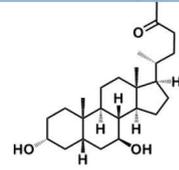
### MyrB-yK-UDCA

myr-GT~~NTLSV~~PNPLGFFPDHQ~~LDPAFGANSNNPDWDFNPNK~~DHWPEANKVGYK-Amid

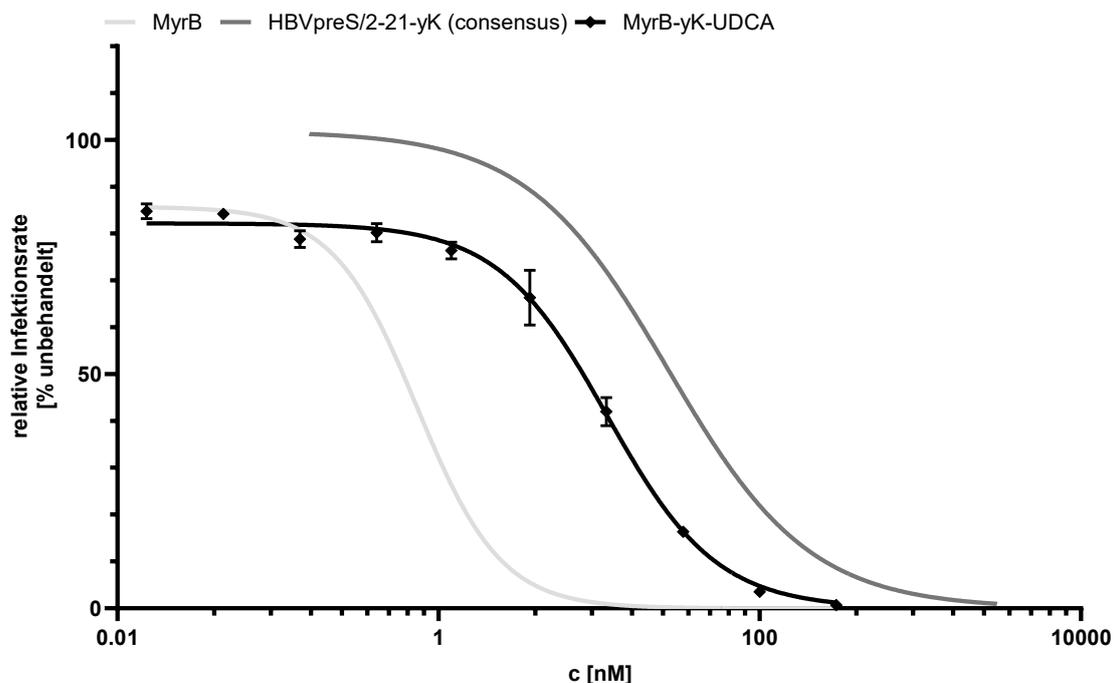
$M_W = 6064,77 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 2021,3579 [M+3H]^{3+}$

$m/z_{\text{obs}} = 2021,2956 [M+3H]^{3+}$



Dieses Peptid-Konjugat konnte in guter Ausbeute und Reinheit synthetisiert werden, da die Gallensäure mit den standardmäßig verwendeten peptidchemischen Synthesemethoden gekoppelt werden konnte. Anschließend wurde die inhibitorische Aktivität in einem HDV-Infektionsinhibitionsassay untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 gezeigt und der daraus berechnete  $IC_{50}$ -Wert in Tabelle 3.6 gelistet.



**Abbildung 3.3: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen von MyrB-yK-UDCA.** Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK (consensus) als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM beziehungsweise 3000 - 0,156 nM bei HBVpreS/2-21-yK (consensus). Die Probe wurde in Triplikaten untersucht.

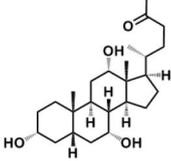
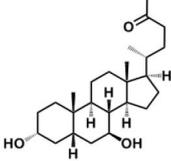
**Tabelle 3.6:  $IC_{50}$ -Wert von Myrcludex B und dem Myrcludex B Gallensäure-Konjugat MyrB-yK-UDCA.**

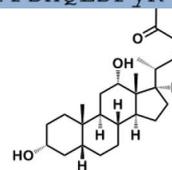
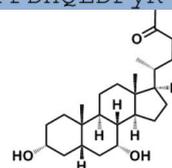
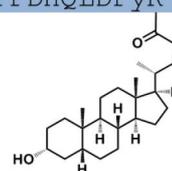
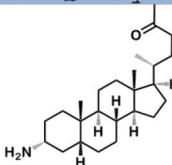
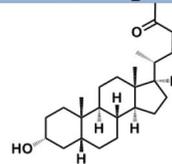
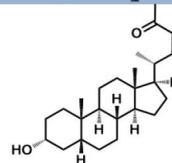
Substanz	$IC_{50}$ [nM]
MyrB	0,9
MyrB-yK-UDCA	11,7

Bei Betrachtung der dargestellten HDV-Infektionsinhibition von Myrcludex B-yK-UDCA im Vergleich mit Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK (consensus) war erkennbar, dass, im Vergleich zum kurzen Peptid eine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität stattgefunden hat. Die inhibitorische Aktivität von Myrcludex B konnte aber nicht erreicht werden. Somit hat die Konjugation der Gallensäure in diesem Fall zu einer Verschlechterung der HDV-Infektionsinhibition geführt. Es trat jedoch kein kompletter Verlust der inhibitorischen Aktivität ein. Möglicherweise konkurrieren in diesem Fall die akzessorische Domäne von Myrcludex B und die Gallensäure um die Bindestelle an NTCP, wodurch eine insgesamt schlechtere Infektionsinhibition zu beobachten war. Dadurch, dass bei der gekürzten Peptidvariante HBVpreS/2-21-yK (consensus) lediglich die essentielle und keine akzessorische Domäne vorhanden ist, ist es möglich, dass bei geeigneter Wahl der Konjugationsstelle und geeigneter Modifikation der Gallensäure eine Steigerung der inhibitorischen Aktivität eintreten kann.

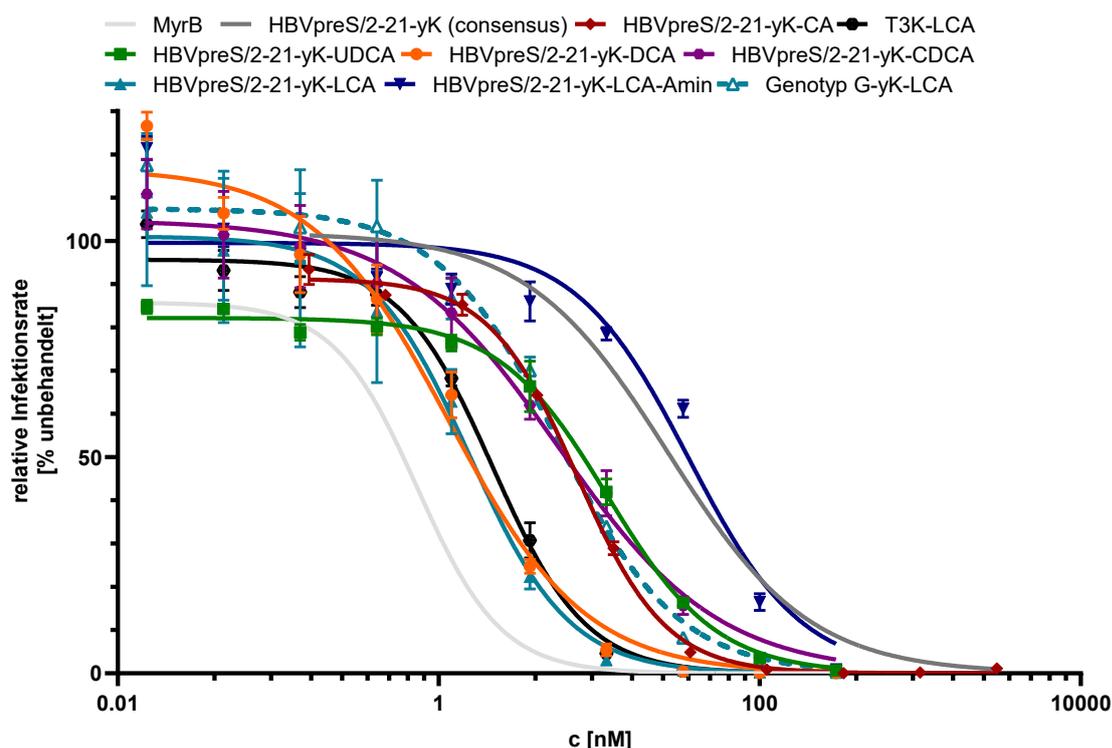
Im Folgenden wurden nun verschiedene Gallensäuremonomere an das gekürzte HBVpreS/2-21-yK-Peptid gekoppelt. Das Ziel hiervon war die inhibitorische Aktivität der Peptide durch die Kombination der beiden NTCP-Substrate (HDV und Gallensäuren) zu verbessern. Zusätzlich wurde LCA an das HBVpreS/2-21-yK (Genotyp G2, L14F)-Peptid gekoppelt, da dieses bei dem Vergleich der verschiedenen Genotypen (siehe Kapitel 3.1) die stärkste HDV-Infektionsinhibition zeigte. Des Weiteren wurde die modifizierte Variante mit Lysin statt Threonin an Position 3 mit LCA konjugiert, da aufgrund der zuvor gezeigten Genotypen hierfür eine gute HDV-Infektionsinhibition erwartet wurde. Die synthetisierten Peptide sind mit Sequenz, erwartetem und gemessenem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Molekulargewicht in Tabelle 3.7 gelistet.

**Tabelle 3.7: Liste der synthetisierten Peptide mit Gallensäuremonomeren.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.

<b>HBVpreS/2-21-yK-CA</b>	myr-GTNLSVNPPLGFFPDHQLDPyK-Amid	
$M_W = 3056,63 \text{ g/mol}$ $m/z_{\text{calc}} = 1528,3651 [M+2H]^{2+}$ $m/z_{\text{obs}} = 1528,3439 [M+2H]^{2+}$		
<b>HBVpreS/2-21-yK-UDCA</b>	myr-GTNLSVNPPLGFFPDHQLDPyK-Amid	
$M_W = 3040,63 \text{ g/mol}$ $m/z_{\text{calc}} = 1520,3641 [M+2H]^{2+}$ $m/z_{\text{obs}} = 1520,3354 [M+2H]^{2+}$		

**HBVpreS/2-21-yK-DCA**myr-GT~~NTLSV~~PNPLGFFPDHQ~~LD~~PyK-Amid $M_W = 3040,63 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1520,3641 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1520,3354 [M+2H]^{2+}$ **HBVpreS/2-21-yK-CDCA**myr-GT~~NTLSV~~PNPLGFFPDHQ~~LD~~PyK-Amid $M_W = 3040,63 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1520,3641 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1520,3534 [M+2H]^{2+}$ **HBVpreS/2-21-yK-LCA**myr-GT~~NTLSV~~PNPLGFFPDHQ~~LD~~PyK-Amid $M_W = 3024,64 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1512,3666 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1512,3271 [M+2H]^{2+}$ **HBVpreS/2-21-yK-LCA-Amin**myr-GT~~NTLSV~~PNPLGFFPDHQ~~LD~~PyK-Amid $M_W = 3023,65 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1511,8746 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1511,8057 [M+2H]^{2+}$ **HBVpreS/2-21(Genotyp G2)-yK-LCA**myr-G~~KNLST~~SNPLGFLPDHQ~~LD~~PyK-Amid $M_W = 3043,64 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1521,8695 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1521,8650 [M+2H]^{2+}$ **HBVpreS/2-21(T3K)-yK-LCA**myr-G~~KNLSV~~PNPLGFFPDHQ~~LD~~PyK-Amid $M_W = 3051,70 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1525,8902 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1525,8859 [M+2H]^{2+}$ 

Die zuvor gezeigten Peptide konnten im Rahmen dieser Arbeit in guter Ausbeute und Reinheit mit einfachen peptidchemischen Methoden synthetisiert werden. Bei HBVpreS/2-21-yK-LCA-Amin musste vor der Konjugation ans Peptid eine organische chemische Modifikation durchgeführt werden (siehe Kapitel 5.2.2.1 bis 5.2.2.4). Diese war nach Optimierung des Reduktionsschrittes des Azids zum Amin (Kapitel 5.2.2.4) ebenso mit guter Ausbeute möglich. Nach erfolgreicher Synthese der Gallensäure-Peptid-Konjugate wurden diese in einem HDV-Infektionsinhibitionsassay auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Die erhaltenden Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 gezeigt und die daraus berechneten  $IC_{50}$ -Werte in Tabelle 3.8 aufgeführt.



**Abbildung 3.4: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit den verschiedenen, an Lysin konjugierten, Gallensäuremonomeren.** Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

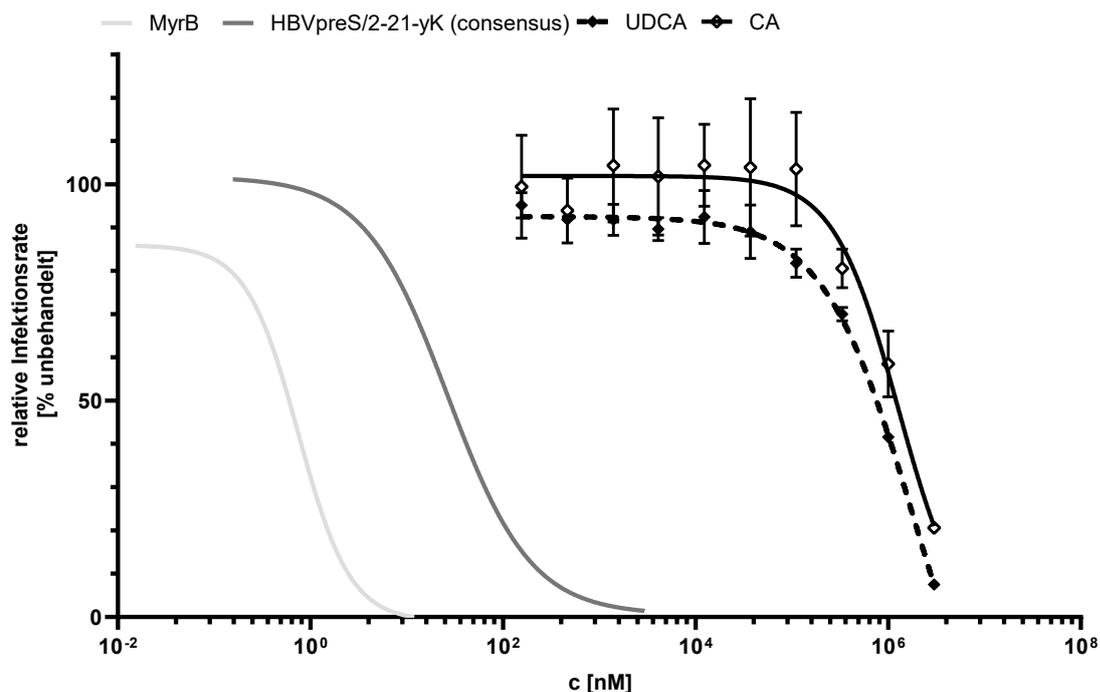
**Tabelle 3.8: Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte der HBVpreS/2-21-yK-Peptide (consensus) mit unterschiedlicher monomerer Gallensäuremodifikation.**

Substanz	IC <sub>50</sub> [nM]
HBVpreS/2-21-yK-CA	7,3
HBVpreS/2-21-yK-UDCA	11,2
HBVpreS/2-21-yK-DCA	1,2
HBVpreS/2-21-yK-CDCA	5,6
HBVpreS/2-21-yK-LCA	1,6
HBVpreS/2-21-yK-LCA-Amin	36,0
HBVpreS/2-21(Genotyp G2)-yK-LCA	5,5
HBVpreS/2-21(T3K)-yK-LCA	2,2

Die Ergebnisse zeigen für alle Gallensäure-Peptid-Konjugate mit einer natürlich vorkommenden Gallensäure eine gesteigerte inhibitorische Aktivität gegen HDV gegenüber dem unkonjugierten HBVpreS/2-21-yK-Peptid. Lediglich das Konjugat mit der Gallensäure, bei der das 3-OH durch ein Amin ersetzt wurde (HBVpreS/2-21-yK-LCA-Amin), zeigt eine Verschlechterung der HDV-Infektionsinhibition (IC<sub>50</sub> = 36,0 nM). Aus diesem Grund wird vermutet, dass die Hydroxy-Gruppen zur Aufnahme in die Zelle über NTCP benötigt werden. Die beste inhibitorische Aktivität besitzt das Konjugat mit DCA mit einer IC<sub>50</sub> = 1,2 nM. Diese Gallensäure besitzt zwei Hydroxy-Gruppen (3α und 12α) und

ist auch die Gallensäure, die bei der Gallensäurebiosynthese im enterohepatischen Kreislauf mit dem höchsten Prozentsatz in die Leber resorbiert wird<sup>[127, 131]</sup>. Bei dem Konjugat mit UDCA (3 $\alpha$  und 7 $\beta$ ) kann mit einer IC<sub>50</sub> = 11,2 nM die geringste inhibitorische Aktivität beobachtet werden. Diese Gallensäure hat als einziges Derivat eine  $\beta$ -verknüpfte Hydroxy-Gruppe, wodurch ein Einfluss auf die Konformation und die Hydrophobizität ausgeübt wird<sup>[164]</sup>. Durch diese Änderungen wird vermutlich auch die Interaktion mit NTCP beeinflusst und die inhibitorische Aktivität dieses Konjugats vermindert. Dennoch wurde auch bei dieser Gallensäure, durch die Kopplung an HBVpreS/2-21-yK, ein positiver Effekt auf die inhibitorische Aktivität beobachtet. Zusätzlich zu den Synthesen der Konjugate mit der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Sequenz wurde das Gallensäure-Peptid-Konjugat HBVpreS/2-21(Genotyp G2-yK)-LCA hergestellt, da diese Sequenz beim Vergleich der verschiedenen Genotypen (siehe Kapitel 3.1, Abbildung 3.1) die stärkste HDV-Infektionsinhibition zeigte. Diese konnte durch die Konjugation von LCA noch weiter gesteigert werden (IC<sub>50</sub> = 5,5 nM), erreicht jedoch nicht die inhibitorische Aktivität von HBVpreS/2-21-yK-DCA mit einer IC<sub>50</sub> = 1,2 nM und auch HBVpreS/2-21-yK (consensus) zeigt mit einem IC<sub>50</sub> = 1,6 nM eine höhere HDV-Infektionsinhibition *in vitro* als HBVpreS/2-21(Genotyp G2)-yK-LCA. Somit konnte durch die Verwendung des Peptids mit der besten HDV-Infektionsinhibition ohne Gallensäurekonjugation keine weitere Optimierung der Gallensäure-Peptid-Konjugate erreicht werden. Als weiterer Versuch zur Optimierung der HDV-Infektionsinhibition wurde ebenfalls an HBVpreS/2-21(T3K)-yK-LCA gekoppelt. Hierbei wurde Threonin an Position 3 in der consensus-Sequenz durch Lysin ersetzt, welches bei Genotyp G2 zu einer Steigerung der inhibitorischen Aktivität führt. Für das Peptid ohne Gallensäure konnte, wie in Kapitel 3.1 erläutert, keine weitere Steigerung der inhibitorischen Aktivität hervorgerufen werden. Die Konjugation mit LCA führt hier jedoch zu einer weiteren Steigerung der inhibitorischen Aktivität (IC<sub>50</sub> = 2,2 nM), die annähernd so gut war wie die von HBVpreS/2-21-yK-DCA. Die beiden zuvor erwähnten Gallensäure-Peptid-Konjugate zeigen somit insgesamt nur eine minimal schlechtere HDV-Infektionsinhibition (Faktor 2) als Myrcludex B<sup>[91]</sup>.

Als Vergleich wurden ebenfalls die beiden Gallensäuren UDCA und CA im HDV-Infektionsinhibitionsassay untersucht, da bereits von Ni *et al.* gezeigt werden konnte, dass auch Gallensäuren in ausreichender hoher Konzentration zur Inhibition der Aufnahme von HBV führen können<sup>[36]</sup>. Die hieraus erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.5 und Tabelle 3.9 gezeigt.



**Abbildung 3.5:** Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der monomeren Gallensäure UDCA und CA. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 3000000 – 155,6 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

**Tabelle 3.9:** Übersicht der  $IC_{50}$ -Werte der monomeren Gallensäuren UDCA und CA im Vergleich zu Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK.

Substanz	$IC_{50}$ [nM]
UDCA	1.851.118
CA	1.280.449
Myrcludex B	0,9
HBVpreS/2-21-yK	26,9

Es war zu erkennen, dass auch die monomeren Gallensäuren für eine HDV-Infektionsinhibition sorgen können. Hierbei sind jedoch deutlich höhere Konzentrationen der Gallensäuren im Vergleich zu den peptidischen Eintrittsinhibitoren Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK (consensus) nötig. Die inhibitorische Aktivität bei UDCA beträgt  $IC_{50} = 1.851.118$  nM, bei CA  $IC_{50} = 1.280.449$  nM. Da bei beiden Gallensäuren ein ähnlicher Kurvenverlauf zu beobachten war, bei dem die sigmoidale Form nicht vollständig ausgeprägt war, sind diese Werte nur als Näherung zu betrachten. Dennoch sind die benötigten Konzentrationen zur HDV-Infektionsinhibition um den Faktor 200.000 (Myrcludex B), beziehungsweise 7.000 (HBVpreS/2-21-yK) höher als bei den verglichenen Peptiden. Daher kann von einem deutlichen Unterschied in der inhibitorischen Aktivität gesprochen werden. Diese Beobachtung stimmt mit den von Ni *et al.* publizierten Ergebnissen bei der HBV-Infektionsinhibition überein, in denen

verschiedene monomere Gallensäuren mit Taurinkonjugation auf die Inhibition von HBV untersucht wurden<sup>[36]</sup>.

Somit konnte die Vermutung, dass durch Konjugation von Gallensäuren an HBVpreS/2-21-yK die HDV-Infektionsinhibition gesteigert werden kann, bestätigt werden, da bei allen natürlich vorkommenden Gallensäuremonomeren eine Steigerung der inhibitorischen Aktivität im Vergleich zum reinen Peptid beobachtet werden konnte. Durch die ebenfalls schlechtere Inhibition der Gallensäuren ohne Peptid, im Vergleich zum Gallensäure-Peptid-Konjugat, konnte zudem gezeigt werden, dass die Annahme der zwei verschiedenen Bindestellen für Gallensäuren und der HBVpreS1-Sequenz in unterschiedlichen Bereichen des NTCP zutrifft<sup>[117]</sup>. Für eine weitere Optimierung müssen nun verschiedene Parameter weiter untersucht werden. Diese sind zum einen die Struktur des Peptids: cyclisch oder linear, die Konstitution der Gallensäurekonjugationsstelle und die Verknüpfung zwischen Peptid und Gallensäure: direkt oder durch Einschub eines Linkers. Zum anderen kann auch die Gallensäure weiter modifiziert werden. Hierbei bietet sich vor allem die Dimerisierung an, da in anderen Anwendungsbereichen, durch die gleichzeitige Adressierung mehrerer Rezeptoren, bereits ein positiver Effekt erzielt werden konnte und auch verschiedene Gallensäuredimere einen guten inhibitorischen Effekt und Bindung an NTCP gezeigt haben<sup>[125, 128, 165]</sup>. Bei der Dimerisierung sind verschiedene Verknüpfungsmöglichkeiten der einzelnen Gallensäuren möglich. Dabei sind direkte Verknüpfungen, sowie Verknüpfungen mit Linkern denkbar. Ebenso können die Gallensäuren an verschiedenen Positionen miteinander verknüpft werden (Kopf-Schwanz- und Schwanz-Schwanz-Verknüpfung). Diese Modifikationsmöglichkeiten werden im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht und in den folgenden Kapiteln genauer erläutert.

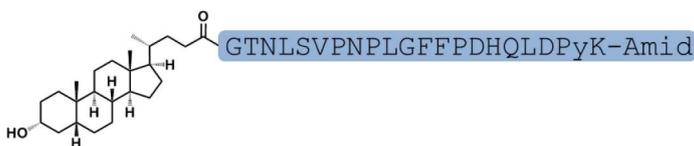
### **3.2.2 Betrachtung des Einflusses der Position von Myristinsäure und konjugierter Gallensäure**

Zur weiteren Untersuchung der Peptide mit Gallensäurekonjugation wurden im Folgenden verschiedene Peptide mit unterschiedlichen Modifikationen mit Myristinsäure und Gallensäure synthetisiert. Es wurden Peptide untersucht, bei denen ausschließlich LCA an N-Terminus oder  $\epsilon$ -Amin der Lysinseitenkette konjugiert wurde. Ebenso wurde ein Peptid mit getauschter Konstitution synthetisiert, bei dem Myristinsäure an die Seitenkette und LCA an den N-Terminus gekoppelt wurde. Des Weiteren wurde ein Peptid, welches zwei Gallensäuren besitzt, hergestellt. Ziel dieser Versuche war es den Einfluss von Myristinsäure und Gallensäure zu untersuchen und Informationen über den Einfluss der Gallensäure in verschiedenen Positionen zu erhalten. Die synthetisierten Peptide sind mit Sequenz, erwartetem und gemessenem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Molekulargewicht in Tabelle 3.10 gelistet.

**Tabelle 3.10: Liste der synthetisierten Peptide zur Betrachtung des Einflusses der Position von Myristinsäure und Gallensäure.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.

**LCA-consensus-yK**

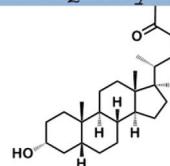
$M_W = 2814,28 \text{ g/mol}$   
 $m/z_{\text{calc}} = 1407,2674 [M+2H]^{2+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1407,2655 [M+2H]^{2+}$



**consensus-yK-LCA**

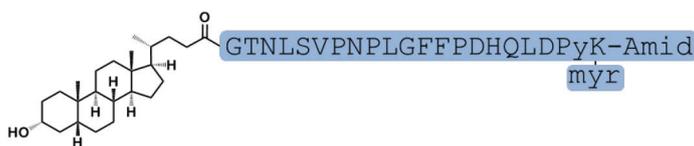
$M_W = 2814,28 \text{ g/mol}$   
 $m/z_{\text{calc}} = 1407,2674 [M+2H]^{2+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1407,2645 [M+2H]^{2+}$

GTNLSVNPPLGFFPDHQLDPyK-Amid



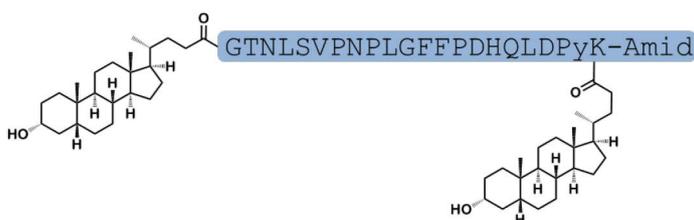
**LCA-consensus-yK-myr**

$M_W = 3024,64 \text{ g/mol}$   
 $m/z_{\text{calc}} = 1512,3666 [M+2H]^{2+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1512,3615 [M+2H]^{2+}$

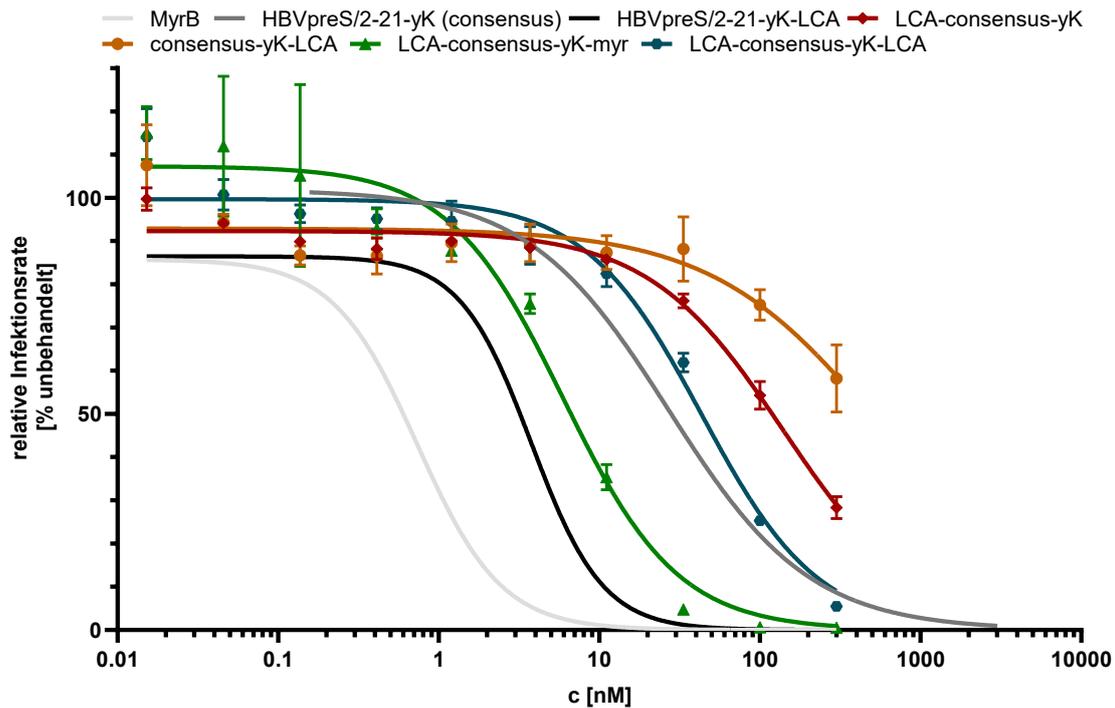


**LCA-consensus-yK-LCA**

$M_W = 3172,84 \text{ g/mol}$   
 $m/z_{\text{calc}} = 1586,4110 [M+2H]^{2+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1586,4065 [M+2H]^{2+}$



Die zuvor gezeigten Gallensäure-Peptid-Konjugate konnten im Rahmen dieser Arbeit in guter Ausbeute und Reinheit mit einfachen peptidchemischen Methoden synthetisiert. Nach erfolgreicher Synthese wurden diese in einem HDV-Infektionsinhibitionsassay auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Die erhaltenden Ergebnisse sind in Abbildung 3.6 gezeigt und die daraus berechneten  $IC_{50}$ -Werte in Tabelle 3.11 aufgeführt.



**Abbildung 3.6:** Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der Peptide mit verschiedenen Kombinationen der Konjugationsstelle von Myristinsäure und LCA. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

**Tabelle 3.11:** Übersicht der  $IC_{50}$ -Werte der Peptide mit verschiedenen Kombinationen der Konjugationsstelle von Myristinsäure und LCA.

Substanz	$IC_{50}$ [nM]
LCA-consensus-yK	139,9
consensus-yK-LCA	580,6
LCA-consensus-yK-myr	5,9
LCA-consensus-yK-LCA	43,3

Bei Betrachtung der Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays war deutlich zu erkennen, dass das Fehlen der Myristinsäure zu einer deutlichen Verschlechterung der HDV-Infektionsinhibition führte. Hierbei zeigt das Peptid mit LCA am N-Terminus, der eigentlichen Position der Myristinsäure, eine gesteigerte inhibitorische Aktivität gegenüber dem Peptid mit der Gallensäurekonjugation am Lysin am C-Terminus des Peptids. Die schlechte HDV-Infektionsinhibition ist darauf zurückzuführen, dass die Interaktion zwischen Myristinsäure und HSPG auf der Zelloberfläche ausbleibt und somit die Bindung des Peptids an die Zelloberfläche und die Aufnahme in die Zelle erschwert wird. Die Wirkung der Gallensäure allein ist hierbei bei beiden Konjugaten nicht ausreichend für die Inhibition. Bei der Konjugation von LCA sowohl an den N-Terminus als auch an das Lysin am C-Terminus wurde eine leichte Steigerung der inhibitorischen Aktivität mit einem  $IC_{50} = 43,3$  nM beobachtet. Auch diese war jedoch, im Vergleich zum Ausgangspeptid HBVpreS/2-21-yK, verringert. Somit ist die Kopplung von Myristinsäure essentiell und

kann nicht durch die zusätzliche Kopplung einer Gallensäure ersetzt werden. Bei der getauschten Anordnung mit LCA am N-Terminus und Myristinsäure am Lysin am C-Terminus war die inhibitorische Aktivität gesteigert, im Vergleich zum Ausgangspeptid HBVpreS/2-21-yK. Dies bestätigte, dass die Myristinsäure für die Interaktion und die HDV-Virusinhibition zwingend erforderlich ist. Bei Vergleich der beiden Peptide HBVpreS/2-21-yK-LCA und LCA-consensus-yK-myr, die jeweils Myristinsäure und LCA in unterschiedlicher Position tragen, war bei beiden eine ähnlich gute HDV-Virusinfektionsinhibition zu erkennen (HBVpreS/2-21-yK-LCA  $IC_{50}=1,6$  nM und LCA-consensus-yK-myr  $IC_{50}=5,9$  nM). Die Konfiguration, welche der natürlichen Konfiguration entspricht, mit Myristinsäure am N-Terminus zeigt jedoch den stärksten Effekt und die beste HDV-Infektionsinhibition *in vitro*.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Fettsäure Myristinsäure für die Bindung an die Zelle und die Infektionsinhibition essentiell ist, da ohne diese die inhibitorische Aktivität sehr gering ist. Zudem ist die Kombination mit Myristinsäure am N-Terminus und Gallensäure am Lysin am C-Terminus die effektivste. Diese entspricht der natürlichen Konjugationsstelle der Fettsäure am Virus. Somit konnte die Wahl von HBVpreS/2-21-yK als Ausgangspeptid erneut bestätigt werden und wird auch in den weiteren Versuchen eingesetzt.

### 3.2.3 Untersuchung des Einflusses der Konstitution der Aminosäure an der Gallensäurekonjugationsstelle

Als nächstes wurde untersucht, ob die Konfiguration des Lysins, welches zur Konjugation der Gallensäure verwendet wird, einen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität ausübt. Hierzu wurden die Peptide HBVpreS/2-21-K und HBVpreS/2-21-k mit L- und D-Lysin synthetisiert und anschließend die Gallensäure UDCA gekoppelt. Die synthetisierten Peptide sind mit Sequenz, erwartetem und gemessenem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Molekulargewicht in Tabelle 3.12 gelistet.

**Tabelle 3.12: Liste der synthetisierten Peptide zur Untersuchung des Einflusses der Lysin-Konstitution an der Konjugationsstelle.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.

---

#### HBVpreS/2-21-K (consensus)

myr-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPK-Amid

$M_W = 2502,90$  g/mol

$m/z_{\text{calc}} = 1251,6914$   $[M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1251,6610$   $[M+2H]^{2+}$

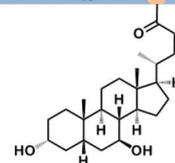
---

**HBVpreS/2-21-k (consensus)**

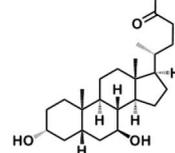
myr-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPK-Amid

 $M_W = 2502,90 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1251,6914 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1251,6527 [M+2H]^{2+}$ **HBVpreS/2-21-K-UDCA**

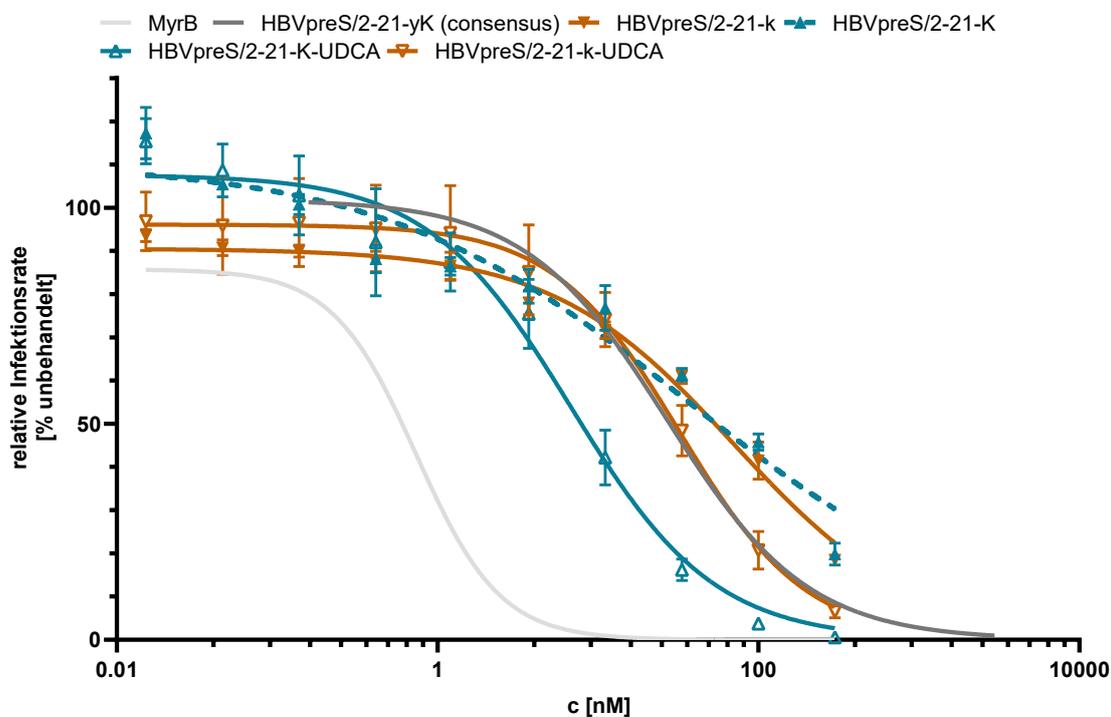
myr-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPK-Amid

 $M_W = 2877,46 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1438,8324 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1438,7986 [M+2H]^{2+}$ **HBVpreS/2-21-k-UDCA**

myr-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPK-Amid

 $M_W = 2877,46 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1438,8324 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1438,8020 [M+2H]^{2+}$ 

Die aufgelisteten Peptide konnten in guter Ausbeute und Reinheit mit peptidchemischen Methoden synthetisiert werden. Anschließend wurden diese in einem HDV-Infektionsinhibitionsassay auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 gezeigt und die daraus berechneten  $IC_{50}$ -Werte in Tabelle 3.13 gelistet.



**Abbildung 3.7:** Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der Peptide mit unterschiedlicher stereochemischer Konfiguration des Lysins an der Gallensäure-Konjugationsstelle. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

**Tabelle 3.13: IC<sub>50</sub>-Werte der Peptide mit unterschiedlicher stereochemischer Konfiguration des Lysins zur Konjugation der Gallensäure.**

Substanz	IC <sub>50</sub> [nM]
HBVpreS/2-21-K	35,9
HBVpreS/2-21-k	70,3
HBVpreS/2-21-K-UDCA	6,8
HBVpreS/2-21-k-UDCA	32,3

Bei einem Vergleich der in Tabelle 3.13 gezeigten IC<sub>50</sub>-Werte scheint es zunächst, als wäre das Peptid mit D-Lysin (HBVpreS/2-21-k, IC<sub>50</sub> = 70,3 nM) in seiner inhibitorischen Aktivität schlechter als das Peptid mit L-Lysin (HBVpreS/2-21-K, IC<sub>50</sub> = 35,9 nM). Die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde auf Grundlage der in Abbildung 3.7 gezeigten Daten durchgeführt. Dort war zu erkennen, dass die beiden Kurven für HBVpreS/2-21-K und HBVpreS/2-21-k keinen vollständigen sigmoidalen Verlauf zeigen, da für eine vollständige Infektionsinhibition eine höhere Peptidkonzentration nötig wäre. Dadurch sind die Abweichungen bei der Berechnung des IC<sub>50</sub>-Werts größer und nur als grobe Näherung zu betrachten. Für eine genauere Analyse wäre eine Wiederholung des Assays mit höherer Konzentration der Peptide nötig. Dies wurde jedoch nicht durchgeführt, da auch so schon zu erkennen war, dass bei beiden Peptiden keine Verbesserung eingetreten ist. Der Einfluss der Stereochemie des Lysins an der Gallensäurekonjugationsstelle konnte dennoch näher untersucht werden. Bei den Peptiden, bei denen an D-Lysin und L-Lysin zusätzlich die Gallensäure UDCA gekoppelt wurde, war in beiden Fällen die inhibitorische Aktivität im Vergleich zum jeweiligen Ausgangspeptid erhöht und der für die Berechnung benötigte sigmoidale Kurvenverlauf vollständig ausgeprägt. Ebenso war anhand der Daten zu erkennen, dass die HDV-Inhibition bei HBVpreS/2-21-K-UDCA (IC<sub>50</sub> = 6,8 nM) größer war als bei HBVpreS/2-21-k-UDCA (IC<sub>50</sub> = 32,3 nM). Somit ist für eine Bindung und Inhibition die Konfiguration des Lysins, das zur Konjugation der Gallensäure verwendet wird, entscheidend. Dies ist eventuell dadurch zu erklären, dass durch die geänderte Konfiguration an der Bindungsstelle die Gallensäure nicht mehr so gut in die Bindungstasche passt wie zuvor. Die verschlechterte Bindung könnte somit zu einer Verminderung der inhibitorischen Aktivität führen. Daher wird für die weiteren Synthesen die Standardaminosäure L-Lysin verwendet. Dass eine Änderung der Konfiguration die Bindung beeinflussen kann, konnte auch in vorangegangenen Arbeiten bereits gezeigt werden<sup>[91]</sup>. Hier wurde, durch einen Austausch von L- zu D-Aminosäuren innerhalb der essentiellen Domäne, die Infektionsinhibition vollständig aufgehoben.

### 3.2.4 Vergleich verschiedener Linker zwischen Peptid und Gallensäure

Als Versuch der weiteren Steigerung der Infektionsinhibition wurden zwischen Peptid und gekoppelter Gallensäure weitere Linker eingebracht, um den Abstand zwischen Kopplungsstelle und Gallensäure zu vergrößern. Hierbei wurden verschiedene Längen der Linker synthetisiert, um den Abstand zu variieren und durch diese Änderung eventuell eine bessere HDV-Infektionsinhibition *in vitro* zu erzielen, da möglicherweise die Bindungstasche besser adressiert werden kann. Der Aufbau der Linker erfolgte zum einen über bekannte organisch-chemische Synthesen. Zum anderen wurden zusätzliche Aminosäuren an das  $\epsilon$ -Amin des Lysins konjugiert, um auch dadurch den Abstand zu variieren und zudem eine Änderung der Polarität innerhalb der Seitenkette hervorzurufen. Die synthetisierten Peptide sind mit Sequenz, erwartetem und gemessenem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Molekulargewicht in Tabelle 3.14 gelistet.

**Tabelle 3.14: Liste der synthetisierten Gallensäurekonjugate mit verschiedenen Linkerbausteinen zwischen Peptid und Gallensäure.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptid-Konjugate.

<b>HBVpreS/2-21-yK-SucEtNH-LCA</b>	myr-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPyK-Amid	$M_W = 3165,78 \text{ g/mol}$ $m/z_{\text{calc}} = 1582,8998 [M+2H]^{2+}$ $m/z_{\text{obs}} = 1582,8566 [M+2H]^{2+}$	
<b>HBVpreS/2-21-yK-(SucEtNH)<sub>2</sub>-LCA</b>	myr-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPyK-Amid	$M_W = 3307,94 \text{ g/mol}$ $m/z_{\text{calc}} = 1653,9369 [M+2H]^{2+}$ $m/z_{\text{obs}} = 1654,3922 [M+2H]^{2+}$	
<b>HBVpreS/2-21-yK-(SucEtNH)<sub>3</sub>-LCA</b>	myr-GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPyK-Amid	$M_W = 3450,09 \text{ g/mol}$ $m/z_{\text{calc}} = 1724,9740 [M+2H]^{2+}$ $m/z_{\text{obs}} = 1725,4257 [M+2H]^{2+}$	

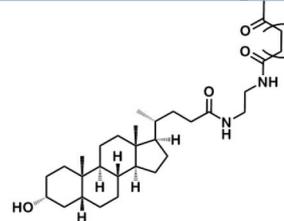
**HBVpreS/2-21-yK-C<sub>12</sub>EtNH-LCA**

$M_W = 3279,00 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1639,4663 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1639,4214 [M+2H]^{2+}$

myr-GT<sup>1</sup>NL<sup>2</sup>S<sup>3</sup>VP<sup>4</sup>N<sup>5</sup>PL<sup>6</sup>LG<sup>7</sup>FF<sup>8</sup>PD<sup>9</sup>H<sup>10</sup>Q<sup>11</sup>LD<sup>12</sup>Py<sup>13</sup>K<sup>14</sup>-Amid



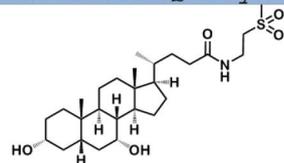
**HBVpreS/2-21-yK-Tauro-LCA**

$M_W = 3131,77 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1565,8687 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1565,4865 [M+2H]^{2+}$

myr-GT<sup>1</sup>NL<sup>2</sup>S<sup>3</sup>VP<sup>4</sup>N<sup>5</sup>PL<sup>6</sup>LG<sup>7</sup>FF<sup>8</sup>PD<sup>9</sup>H<sup>10</sup>Q<sup>11</sup>LD<sup>12</sup>Py<sup>13</sup>K<sup>14</sup>-Amid



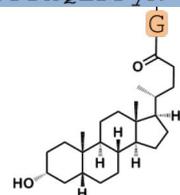
**HBVpreS/2-21-yK-G-LCA**

$M_W = 3081,69 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1540,8773 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1540,8657 [M+2H]^{2+}$

myr-GT<sup>1</sup>NL<sup>2</sup>S<sup>3</sup>VP<sup>4</sup>N<sup>5</sup>PL<sup>6</sup>LG<sup>7</sup>FF<sup>8</sup>PD<sup>9</sup>H<sup>10</sup>Q<sup>11</sup>LD<sup>12</sup>Py<sup>13</sup>K<sup>14</sup>-Amid



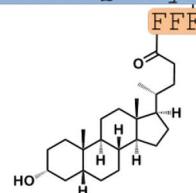
**HBVpreS/2-21-yK-FFF-LCA**

$M_W = 3466,16 \text{ g/mol}$

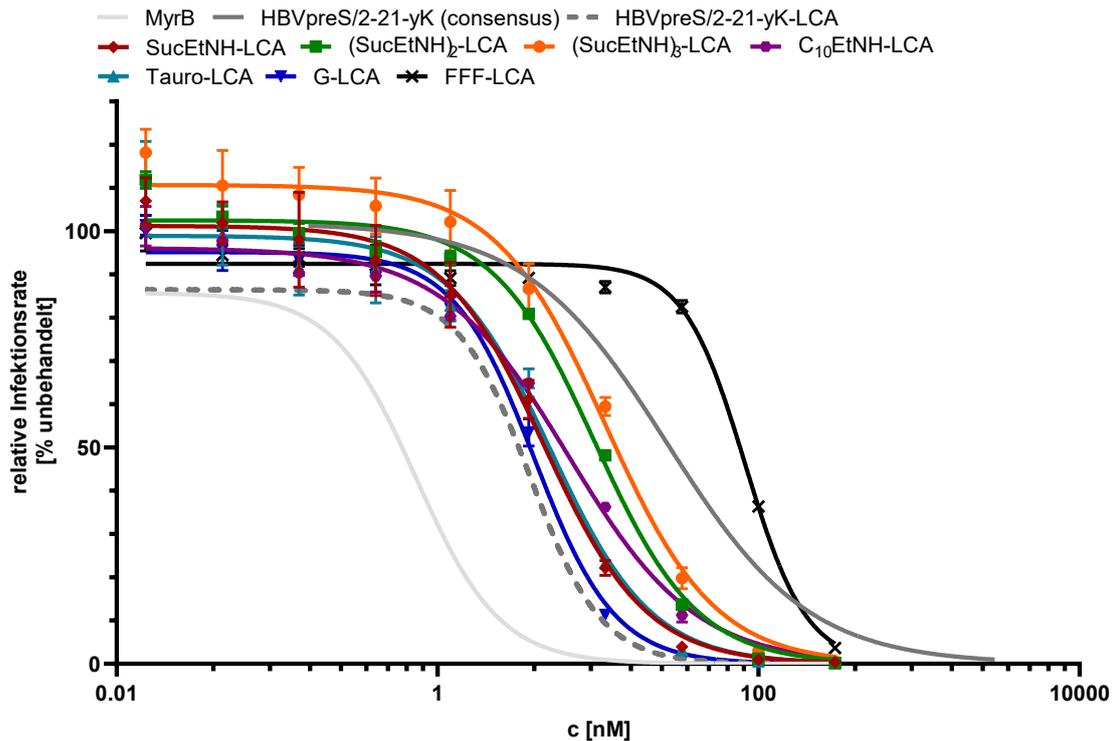
$m/z_{\text{calc}} = 1732,9692 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1732,9567 [M+2H]^{2+}$

myr-GT<sup>1</sup>NL<sup>2</sup>S<sup>3</sup>VP<sup>4</sup>N<sup>5</sup>PL<sup>6</sup>LG<sup>7</sup>FF<sup>8</sup>PD<sup>9</sup>H<sup>10</sup>Q<sup>11</sup>LD<sup>12</sup>Py<sup>13</sup>K<sup>14</sup>-Amid



Die aufgelisteten Peptide mit verschiedenen Linkern konnten in guter Ausbeute und Reinheit mit organo- und peptidchemischen Methoden synthetisiert werden. Anschließend wurden diese in einem HDV-Infektionsinhibitionsassay auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 gezeigt und die daraus berechneten IC<sub>50</sub>-Werte in Tabelle 3.15 gelistet.



**Abbildung 3.8:** Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit verschiedenen Linkern zwischen Peptid und der Gallensäure LCA. Verwendung von Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

**Tabelle 3.15:** Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte der Peptide mit unterschiedlichen Linkern zwischen Peptid und Gallensäure.

Substanz	IC <sub>50</sub> [nM]
HBVpreS/2-21-yK-SucEtNH-LCA	4,6
HBVpreS/2-21-yK-(SucEtNH) <sub>2</sub> -LCA	9,5
HBVpreS/2-21-yK-(SucEtNH) <sub>3</sub> -LCA	11,1
HBVpreS/2-21-yK-C <sub>12</sub> EtNH-LCA	6,5
HBVpreS/2-21-yK-Tauro-LCA	5,0
HBVpreS/2-21-yK-G-LCA	3,9
HBVpreS/2-21-yK-FFF-LCA	87,1

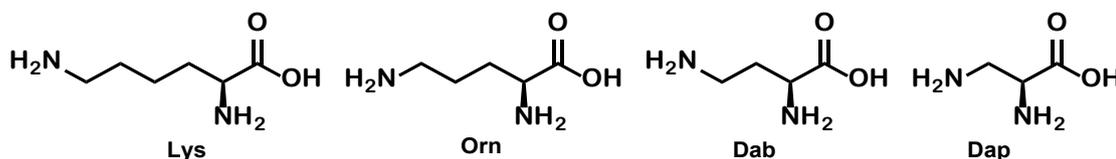
Bei Betrachtung der Peptid-Konjugate mit verschiedenen Linkern zwischen Peptid und Gallensäure war zu erkennen, dass bei allen Peptiden mit organochemischem Linker eine Verbesserung im Vergleich zum Referenzpeptid (HBVpreS/2-21-yK) eingetreten war. Der Linker, der aus Bernsteinsäure und Ethylendiamin aufgebaut und in drei verschiedenen Längen synthetisiert wurde, zeigt eine abnehmende HDV-Infektionsinhibition mit zunehmender Länge des Linkers. Durch die teilweise mehrmalige Verknüpfung der beiden Bausteine über Amidbindungen, nimmt auch die Steifigkeit des Linkers zu, da er nicht ausschließlich aus frei rotierbaren Einfachbindungen besteht. Als Vergleich wurde ein Linker aus Dodecandisäure und Ethylendiamin aufgebaut, welcher mit einer C<sub>12</sub>-Kette drei

Mal länger ist als ein Bernsteinsäure-Baustein. Die Länge dieses Linkers ist vergleichbar mit der Länge mit dem in HBVpreS/2-21-yK-(SucEtNH)<sub>2</sub>-LCA eingebauten, aus zwei Wiederholungseinheiten Bernsteinsäure und Ethylendiamin bestehenden, Linker. Mit einer IC<sub>50</sub> = 6,5 nM zeigt der Linker mit Dodecandisäure eine verbesserte Aktivität gegenüber HBVpreS/2-21-yK-(SucEtNH)<sub>2</sub>-LCA. Daher ist für die inhibitorische Aktivität gegenüber HDV nicht ausschließlich der Abstand zwischen Peptid und Gallensäure wichtig, sondern auch die Beweglichkeit des Linkers, die bei HBVpreS/2-21-yK-C<sub>12</sub>EtNH-LCA aufgrund der höheren Anzahl frei rotierbarer Einfachbindungen größer ist als bei HBVpreS/2-21-yK-(SucEtNH)<sub>2</sub>-LCA, da dadurch die Bindungstasche vermutlich besser adressiert werden kann.

Als weiterer Linker wurde Taurin getestet. Dies ist eine natürliche Modifikation, die zur Steigerung der Löslichkeit in der Gallensäurebiosynthese vorkommt<sup>[126, 130]</sup>. Zudem sind Thiole und Sulfonamide wichtige strukturelle Motive in biologisch aktiven Molekülen<sup>[166]</sup>. Auch als Bausteine in der Peptidsynthese werden Sulfonamide häufig verwendet. Durch die Sulfonamidbindung wurde eine Modifikation hervorgerufen, die einen signifikanten Einfluss auf die Polarität, auf den Säure-Base-Charakter und die Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbindung hat<sup>[167-168]</sup>. Zur Synthese wurden verschiedene Syntheseverfahren getestet, die nicht zum gewünschten Produkt führten oder sehr schlechte Ausbeuten hatten. Das Problem hierbei war die schlechte Löslichkeit der Gallensäuren. Der Weg über die Fmoc-Schützung von Taurin nach Paquet *et. al.* mit folgender Umsetzung zum Sulfonsäurechlorid nach Huang *et. al.* und anschließender Kopplung ans Peptid nach De Bond *et. al.*, wodurch die Gallensäure abschließend an der festen Phase gekoppelt werden konnte, führte zum Erfolg. Im HDV-Infektionsinhibitionsassay wurde für das Peptid (HBVpreS/2-21-yK-Tauro-LCA) ein IC<sub>50</sub> = 5,0 nM erhalten. Dies stellt eine Verbesserung zum Ausgangspeptidpeptid HBVpreS/2-21-yK dar. Neben den verschiedenen organochemischen Linkern wurden zudem Linker aus zusätzlich eingebauten Aminosäuren an der Lysinseitenkette getestet. Hierzu wurden Glycin und ein Triphenylalanin verwendet. Der kürzere, aus der polaren, ungeladenen Aminosäure Glycin bestehende Linker, führt zu einer Verbesserung der inhibitorischen Aktivität gegenüber dem Ausgangspeptid (IC<sub>50</sub> = 3,9 nM). Bei dem Triphenylalanin Linker, welcher einen hydrophoben Charakter aufweist, tritt eine Verschlechterung der inhibitorischen Aktivität im HDV-Infektionsinhibitionsassay, gegenüber dem Ausgangspeptid, ein.

Bei einem Vergleich der verschiedenen Peptide, mit zusätzlicher Modifikation durch die Verwendung eines Linkers zwischen Peptid und Gallensäure und somit Variation des Abstands, konnte bei allen Konjugaten eine Verbesserung gegenüber dem Referenzpeptid HBVpreS/2-21-yK erzielt werden, welcher jedoch auf den Einsatz der

Gallensäure zurückzuführen ist. Beim Vergleich mit dem Gallensäure-Peptid-Konjugat ohne weiteren Linker (HBVpreS/2-21-yK-LCA), kann eine Steigerung der HDV-Infektionsinhibition mit einer  $IC_{50} = 1,6 \text{ nM}$  beobachtet werden. Durch den Einsatz der verschiedenen Linker konnte keine zusätzliche Steigerung der inhibitorischen Aktivität erreicht werden. Es kann hierbei sogar eine Abnahme der inhibitorischen Aktivität mit steigender Länge der unterschiedlichen Linker beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass der Abstand der Konjugationsstelle der Gallensäure zum eigentlichen Peptid möglichst gering sein sollte, um eine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität gegenüber HDV zu erreichen. Eine Möglichkeit zur Steigerung der Infektionsinhibition wäre somit der Einsatz einer Aminosäure, die eine kürzere Seitenkette als Lysin und dennoch ein Seitenkettenamin besitzt. Hierbei wären zum Beispiel die unnatürlichen Aminosäuren Ornithin (Orn), Diaminobuttersäure (Dab) oder Diaminopropionsäure (Dap), die in Abbildung 3.9 dargestellt sind, denkbar.



**Abbildung 3.9: Vergleichende Darstellung von Lysin und den drei nicht natürlichen basischen Aminosäuren Ornithin, Diaminobuttersäure und Diaminopropionsäure.**

Bei diesen Aminosäuren handelt es sich ebenfalls um basische Aminosäuren, die, wie in Abbildung 3.9 zu sehen, statt vier Methylengruppen in der Seitenkette lediglich drei (Orn), zwei (Dab) oder eine (Dap) Methylengruppe besitzen. Dadurch wird der Abstand zwischen Peptid und Gallensäure verkürzt. Dies könnte einen positiven Einfluss auf die HDV-Infektionsinhibition ausüben.

### 3.2.5 Cyclische Peptide mit Variation der Konjugationsstelle der Gallensäure

Zunächst wurde ein von der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Sequenz abgeleitetes cyclisches Peptid synthetisiert. Zur Cyclisierung, welche durch Ausbildung einer Disulfidbrücke durchgeführt wurde, wurde hierzu an C- und N-Terminus ein zusätzliches Cystein eingeführt. Zusätzlich wurde die Gallensäure UDCA gekoppelt, um den Einfluss auf die HDV-Infektionsinhibition zu untersuchen. Die synthetisierten Peptide sind mit Sequenz, erwartetem und gemessenem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Molekulargewicht in Tabelle 3.1 aufgeführt. Das zur Kopplung von UDCA verwendete Lysin ist orange hinterlegt.

**Tabelle 3.16: Liste der cyclischen HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit und ohne Gallensäuremodifikation.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.

**cyclo-HBVpreS/2-21-yK**

$M_W = 2870,35 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1435,2244 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1435,4178 [M+2H]^{2+}$

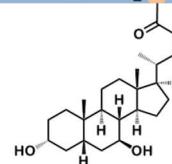


**cyclo-HBVpreS/2-21-yK-UDCA**

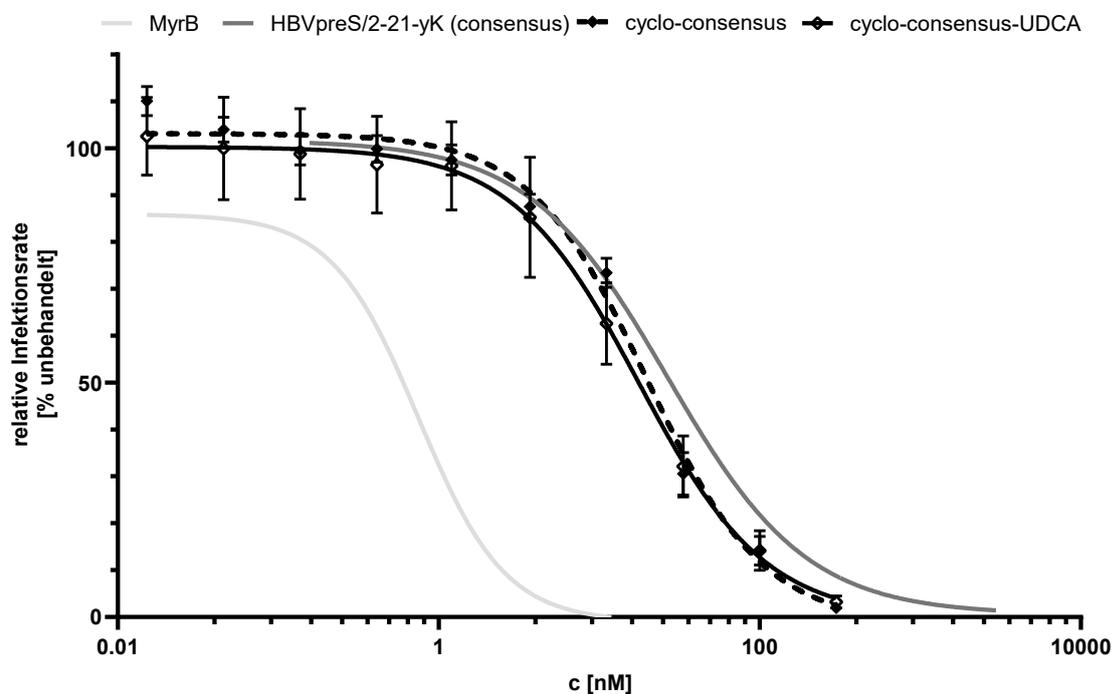
$M_W = 3244,91 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1622,3654 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1622,3437 [M+2H]^{2+}$



Im ersten Schritt wurde cyclo-HBVpreS/2-21-yK und cyclo-HBVpreS/2-21-yK-UDCA synthetisiert und die Disulfidbrücke ausgebildet. Danach wurden diese auf ihre HDV-Infektionsinhibition getestet. Die erhaltenen Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays sind in Abbildung 3.10 und die daraus berechneten  $IC_{50}$ -Werte in Tabelle 3.17 aufgeführt.



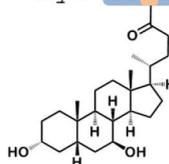
**Abbildung 3.10: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen von cyclo-HBVpreS/2-21-yK und cyclo-HBVpreS/2-21-yK-UDCA.** Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK (consensus) als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM beziehungsweise 3000 - 0,156 nM bei HBVpreS/2-21-yK (consensus). Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

**Tabelle 3.17: Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte der cyclischen HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit und ohne Gallensäuremodifikation.**

Substanz	IC <sub>50</sub> [nM]
cyclo-HBVpreS/2-21-yK	19,7
cyclo-HBVpreS/2-21-yK-UDCA	17,6

Beim Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte des cyclischen Peptids mit dem linearen Ausgangspeptid HBVpreS/2-21-yK zeigt das cyclische Peptid mit IC<sub>50</sub>=19,7 nM eine leicht höhere inhibitorische Aktivität im Vergleich zum linearen Peptid (IC<sub>50</sub>=26,7 nM). Durch die Konjugation der Gallensäure UDCA konnte diese noch minimal gesteigert werden. Der Unterschied war in diesem Fall jedoch nicht so groß, wie beim linearen Peptid mit zusätzlicher Gallensäurekonjugation.

Im Folgenden wurden nun weitere cyclische, von der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Sequenz abgeleitete, Peptide synthetisiert. Hierbei wurde die Position des Lysins, welches zur Konjugation der Gallensäure benötigt wird, variiert, um den Einfluss der Konjugationsstelle auf die inhibitorische Aktivität zu untersuchen und eine Steigerung der inhibitorischen Aktivität zu erreichen. Es wird vermutet, dass die Position der Gallensäure am Peptid ausschlaggebend für die Passform in die Bindetasche ist, da sowohl die preS/1-Bindetasche als auch die Gallensäurebindetasche optimal adressiert werden müssen, um eine maximale Bindung und Infektionsinhibition zu erreichen. Die synthetisierten Peptide sind mit Sequenz, erwartetem und gemessenem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Molekulargewicht in Tabelle 3.18 aufgeführt. Das zur Kopplung von UDCA verwendete Lysin ist jeweils orange hinterlegt.

**Tabelle 3.18: Liste der cyclischen HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit Variation der Konjugationsstelle der Gallensäure UDCA.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.**cyclo-HBVpreS/2-21-y (T3K)**myr-**CGK**NLSVPNPLGFFPDHQLDPyC-AmidM<sub>w</sub> = 2769,25 g/mom/z<sub>calc</sub> = 1384,7005 [M+2H]<sup>2+</sup>m/z<sub>obs</sub> = 1385,6495 [M+2H]<sup>2+</sup>**cyclo-HBVpreS/2-21-y (T3K)-UDCA**myr-**CGK**NLSVPNPLGFFPDHQLDPyC-AmidM<sub>w</sub> = 3143,80 g/molm/z<sub>calc</sub> = 1571,8416 [M+2H]<sup>2+</sup>m/z<sub>obs</sub> = 1572,7867 [M+2H]<sup>2+</sup>

**cyclo-HBVpreS/2-21-y (V7K)**



$M_W = 2771,22 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1385,6902 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1385,6653 [M+2H]^{2+}$

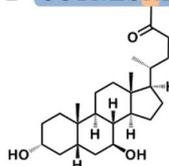
**cyclo-HBVpreS/2-21-y (V7K)-UDCA**



$M_W = 3145,76 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1572,8312 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1572,8020 [M+2H]^{2+}$



**cyclo-HBVpreS/2-21-y (F14K)**



$M_W = 2723,18 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1361,6902 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1361,6649 [M+2H]^{2+}$

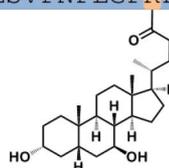
**cyclo-HBVpreS/2-21-y (F14K)**



$M_W = 3097,73 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1548,8312 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1548,8036 [M+2H]^{2+}$



**cyclo-HBVpreS/2-21-y (Q18K)**



$M_W = 2742,22 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1371,1951 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1371,1690 [M+2H]^{2+}$

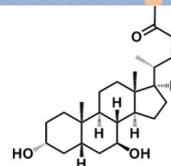
**cyclo-HBVpreS/2-21-y (Q18K)**



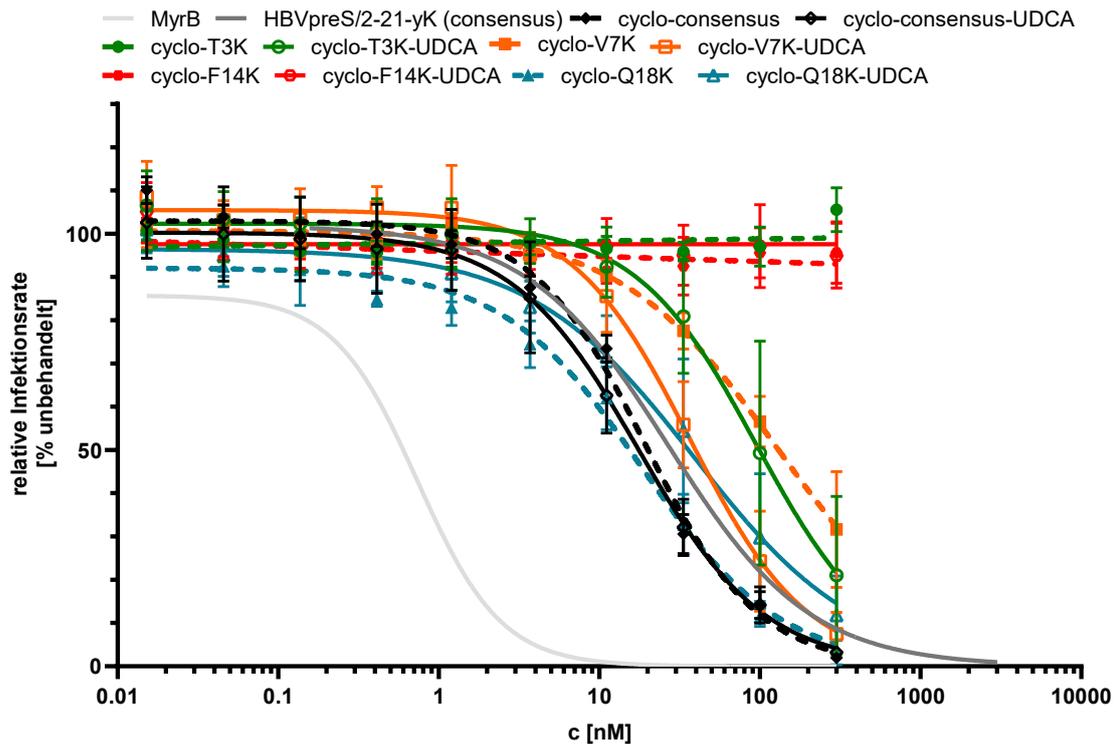
$M_W = 3116,78 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1558,3361 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1558,3093 [M+2H]^{2+}$



Auch diese Peptide konnten in guter Ausbeute synthetisiert und auf ihre HDV-Infektionsinhibition untersucht werden. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 3.11 vergleichend dargestellt. Die daraus berechneten  $IC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 3.19 aufgeführt.



**Abbildung 3.11: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der verschiedenen cyclischen HBVpreS/2-21-Peptide mit Variation der Konjugationsstelle von UDCA.** Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK (consensus) als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM beziehungsweise 3000 - 0,156 nM bei HBVpreS/2-21-yK (consensus). Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

**Tabelle 3.19: Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte der verschiedenen cyclischen HBVpreS/2-21-Peptide mit Variation der Konjugationsstelle von UDCA.**

Substanz	IC <sub>50</sub> [nM]
cyclo-HBVpreS/2-21-yT3K	n.b.
cyclo-HBVpreS/2-21-yT3K-UDCA	95,2
cyclo-HBVpreS/2-21-yV7K	128,5
cyclo-HBVpreS/2-21-yV7K-UDCA	36,4
cyclo-HBVpreS/2-21-yF14K	n.b.
cyclo-HBVpreS/2-21-yF14K-UDCA	n.b.
cyclo-HBVpreS/2-21-yQ18K	18,3
cyclo-HBVpreS/2-21-yQ18K-UDCA	39,1

Bei Betrachtung der in Abbildung 3.11 gezeigten Daten fällt auf, dass ein Tausch der Aminosäure Phenylalanin an Position 14 (F14K) und Threonin an Position 3 (T3K) zu einem vollständigen Verlust der inhibitorischen Aktivität führt. Durch Konjugation von UDCA konnte diese bei cyclo-HBVpreS/2-21-yT3K-UDCA wiederhergestellt werden, diese war mit IC<sub>50</sub> = 95,2 nM jedoch deutlich verringert, im Vergleich zum linearen Peptid. Cyclo-HBVpreS/2-21-yF14K-UDCA blieb dagegen auch nach Gallensäurekonjugation vollständig inaktiv. Diese Position ist somit vermutlich an der HDV-Inhibition mitbeteiligt. Bei einem Vergleich der verschiedenen Genotypen (siehe Abbildung 1.2) war ebenfalls

erkennbar, dass in dieser Position eine hohe Sequenzhomologie vorliegt und lediglich in zwei der zehn Genotypen ein Aminosäureaustausch von Phenylalanin zu Leucin vorliegt. Zudem liegt dieser Sequenzabschnitt innerhalb der essentiellen Domäne, die für die Interaktion und den Eintritt in die Zelle benötigt wird. Daher führt, wie zu erwarten, eine Modifikation innerhalb der Sequenz, mit zusätzlicher Konjugation eines sterisch anspruchsvollen Restes, zum Verlust der HDV-Infektionsinhibition *in vitro*. Das Peptid cyclo-HBVpreS/2-21-yV7K zeigt eine schlechtere inhibitorische Aktivität als das lineare HBV-preS/2-21-yK-Peptid. Auch hier konnte diese, durch die Konjugation der Gallensäure, wieder verbessert werden. Es konnte jedoch keine Verbesserung gegenüber dem linearen Ausgangspeptid erreicht werden. Bei einer Modifikation an Position 18 (Q18K) zeigt das Peptid ohne Gallensäure bereits eine verbesserte inhibitorische Aktivität gegenüber dem linearen Ausgangspeptid. Durch die folgende Konjugation von UDCA nimmt diese allerdings wieder ab.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Cyclisierung, über die Ausbildung einer Disulfidbrücke und anschließende Gallensäurekonjugation, die inhibitorische Aktivität, im Vergleich zum linearen HBVpreS/2-21-yK-Peptid, gesteigert werden konnte. Durch weitere Modifikationen in der Sequenz und somit der Verschiebung der Konjugationsstelle der Gallensäure konnte dies jedoch nicht weiter verbessert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass ein bestimmter Abstand zwischen Myristinsäure, essentieller Domäne und Gallensäure vorliegen muss, um eine ausreichende Interaktion mit den Zellen zu gewährleisten und somit eine HDV-Infektion zu inhibieren, da nur beim richtigen Abstand beide Bindungstaschen adressiert werden können. Zudem darf die Modifikation durch die Gallensäure nicht innerhalb der essentiellen Domäne durchgeführt werden. Dies führt zu einem vollständigen Verlust der HDV-Virusinhibition, da durch die zusätzliche Gallensäure und somit einer sterischen Hinderung die Interaktion gestört wird. Generell kann bei Verwendung der cyclischen Peptide durch zusätzliche Gallensäurekonjugation innerhalb der Peptidsequenz kein positiver Effekt auf die HDV-Inhibition erreicht werden. Lediglich die zunächst synthetisierte cyclo-HBVpreS/2-21-yK, bei der die Konjugationsstelle zusätzlich angefügt wurde, zeigt nach Gallensäurekonjugation eine Verbesserung der HDV-Infektionsinhibition *in vitro* gegenüber dem cyclischen Peptid ohne Gallensäure.

### **3.2.6 Synthese und Kopplung von Gallensäuredimeren**

Als Versuch zur weiteren Steigerung der inhibitorischen Aktivität gegenüber HDV wurden verschiedene Gallensäuredimere synthetisiert und ebenso an das HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptid gekoppelt. Hierbei wurden sowohl Dimere einer Gallensäure als auch gemischte Dimere synthetisiert. Zudem wurden unterschiedliche Verknüpfungsarten der

zwei Gallensäuren getestet. Es wurden Kopf-Schwanz-Verknüpfungen (C3-C24) oder Schwanz-Schwanz-Verknüpfung (C3-C3) durchgeführt. Bei der Synthese wurde ebenso variiert zwischen direkter Verknüpfung der Gallensäuren, oder dem Aufbau über einen Linker um den Abstand zwischen den Gallensäuren zu verändern, da auch dies einen Einfluss auf die Bindung haben kann.

Zunächst werden die Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate untersucht, welche durch direkte Kopf-Schwanz-Verknüpfung der gleichen Gallensäure hergestellt wurden. Die Verknüpfung wurde über eine Esterbindung gebildet. Als Vergleich wurde für LCA ebenso ein Gallensäuredimer durch Ausbildung einer Amidbindung synthetisiert. Zudem wurde ein Dimer aus LCA, bei dem die Hydroxy-Gruppe an Position 3 zum Keton oxidiert wurde und somit keine freie Hydroxy-Gruppe mehr vorliegt, hergestellt. Die synthetisierten Konjugate, bestehend aus Peptid und Gallensäuredimer, sind mit Sequenz, erwartetem und gemessenem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Molekulargewicht in Tabelle 3.20 aufgeführt.

**Tabelle 3.20: Liste der synthetisierten Peptide mit Modifikation durch verschiedene direkte Kopf-Schwanz verknüpfte Gallensäuredimere.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.

---

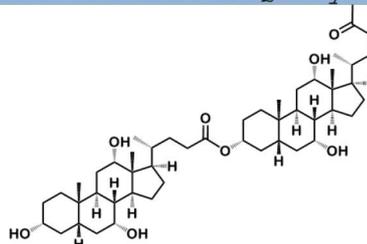
**HBVpreS/2-21-yK-CA-CA**

$M_W = 3447,19 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1723,5000 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1723,4674 [M+2H]^{2+}$

myr-GT~~NLSV~~PNPLGFFPDHQLDPyK-Amid




---

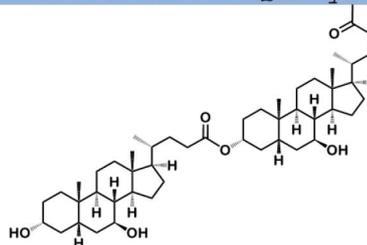
**HBVpreS/2-21-yK-UDCA-UDCA**

$M_W = 3414,00 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1707,5051 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1707,4739 [M+2H]^{2+}$

myr-GT~~NLSV~~PNPLGFFPDHQLDPyK-Amid




---

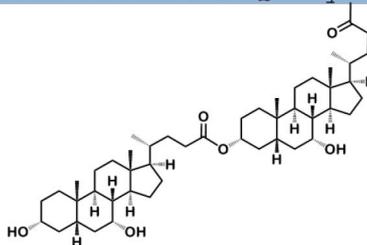
**HBVpreS/2-21-yK-CDCA-CDCA**

$M_W = 3414,00 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1707,5051 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1707,4937 [M+2H]^{2+}$

myr-GT~~NLSV~~PNPLGFFPDHQLDPyK-Amid



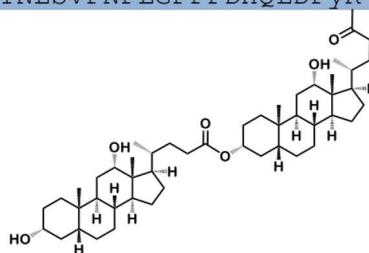
**HBVpreS/2-21-yK-DCA-DCA**

$M_W = 3414,00 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1707,5051 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1707,4911 [M+2H]^{2+}$

myr-GT~~NTLSV~~PNPLGFFPDHQLDPyK-Amid



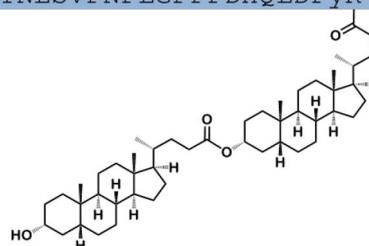
**HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA**

$M_W = 3383,19 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1691,5102 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1692,2562 [M+2H]^{2+}$

myr-GT~~NTLSV~~PNPLGFFPDHQLDPyK-Amid



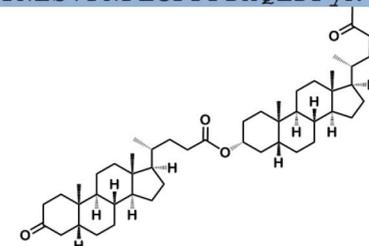
**HBVpreS/2-21-yK-LCA-Oxo-LCA**

$M_W = 3382,18 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1691,0063 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1689,4050 [M+2H]^{2+}$

myr-GT~~NTLSV~~PNPLGFFPDHQLDPyK-Amid



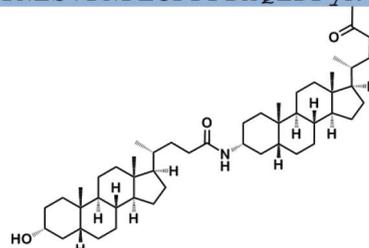
**HBVpreS/2-21-yK-LCA-NH-LCA**

$M_W = 3382,2076 \text{ g/mol}$

$m/z_{\text{calc}} = 1691,0182 [M+2H]^{2+}$

$m/z_{\text{obs}} = 1692,2465 [M+2H]^{2+}$

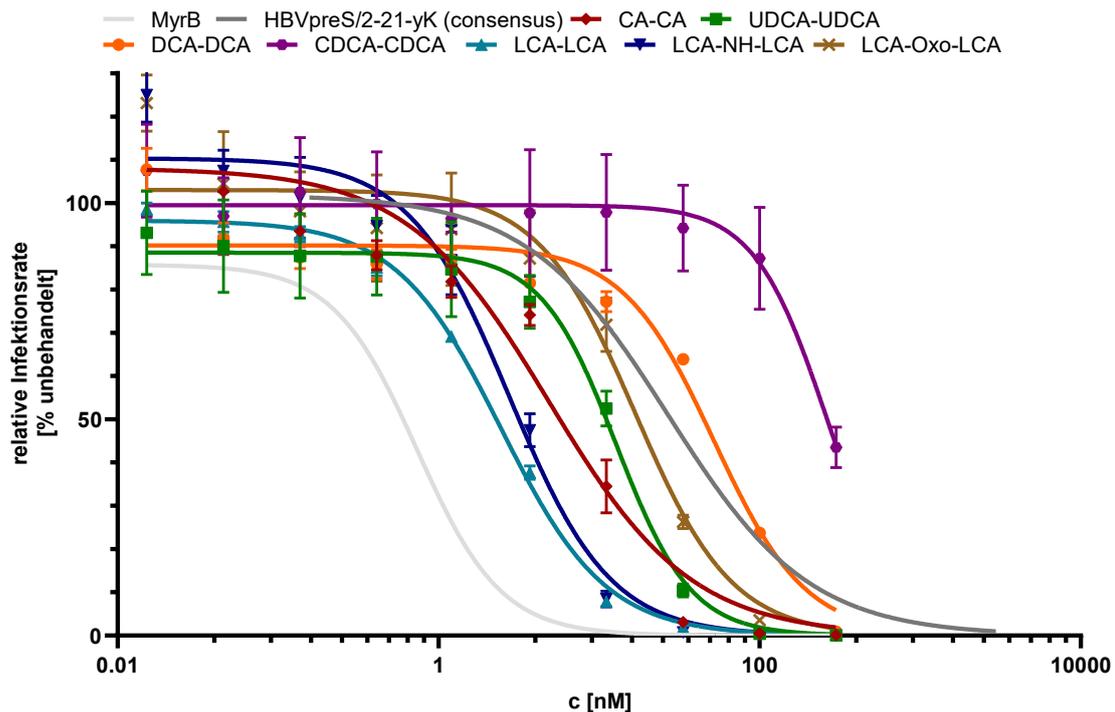
myr-GT~~NTLSV~~PNPLGFFPDHQLDPyK-Amid



Für die Synthese, der über eine Esterbindung verknüpften Dimere, konnte ein bereits publiziertes und gut funktionierendes Verfahren angewendet werden und die Gallensäuredimere in guter Ausbeute und Reinheit synthetisiert werden<sup>[169-170]</sup>. Die Synthese des Dimers, mit der Verknüpfung der beiden Gallensäure über ein Amid, war hier aufwendiger, da zunächst die Hydroxy-Gruppe an Position C3 über mehrere Syntheseschritte in ein Amin überführt werden musste<sup>[169, 171]</sup>. Besonders die Umsetzung des Azids zum Amin führte zu einigen Problemen, da hier die verschiedensten milden Methoden, welche ein Azid umsetzen, aber die Benzyl-Schutzgruppe nicht abspalten sollten, nicht zum Erhalt des gewünschten Produkts führten<sup>[172-174]</sup>. Aus diesem Grund war es nötig, bereits in diesem Schritt, mittels katalytischer Hydrierung, das Azid zum Amin zu überführen und gleichzeitig die Benzylschutzgruppe zu entfernen. Die Verknüpfung der beiden Gallensäurebausteine konnte anschließend dennoch erfolgreich durchgeführt

werden. Durch die größere Anzahl an Syntheseschritten war die Ausbeute jedoch geringer, im Vergleich zu den Gallensäuredimern mit Esterbindung.

Auch bei der Konjugation der Gallensäuredimere an das Peptid musste eine Optimierung der Reaktionsbedingungen durchgeführt werden, da die standardmäßig zur Kopplung verwendete Methode mit HBTU als Aktivierungsreagenz (siehe Kapitel 5.2.1.5) kein Produkt lieferte. Dies ist vermutlich auf den größeren sterischen Anspruch und der dadurch verminderten Reaktivität der Gallensäuredimere zurückzuführen. Aus diesem Grund wurden sowohl verschiedene Aktivierungsreagenzien aus den unterschiedlichen Substanzklassen (siehe Kapitel 1.4), als auch verlängerte Reaktionszeiten untersucht. Durch die Verwendung von HATU, einem stärkeren Aktivierungsreagenz, und einer Reaktionszeit von 3 h bei RT (siehe Kapitel 5.2.1.7) konnten die Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate in guter Ausbeute und Reinheit erhalten werden. Anschließend wurden diese in einem HDV-Infektionsinhibitionsassay auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 gezeigt und die daraus berechneten  $IC_{50}$ -Werte in Tabelle 3.21 gelistet.



**Abbildung 3.12:** Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit Konjugation verschiedener direkt Kopf-Schwanz verknüpfter Gallensäuredimere an Lysin. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

**Tabelle 3.21: Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte der HBVpreS/2-21-yK-Peptide (consensus) mit Konjugation verschiedener direkt Kopf-Schwanz verknüpfter Gallensäuredimere.**

Substanz	IC <sub>50</sub> [nM]
HBVpreS/2-21-yK-CA-CA	4,9
HBVpreS/2-21-yK-UDCA-UDCA	12,8
HBVpreS/2-21-yK-CDCA-CDCA	264,5
HBVpreS/2-21-yK-DCA-DCA	51,8
HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA	2,4
HBVpreS/2-21-yK-LCA-NH-LCA	2,7
HBVpreS/2-21-yK-LCA-Oxo-LCA	16,8

Bei Betrachtung der in Abbildung 3.12 und Tabelle 3.21 gezeigten Ergebnisse fällt auf, dass große Unterschiede in der inhibitorischen Aktivität zwischen den verschiedenen Gallensäuredimer-Peptid-Konjugaten vorliegen. Das Konjugat, das als Dimer CDCA-CDCA besitzt, zeigt hierbei mit einer IC<sub>50</sub> = 264,5 nM die schlechteste inhibitorische Aktivität. Dieses Dimer besitzt insgesamt drei freie Hydroxy-Gruppen in 3'α-, 7'α- und 7α-Position. Die beiden weiteren Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate, die ebenfalls drei freie Hydroxy-Gruppen tragen, zeigten eine deutlich bessere HDV-Infektionsinhibition. Hierbei handelt es sich um die Peptide mit den Gallensäuredimeren DCA-DCA, welches Hydroxy-Gruppen in 3'α-, 12'α- und 12α-Position und UDCA-UDCA, welches Hydroxy-Gruppen in 3'α-, 7'β- und 7β-Position besitzt. Besonders erstaunlich war die unterschiedliche inhibitorische Aktivität zwischen den Konjugaten mit UDCA-UDCA und CDCA-CDCA, da hier die Position der Hydroxy-Gruppen identisch ist und der Unterschied lediglich in der Konfiguration liegt. Dieser Unterschied führt zu einer Steigerung der IC<sub>50</sub> = 264,5 nM (CDCA-CDCA) zu IC<sub>50</sub> = 12,8 nM (UDCA-UDCA). Bei einem Vergleich der beiden dimeren Verbindungen mit den zugehörigen monomeren Gallensäure-Peptid-Konjugaten (siehe Kapitel 3.2.1), war der Unterschied deutlich geringer (CDCA: IC<sub>50</sub> = 5,6 nM; UDCA: IC<sub>50</sub> = 11,2 nM) und die HDV-Infektionsinhibition von CDCA war, im Vergleich zu UDCA, welches als Dimer das deutlich bessere Ergebnis in der HDV-Infektionsinhibition zeigt, minimal gesteigert. Das Gallensäuredimer-Peptid-Konjugat mit DCA-DCA, welches als Gallensäuremonomer-Peptid-Konjugat eine sehr gute inhibitorische Aktivität zeigt (IC<sub>50</sub> = 1,2 nM, Kapitel 3.2.1), besitzt ebenfalls nur eine mäßige inhibitorische Aktivität (IC<sub>50</sub> = 51,8 nM), die keine Verbesserung zum Ausgangspeptid HBVpreS/2-21-yK darstellt. Eine Steigerung der inhibitorischen Aktivität war bei dem Gallensäuredimer-Peptid-Konjugat mit CA-CA, welches fünf Hydroxy-Gruppen besitzt, mit einer IC<sub>50</sub> = 4,9 nM zu beobachten. Lediglich die verschieden verknüpften Gallensäuredimere aus LCA, welche über eine Hydroxy-Gruppe verfügen, besitzen noch eine höhere inhibitorische Aktivität. Auch das Gallensäuredimer, mit der zum Keton oxidierten Hydroxy-

Gruppe, zeigt eine gesteigerte HDV-Infektionsinhibition im Vergleich zum Ausgangspeptid, jedoch war diese geringer als bei den Konjugaten mit LCA-LCA und LCA-NH-LCA. Bei diesen wurde die Hydroxy-Gruppe nicht reduziert, sodass sie als Interaktionspartner, zum Beispiel zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit der Bindungstasche, zur Verfügung steht. Die Struktur der Bindungstasche des NTCP ist noch nicht vollständig charakterisiert, durch den beobachteten Unterschied der inhibitorischen Aktivität der beiden Verbindungen, wenn die 3'-Hydroxygruppe als Keton vorliegt, scheint diese jedoch für den inhibitorischen Effekt gegenüber HDV benötigt zu werden. Bei Vergleich der beiden Peptide, die jeweils ein Dimer aus LCA konjugiert haben, bei dem die Verknüpfung einmal über einen Ester (HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA) und einmal über ein Amid (HBVpreS/2-21-yK-LCA-NH-LCA) durchgeführt wurde, kann bei beiden Peptiden eine sehr gute inhibitorische Aktivität beobachtet werden. Diese liegt mit einer  $IC_{50} = 2,4$  nM bei HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA beziehungsweise  $IC_{50} = 2,7$  nM bei HBVpreS/2-21-yK-LCA-NH-LCA für beide Peptide im gleichen Bereich und zeigt, im Vergleich mit den anderen Gallensäuredimer-Peptid-Konjugaten, die beste inhibitorische Aktivität. Die Synthese der beiden Dimerbausteine war hier, wie zuvor erläutert, unterschiedlich aufwendig. Während das über einen Ester aufgebaute Dimer (LCA-LCA) nach Benzyl-Schützung von LCA in einem Schritt aufgebaut werden kann, sind bei dem Dimer mit Amid-Verknüpfung (LCA-NH-LCA) vier Reaktionsschritte nötig. Dennoch bietet dieses auch Vorteile, da Amide im Gegensatz zu Estern mesomeriestabilisiert sind. Diese Mesomerie-Stabilisierung führt zu einer Reaktionsträgheit der Amide, wodurch eine gesteigerte Beständigkeit gegenüber hydrolytischen Bedingungen vorliegt. Dieser Effekt ist dadurch zu erklären, dass das zentrale Kohlenstoff-Atom bei Amiden nicht positiv polarisiert ist und deswegen der Angriff eines Hydroxid-Ions erschwert wird<sup>[175]</sup>. Aus diesem Grund kann ebenfalls eine höhere Stabilität unter physiologischen Bedingungen erreicht werden<sup>[176]</sup>. Dies konnte in einem durchgeführten CYP P450-Assay (siehe Kapitel 3.4.3) bestätigt werden.

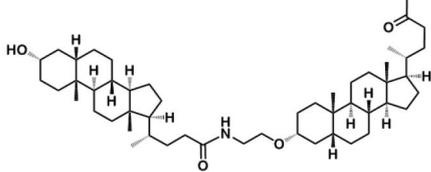
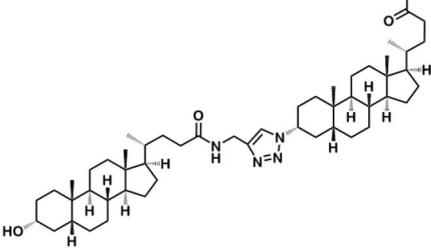
Ein weiterer Aspekt der Synthese der synthetisierten Gallensäuredimere ist, dass versucht wurde, diese durch Verknüpfung der 3-OH Position mit der Säuregruppe der zweiten Gallensäure durchzuführen. Es konnte schon von verschiedenen Gruppen bestätigt werden, dass dies die mit Abstand reaktivste Position ist<sup>[177-179]</sup>. Aus diesem Grund, wurde keine weitere Schützung der anderen Hydroxy-Gruppen durchgeführt. Es kann daher allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass bei den Dimeren aus CA, UDCA, CDCA und DCA Mischprodukte entstanden sind, da neben der 3-OH Position weitere, wenn auch weniger reaktive Positionen, vorhanden sind. Auf die Schützung der weiteren Positionen wurde bewusst verzichtet, da durch die zusätzlichen Reaktionsschritte eine Abnahme der Ausbeute zu erwarten wäre. Zudem kann es bei der Reaktion an Stereozentren, wozu die

OH-Positionen in Gallensäuren zählen, zur Ausbildung von verschiedenen Stereoisomeren kommen, die im schlimmsten Fall bei der Aufreinigung nicht voneinander getrennt werden können.

Durch die Synthese der direkt Kopf-Schwanz verknüpften Gallensäuredimere und anschließende Konjugation an HBVpreS/2-21-yK konnte nur eine geringe Steigerung der inhibitorischen Aktivität im Vergleich zu den Gallensäuremonomeren erzielt werden. Ebenso wäre für eine Synthese mit höherer Ausbeute eine bessere Kopplungseffizienz und somit eine weitere Optimierung der Konjugation des Gallensäuredimers an das Peptid nötig. Eine Möglichkeit hierzu wäre eine weitere Änderung der Aktivierungsreagenzien, beziehungsweise der Reaktionsbedingungen. Ebenso wäre es möglich, statt des Einsatzes verschiedener Aktivierungsreagenzien, die Gallensäuredimere als Aktivester herzustellen. Hierzu ist nach erfolgter Synthese ein weiterer Syntheseschritt vor der Kopplung an das Peptid nötig, der jedoch oftmals quantitativ abläuft. Die Umsetzung wäre hier zum Beispiel mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) oder *N, N, N', N'*-Tetramethyl-O-uroniumtetrafluorborat (TSTU) denkbar<sup>[180]</sup>.

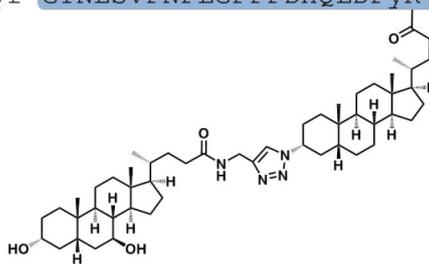
Als Versuch zur weiteren Verbesserung der HDV-Infektionsinhibition wurden weitere Dimere synthetisiert. Bei diesen wurden die beiden Gallensäurebausteine unter Verwendung verschiedener Linker miteinander verknüpft. Hierbei wurden sowohl Kopf-Schwanz als auch Schwanz-Schwanz verknüpfte Dimere synthetisiert. Die synthetisierten Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate sind mit Sequenz, erwartetem und gemessenem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Molekulargewicht in Tabelle 3.22 aufgeführt.

**Tabelle 3.22: Liste der synthetisierten Peptide mit Modifikation durch verschiedene über Linker verknüpfte Gallensäuredimere.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.

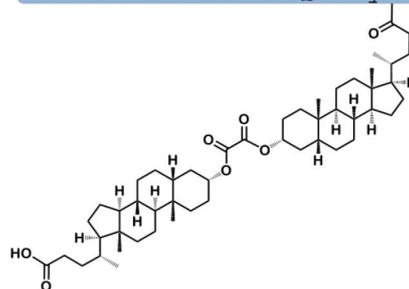
<p><b>HBVpreS/2-21-yK-LCA-EG-NH-LCA</b></p> <p><math>M_W = 3426,26 \text{ g/mol}</math>  <math>m/z_{\text{calc}} = 1713,0313 [M+2H]^{2+}</math>  <math>m/z_{\text{obs}} = 1713,4425 [M+2H]^{2+}</math></p>	<p>myr-GTNLSVNPPLGFFPDHQLDPyK-Amid</p> 
<p><b>HBVpreS/2-21-yK-LCA-Triazol-LCA</b></p> <p><math>M_W = 3463,28 \text{ g/mol}</math>  <math>m/z_{\text{calc}} = 1731,5345 [M+2Na]^{2+}</math>  <math>m/z_{\text{obs}} = 1731,4886 [M+2Na]^{2+}</math></p>	<p>myr-GTNLSVNPPLGFFPDHQLDPyK-Amid</p> 

**HBVpreS/2-21-yK-LCA-Triazol-UDCA**

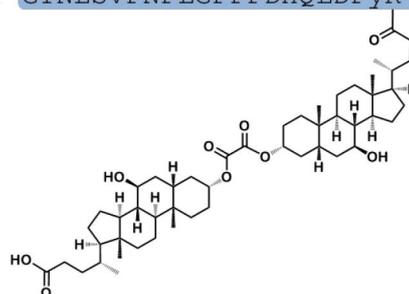
myr-GTNSVNPPLGFFPDHQLDPyK-Amid

 $M_W = 3479,28 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1761,5139 [M+2Na]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1761,5645 [M+2Na]^{2+}$ **HBVpreS/2-21-yK-LCA-Oxalyl-LCA**

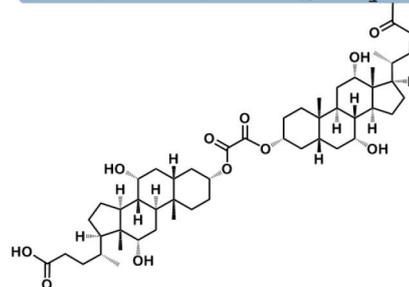
myr-GTNSVNPPLGFFPDHQLDPyK-Amid

 $M_W = 3455,21 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1727,5026 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1727,4899 [M+2H]^{2+}$ **HBVpreS/2-21-yK-UDCA-Oxalyl-UDCA**

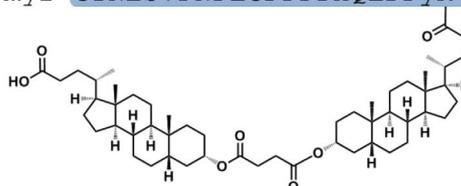
myr-GTNSVNPPLGFFPDHQLDPyK-Amid

 $M_W = 3487,21 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1743,4975 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1743,4484 [M+2H]^{2+}$ **HBVpreS/2-21-yK-CA-Oxalyl-CA**

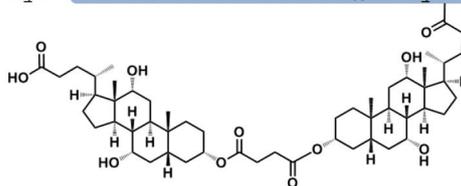
myr-GTNSVNPPLGFFPDHQLDPyK-Amid

 $M_W = 3519,21 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1759,4924 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1758,9657 [M+2H]^{2+}$ **HBVpreS/2-21-yK-LCA-Succinyl-LCA**

myr-GTNSVNPPLGFFPDHQLDPyK-Amid

 $M_W = 3483,27 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1562,3746 [M+2H-C_{24}H_{39}O_2]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1562,3207 [M+2H-C_{24}H_{40}O_2]^{2+}$ **HBVpreS/2-21-yK-CA-Succinyl-CA**

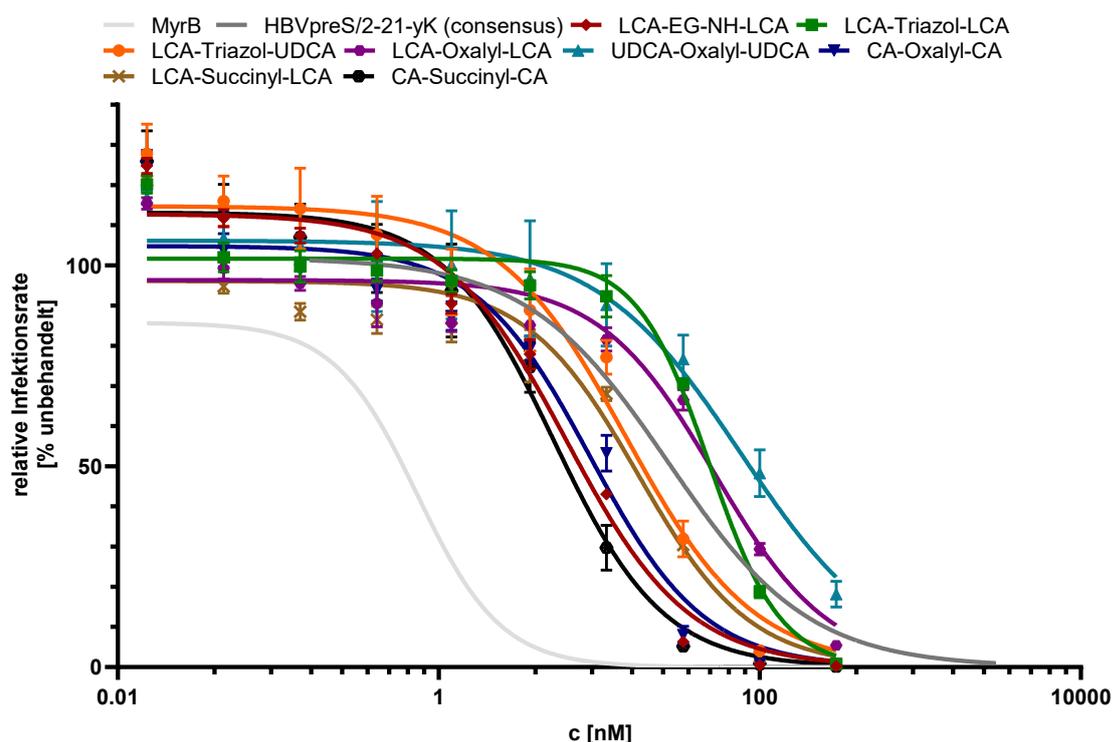
myr-GTNSVNPPLGFFPDHQLDPyK-Amid

 $M_W = 3547,26 \text{ g/mol}$  $m/z_{\text{calc}} = 1773,5080 [M+2H]^{2+}$  $m/z_{\text{obs}} = 1773,4784 [M+2H]^{2+}$ 

Bei der Synthese der verschiedenen über Linker verknüpften Gallensäuredimere, mussten verschiedene Optimierungen der Reaktionsparameter durchgeführt werden. Die Synthese der über einen Oxalyl- beziehungsweise Succinyl-Linker Schwanz-Schwanz verknüpften Dimere konnte nicht, wie in der Literatur<sup>[170]</sup> angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt werden, sondern es war eine Steigerung der Temperatur auf 35 °C, zur Bildung der jeweiligen Produkte, nötig. Für die Synthese der über 1,2,3-Triazol-Ringe verknüpften Gallensäuren konnte das Standardprotokoll über die Kupferkatalysierte Cycloaddition mit Mikrowellenreaktion durchgeführt werden<sup>[181-182]</sup>. Diese Reaktionsführung ist stereoselektiv für die Bildung des 1,4-Regioisomers<sup>[183]</sup>.

Die gelisteten Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate konnten in ausreichender Ausbeute und guter Reinheit synthetisiert werden. Aufgrund der Schwierigkeit der Kopplung der Gallensäuredimere an das Peptid, wurden hier direkt die geänderten Reaktionsparameter angewendet (siehe Kapitel 5.2.1.7).

Anschließend wurden diese in einem HDV-Infektionsinhibitionsassay auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 gezeigt und die daraus berechneten IC<sub>50</sub>-Werte in Tabelle 3.23 gelistet.



**Abbildung 3.13: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit Konjugation verschiedener Gallensäuredimere mit Verknüpfung über unterschiedliche Linker.** Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

**Tabelle 3.23: Übersicht der IC<sub>50</sub>-Werte der HBVpreS/2-21-yK-Peptide (consensus) mit Modifikation durch verschiedene über Linker verknüpfte Gallensäuredimere.**

Substanz	IC <sub>50</sub> [nM]
HBVpreS/2-21-yK-LCA-EG-NH-LCA	6,2
HBVpreS/2-21-yK-LCA-Triazol-LCA	48,3
HBVpreS/2-21-yK-LCA-Triazol-UDCA	14,6
HBVpreS/2-21-yK-LCA-Oxalyl-LCA	52,3
HBVpreS/2-21-yK-UDCA-Oxalyl-UDCA	76,6
HBVpreS/2-21-yK-CA-Oxalyl-CA	8,8
HBVpreS/2-21-yK-LCA-Succinyl-LCA	17,4
HBVpreS/2-21-yK-CA-Succinyl-CA	5,2

Bei einem Vergleich der drei über einen Linker Kopf-Schwanz-verknüpften Peptide (HBVpreS/2-21-yK-LCA-EG-NH-LCA, HBVpreS/2-21-yK-LCA-Triazol-LCA und HBVpreS/2-21-yK-LCA-Triazol-UDCA), zeigt das Peptid mit dem Linker aus Ethylenglykol zwischen den beiden LCA-Bausteinen (HBVpreS/2-21-yK-LCA-EG-NH-LCA) die größte inhibitorische Aktivität mit einer IC<sub>50</sub> = 6,2 nM. Im direkten Vergleich hierzu besitzt das Peptid, welches ebenfalls aus zwei LCA-Bausteinen aufgebaut und über einen Triazol-Ring als Linker (HBVpreS/2-21-yK-LCA-Triazol-LCA) verknüpft wurde, eine deutlich geringere HDV-Virusinfektionsinhibition mit einer IC<sub>50</sub> = 48,3 nM. Bei Betrachtung der chemischen Struktur der beiden Linker, handelt es sich bei Ethylenglykol um einen aus frei drehbaren Einzelbindungen bestehenden Linker, der über eine Ester- und eine Amidbindung mit den beiden Gallensäuren verknüpft ist. Dadurch kann die räumliche Orientierung der zweiten Gallensäure variieren und die Bindung an die Bindungstasche von NTCP und somit die Virusinfektionsinhibition maximiert werden. Der Triazol-Ring hingegen ist ein heteroaromatischer Fünfring. Dieser ist vergleichsweise starr und schränkt die freie Drehbarkeit ein. Zudem nimmt die Elektronendichte aufgrund des aromatischen Systems zu. Bei Betrachtung von Dimeren mit einer Triazol-Verknüpfung, ohne weitere Konjugation eines Peptids, konnten von Liu *et al.* gute inhibitorische Effekte auf die HDV/HBV-Infektion gezeigt werden<sup>[125]</sup>. Das vergleichbare Kopf-Schwanz-verknüpfte Dimer (UDCA-Triazol-UDCA) zeigte hier eine IC<sub>50</sub> = 25 nM, welches mit die beste HDV/HBV-Inhibition der von Liu *et al.* untersuchten reinen Gallensäuredimere darstellt<sup>[125]</sup>. Dieser positive Effekt geht durch die zusätzliche Konjugation des Peptids verloren. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass, durch die eingeschränkte Drehbarkeit des Dimers mit Triazol-Verknüpfung und der zusätzlichen Peptid-Konjugation, die Bindestelle aufgrund sterischer Gegebenheiten nicht mehr adressiert werden kann. Somit ist die inhibitorische Aktivität der Gallensäure-Peptid-Konjugate, sowohl bei Monomeren, als auch bei Dimeren, gesteigert, im Vergleich zu den inhibitorischen Eigenschaften der verschiedenen reinen Gallensäuredimere. Durch die Verwendung von

UDCA statt LCA als zweiten Bestandteil im über Triazol verknüpften Dimer (HBVpreS/2-21-yK-LCA-Triazol-UDCA), konnte die HDV-Infektionsinhibition durch die zusätzliche Hydroxy-Gruppe auf eine  $IC_{50} = 14,6$  nM erhöht werden. Dies war eine Verbesserung, im Vergleich zum Ausgangspeptid, jedoch keine Steigerung zum Peptid mit Ethylenglykol-Linker. Ebenso war die inhibitorische Aktivität bei allen Peptiden, mit über einen Linker Kopf-Schwanz verknüpften Gallensäuredimeren, geringer, als beim Konjugat mit direkt verknüpftem LCA-Dimer. Durch die Einführung der Linker bei Kopf-Schwanz-Verknüpfung, konnte somit keine weitere Steigerung der HDV-Infektionsinhibition erreicht werden.

Werden nun die Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate betrachtet, bei denen die Dimere über einen Linker Schwanz-Schwanz verknüpft wurden, sind auch hier Unterschiede in der inhibitorischen Aktivität zu erkennen. Die geringste inhibitorische Aktivität zeigt das mit dem kürzeren Oxalyl-Linker verknüpften UDCA-Dimer mit einer  $IC_{50} = 76,6$  nM, das zudem eine Verschlechterung gegenüber dem Ausgangspeptid HBVpreS/2-21-yK darstellt. Das Gallensäuredimer-Peptid-Konjugat mit LCA-Dimer, welches über einen Oxalyl-Linker verknüpft wurde ( $IC_{50} = 52,3$  nM), besitzt ebenso eine verschlechterte inhibitorische Aktivität. Lediglich das Gallensäuredimer-Peptid-Konjugat, mit über Oxalyl-Linker verknüpften CA-Dimer, bewirkt eine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität auf eine  $IC_{50} = 8,8$  nM. Generell zeigen die Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate mit Oxalyl-Linker eine verringerte HDV-Infektionsinhibition im Vergleich mit den Gallensäuredimer-Peptid-Konjugaten, bei denen die Dimere über einen Succinyl-Linker verknüpft wurden. Hier besitzen sowohl das Gallensäuredimer-Peptid-Konjugat mit LCA-Succinyl-LCA ( $IC_{50} = 17,4$  nM), als auch das mit CA-Succinyl-CA ( $IC_{50} = 5,2$  nM) eine verbesserte HDV-Infektionsinhibition gegenüber dem Ausgangspeptid. Diese Steigerung bei Verwendung des längeren Succinyl-Linkers könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die zusätzlichen Einfachbindungen zwischen den beiden Gallensäurebausteinen die Flexibilität gesteigert war und dadurch mehr Möglichkeiten in der räumlichen Anordnung gegeben sind. Bei allen Gallensäuredimer-Peptid-Konjugaten mit Schwanz-Schwanz verknüpften Gallensäuren, haben die Varianten mit CA die höchste inhibitorische Aktivität. Dies könnte auf die höhere Anzahl der Hydroxy-Gruppen zurückzuführen sein. Bei LCA war, nach der Verknüpfung der beiden Bausteine, keine freie Hydroxy-Gruppe mehr vorhanden, bei CA stehen jedoch noch vier Hydroxy-Gruppen zur Interaktion mit der Bindetasche zur Verfügung. Diese verleihen den Gallensäuren, wie in Kapitel 1.3 erläutert, die polaren und hydrophilen Eigenschaften. Ebenso können diese Hydroxy-Gruppen als Protonendonatoren bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen agieren und somit zur Verstärkung der intermolekularen Wechselwirkung mit der Bindetasche des NTCP beitragen. Da im Fall der Schwanz-Schwanz-Verknüpfung die Verlängerung des

Linkers zwischen den beiden Gallensäuren einen positiven Effekt auf die HDV-Infektionsinhibition aufweist, wäre eine Möglichkeit zur weiteren Steigerung der inhibitorischen Aktivität die Synthese eines Dimers bestehend aus CA und einem längerkettigen Linker. Durch diesen könnten weitere räumliche Anordnungen ermöglicht werden, die eventuell zu einer Verbesserung der Interaktion mit NTCP führen und somit eine weitere Steigerung der HDV-Virusinfektionsinhibition zur Folge haben könnten. Ebenso denkbar wäre die Verwendung eines Linkers, der nicht ausschließlich aus einer Kohlenstoffkette mit Einfachbindungen besteht, sondern weitere Modifikationen trägt. Dies könnten Doppelbindungen, Ringsysteme oder auch andere funktionelle Gruppen oder Verzweigungen sein. Durch diese Modifikationen könnte eine räumliche Struktur ausgebildet werden, die eine positive Wirkung auf die Bindung an NTCP und die HDV-Infektionsinhibition hat.

Somit konnte, auch bei den Gallensäuredimer-Peptid-Konjugaten mit Schwanz-Schwanz-Verknüpfung der Gallensäuredimere, zwar erneut eine Steigerung der inhibitorischen Aktivität gegenüber dem Ausgangspeptid HBVpreS/2-21-yK erreicht werden, eine Steigerung gegenüber den monomeren Gallensäuren LCA und DCA oder dem Konjugat mit direkt Kopf-Schwanz-verknüpften LCA-Dimer war jedoch auch durch diese Modifikationen nicht möglich.

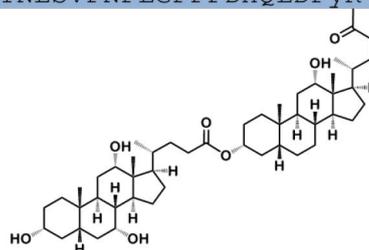
Bei der Untersuchung der Aufnahme und Wiedererkennung der Gallensäuren und Gallensäuredimere des ilealen Na<sup>+</sup>/Gallensäure-Cotransport-Systems im Kaninchen konnte beobachtet werden, dass hierfür die linke der beiden Gallensäuren von Bedeutung ist<sup>[128, 184]</sup>. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene direkt Kopf-Schwanz-verknüpfte gemischte Gallensäuredimere synthetisiert, die DCA als festen Baustein für die rechte Gallensäure besitzen, während die linke Gallensäure variiert wurde. Die synthetisierten Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate sind mit Sequenz, erwartetem und gemessenem Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Molekulargewicht in Tabelle 3.24 aufgeführt.

**Tabelle 3.24: Liste der synthetisierten Peptide mit Modifikation durch verschiedene direkt verknüpfte gemischte Gallensäuredimere mit DCA als festen Baustein und Variation der zweiten Gallensäure.** Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.

**HBVpreS/2-21-yK-DCA-CA**

$M_W = 3431,19 \text{ g/mol}$   
 $m/z_{\text{calc}} = 1716,0062 [M+2H]^{2+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1715,4873 [M+2H]^{2+}$

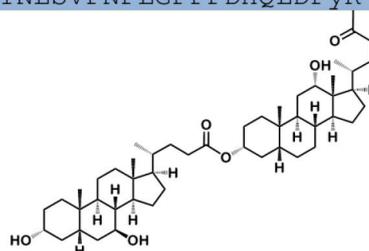
myr-GT<sup>N</sup>LSV<sup>P</sup>NPLGFFPDHQ<sup>L</sup>LD<sup>P</sup>yK-Amid



**HBVpreS/2-21-yK-DCA-UDCA**

$M_W = 3414,00 \text{ g/mol}$   
 $m/z_{\text{calc}} = 1707,5051 [M+2H]^{2+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1707,4921 [M+2H]^{2+}$

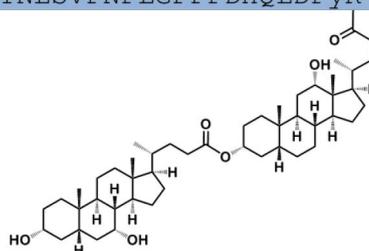
myr-GT<sup>N</sup>LSV<sup>P</sup>NPLGFFPDHQ<sup>L</sup>LD<sup>P</sup>yK-Amid



**HBVpreS/2-21-yK-DCA-CDCA**

$M_W = 3414,00 \text{ g/mol}$   
 $m/z_{\text{calc}} = 1707,5051 [M+2H]^{2+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1707,4927 [M+2H]^{2+}$

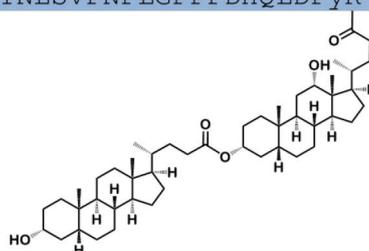
myr-GT<sup>N</sup>LSV<sup>P</sup>NPLGFFPDHQ<sup>L</sup>LD<sup>P</sup>yK-Amid



**HBVpreS/2-21-yK-DCA-LCA**

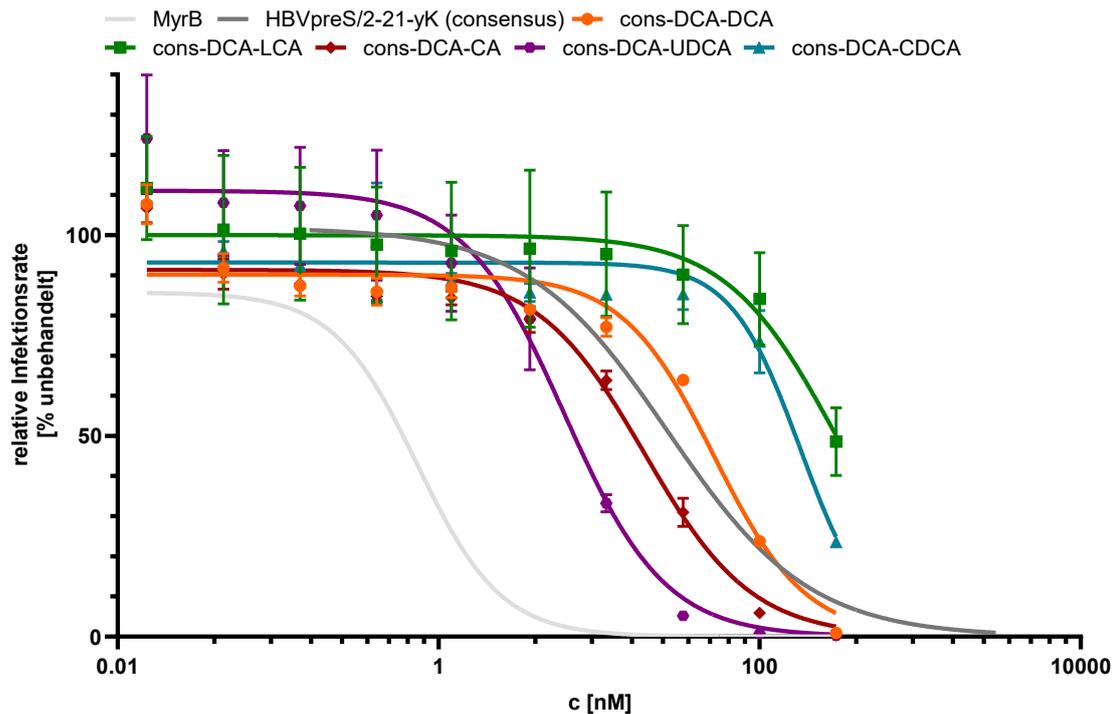
$M_W = 3399,19 \text{ g/mol}$   
 $m/z_{\text{calc}} = 1700,0113 [M+2H]^{2+}$   
 $m/z_{\text{obs}} = 1699,4923 [M+2H]^{2+}$

myr-GT<sup>N</sup>LSV<sup>P</sup>NPLGFFPDHQ<sup>L</sup>LD<sup>P</sup>yK-Amid



Die zuvor gezeigten Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate konnten, mit den geänderten Reaktionsparametern zur Kopplung des Dimers ans Peptid (siehe Kapitel 5.2.1.7), in guter Ausbeute und Reinheit synthetisiert werden.

Anschließend wurden diese in einem HDV-Infektionsinhibitionsassay auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 gezeigt und die daraus berechneten  $IC_{50}$ -Werte in Tabelle 3.25 gelistet.



**Abbildung 3.14:** Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit Konjugation verschiedener direkt Kopf-Schwanz verknüpfter gemischter Gallensäuredimere mit DCA als festen Baustein und Variation der zweiten Gallensäure. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

**Tabelle 3.25:** Übersicht der  $IC_{50}$ -Werte der HBVpreS/2-21-yK-Peptide (consensus) mit Konjugation verschiedener direkt Kopf-Schwanz verknüpfter gemischter Gallensäuredimere mit DCA als festen Baustein und Variation der zweiten Gallensäure.

Substanz	$IC_{50}$ [nM]
HBVpreS/2-21-yK-DCA-CA	19,1
HBVpreS/2-21-yK-DCA-UDCA	6,1
HBVpreS/2-21-yK-DCA-CDCA	180,0
HBVpreS/2-21-yK-DCA-LCA	300,4

Auch bei den Gallensäuredimer-Peptid-Konjugaten mit DCA als festen rechten Baustein und Variation der zweiten, linken Gallensäure im Dimer sind Unterschiede in der HDV-Infektionsinhibition zu beobachten (siehe Abbildung 3.14). Zudem können bei einem Vergleich der inhibitorischen Aktivität der Peptide mit gemischten direkt Kopf-Schwanz verknüpften Gallensäuredimeren Unterschiede zu den reinen direkt Kopf-Schwanz verknüpften Gallensäuredimeren (siehe Tabelle 3.21) ausgemacht werden.

Das gemischte Peptid HBVpreS/2-21-yK-DCA-LCA ( $IC_{50} = 300,4$  nM) hat im Vergleich zum reinen HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA-Peptid ( $IC_{50} = 2,4$  nM) eine deutlich verringerte inhibitorische Aktivität. Auch beim gemischten Peptid HBVpreS/2-21-yK-DCA-CA ( $IC_{50} = 19,1$  nM) wird die inhibitorische Aktivität im Vergleich zum reinen HBVpreS/2-21-yK-CA-CA-Peptid ( $IC_{50} = 4,9$  nM) verschlechtert. Die inhibitorische Aktivität von

HBVpreS/2-21-yK-DCA-CDCA-Peptid ( $IC_{50} = 180,0 \text{ nM}$ ) war im Vergleich zu HBVpreS/2-21-yK-CDCA-CDCA-Peptid ( $IC_{50} = 264,5 \text{ nM}$ ) zwar verbessert, dennoch war diese nicht ausreichend gut. Lediglich das HBVpreS/2-21-yK-DCA-UDCA-Peptid ( $IC_{50} = 6,1 \text{ nM}$ ) zeigt eine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität im Vergleich zu HBVpreS/2-21-yK-UDCA-UDCA-Peptid ( $IC_{50} = 12,8 \text{ nM}$ ). Durch die verschiedene Anzahl an Hydroxy-Gruppen und die unterschiedliche Position und Konfiguration innerhalb der einzelnen Gallensäuren, kann es zu verschieden starken Wechselwirkungen der hydrophilen und hydrophoben Bestandteile kommen kann. Es besteht daher die Möglichkeit, dass durch die unterschiedliche Kombination der Gallensäuren und ihren amphiphilen Eigenschaften unterschiedliche räumliche Anordnungen der verschiedenen Dimere erreicht werden. Dies kann zu den Unterschieden in der inhibitorischen Aktivität führen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass für die HDV-Infektionsinhibition mit Gallensäuredimer-Peptid-Konjugaten beide Bestandteile der Gallensäuredimere einen Einfluss haben. Da gerade das reine HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA-Peptid eine besonders gute inhibitorische Aktivität aufweist, welches es im gemischten HBVpreS/2-21-yK-DCA-LCA-Peptid jedoch fast vollständig verliert, wäre es eine Option weitere gemischte Dimere mit verschiedenen anderen rechten Gallensäuren zu synthetisieren. Diese könnten aufgrund ihrer verschiedenen räumlichen Anordnungen eventuell zu einer Steigerung der HDV-Infektionsinhibition führen. Ebenso wäre es eine Möglichkeit, die direkte Verknüpfung der beiden Gallensäuren nicht als  $\alpha$ -, sondern als  $\beta$ -Verknüpfung in Position 3 durchzuführen oder eine andere Position zur Verknüpfung zu verwenden<sup>[171]</sup>. Bei Verwendung von DCA, CDCA oder UDCA könnte diese gezielt geschützt werden und anschließend die Verknüpfung an der zweiten, im Molekül vorliegenden, Hydroxy-Gruppe durchgeführt werden<sup>[185]</sup>. Dadurch würde es zu einer Änderung der Struktur der Dimere kommen. Dies könnte ebenfalls einen positiven Einfluss auf die HDV-Infektionsinhibition haben, da durch die geänderte Struktur die Bindetasche eventuell besser adressiert werden kann.

Durch die Synthese der Peptid-Konjugate mit direkt Kopf-Schwanz verknüpften gemischten Gallensäuredimeren konnte gezeigt werden, dass, bei der HDV-Infektionsinhibition mit Gallensäure-Peptiddimer-Konjugaten beide Gallensäuren im Dimer einen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität besitzen. Dennoch konnte kein Gallensäuredimer-Peptid-Konjugat, synthetisiert werden, welches eine weitere Steigerung der inhibitorischen Aktivität zur Folge hat. Die beste HDV-Infektionsinhibition zeigt somit das Gallensäuredimer-Peptid-Konjugat HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA, bei dem die beiden LCA-Bausteine direkt Kopf-Schwanz verknüpft wurden. Dieses Gallensäuredimer-Peptid-Konjugat besitzt jedoch keine deutlich verbesserte inhibitorische Aktivität, im Vergleich zu den Gallensäuremonomer-Peptid-Konjugaten mit LCA und DCA. Somit war durch die bisher erfolgten Synthesen der verschiedenen Gallensäuredimere eine weitere

Verbesserung der HDV-Infektionsinhibition nicht möglich und die inhibitorische Aktivität der synthetisch aufwendigeren Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate ist in der gleichen Größenordnung wie die der Gallensäuremonomer-Peptid-Konjugate. Ebenso konnte mit keinem der synthetisierten Peptide die HDV-Infektionsinhibition von Myrcludex B erreicht werden. Die beste inhibitorische Wirkung der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Konjugate zeigen die beiden monomeren Gallensäure-Peptid-Konjugate HBVpreS/2-21-yK-DCA und HBVpreS/2-21-yK-LCA, sowie das dimere Gallensäure-Peptid-Konjugate HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA.

### 3.3 Physikochemische Charakterisierung

Für ein besseres Verständnis des Verhaltens der Myrcludex B-Derivate mit und ohne Gallensäurekonjugation *in vitro* und *in vivo*, wurden verschiedene physikochemische Parameter bestimmt, die ein Indiz für Löslichkeit und der Verteilung im Körper sein können. Hierzu wurde der LogD-Wert (Kapitel 3.3.1) und der isoelektrische Punkt (Kapitel 3.3.2) von Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA bestimmt.

#### 3.3.1 Bestimmung LogD-Wert

Mithilfe des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (LogD) kann eine Aussage über die Lipophilie eines Stoffes getroffen werden. Dadurch können Annahmen zur Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung der Stoffe getätigt werden<sup>[186]</sup>. Nach der OECD-Richtlinie wird der LogD durch Bildung des Quotienten der AUC von Octanol und der AUC von Wasser berechnet<sup>[187]</sup>. Anhand des LogD-Wertes bei pH 7,4 können somit Aussagen über ein mögliches Verhalten *in vivo* getätigt werden<sup>[188]</sup>.

Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA wurden hierzu in Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst, anschließend 1:1 mit Wasser-gesättigtem Octanol versetzt und, wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben, nach OECD-Richtlinie behandelt und anschließend die LogD-Werte berechnet<sup>[187]</sup>. Für Myrcludex B wurde das Experiment sechs Mal, für HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA je vier Mal durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind, mit berechneter Standardabweichung, in Tabelle 3.26 gelistet.

**Tabelle 3.26:** Nach OECD-Richtlinie experimentell bestimmte LogD-Werte bei pH 7,4 für Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA<sup>[187]</sup>. Das Experiment wurde sechsfach für Myrcludex B und jeweils vierfach für HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA durchgeführt. Der berechnete Fehler entspricht der Standardabweichung.

Substanz	LogD <sub>7,4</sub>
Myrcludex B	-1,18 ± 0,13
HBVpreS/2-21-yK	0,23 ± 0,20
HBVpreS/2-21-yK-LCA	-0,55 ± 0,16

Den geringsten LogD-Wert mit  $-1,18 \pm 0,13$  besitzt Myrcludex B. Da dieser negativ ist, war der Großteil der Substanz in der Pufferphase vorzufinden. Mit einem positiven LogD-Wert von  $0,23 \pm 0,20$  weist HBVpreS/2-21-yK die höchste Lipophilie auf und war vermehrt in der Octanolphase gelöst. Der Unterschied zwischen den beiden Substanzen beträgt ungefähr zwei Potenzen. Dies lässt auf Unterschiede im pharmakokinetischen Verhalten schließen. Der LogD-Wert von HBVpreS/2-21-yK-LCA liegt mit  $-0,55 \pm 0,16$  im negativen Bereich, zwischen den Werten der beiden Peptide. Es ist somit zu erwarten, dass das pharmakokinetische Verhalten von HBVpreS/2-21-yK-LCA eher dem von Myrcludex B ähnelt als dem vom gekürzten Derivat HBVpreS/2-21-yK. Die zusätzlich konjugierte Gallensäure scheint somit einen erheblichen Einfluss im Bereich der Lipophilie der Substanz zu haben.

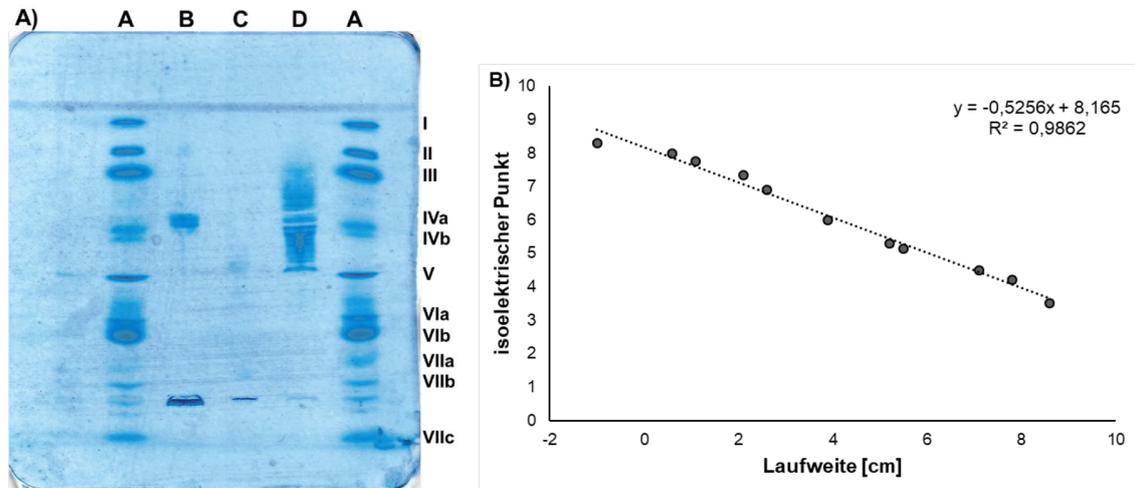
Bei Betrachtung der Sequenzen der Peptide ist das Verhalten der LogD-Werte erwartbar. Myrcludex B besitzt insgesamt fünf Aminosäuren mit Carboxygruppen ( $4 \times \text{Asp}$ ,  $1 \times \text{Glu}$ ) und zwei Aminosäuren mit Aminogruppen ( $2 \times \text{Lys}$ ). Somit hat Myrcludex B eine negative Gesamtladung von  $-4$ . Für HBVpreS/2-21-yK ergibt sich eine negative Gesamtladung von  $-1$  ( $2$  Carboxygruppen:  $2 \times \text{Asp}$ ,  $1$  Aminogruppe:  $1 \times \text{Lys}$ ). HBVpreS/2-21-yK-LCA besitzt ebenfalls eine negative Gesamtladung, die mit einem Wert von  $-2$  ( $2$  Carboxygruppen:  $2 \times \text{Asp}$ , keine freie Aminogruppe) zwischen den Werten der beiden Peptide liegt. Zusätzlich hat auch LCA einen Einfluss auf die Lipophilie. Bei allen betrachteten Substanzen liegt der LogD-Wert unter  $1$ . Es ist daher zu erwarten, dass diese zwar eine moderate Löslichkeit, jedoch eine sehr geringe bis keine orale Aufnahme aufgrund ihrer Hydrophobizität aufweisen. Ebenso ist zu erwarten, dass mit großer Wahrscheinlichkeit, bei allen untersuchten Substanzen, eine hohe renale Ausscheidungsrate vorliegt<sup>[189]</sup>.

### 3.3.2 Bestimmung des isoelektrischen Punkts

Am isoelektrischen Punkt (pI) liegt das jeweilige Molekül ohne elektrische Ladung vor, weshalb es dort die schlechteste Löslichkeit aufweist<sup>[190]</sup>. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes erfolgte mit einem Gradientengel, bei dem, nach dem Anlegen des elektrischen Feldes, die Substanz bis zu der Position wandert, die dem isoelektrischen Punkt entspricht<sup>[191]</sup>.

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde ein Gradientengel für den pH-Bereich 3-9 in einer PhastSystem-Separationseinheit mit einem speziellen IEF-Marker verwendet. Die Substanzen Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA wurden hierzu in Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst, da die Löslichkeit in Wasser nicht ausreichend war. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Substanzen, wurde der Marker aufgetragen. Das Experiment wurde insgesamt drei Mal wiederholt, sodass eine Standardabweichung berechnet werden konnte. Das Gel des ersten Experiments ist beispielhaft mit zugehöriger

Kalibriergeraden des Markers in Abbildung 3.15 gezeigt. Die beiden weiteren Gele mit der jeweils zugehörigen Kalibriergeraden sind im Anhang in Kapitel 11.1 (Abbildung 11.1) aufgeführt.



**Abbildung 3.15: Isoelektrische Fokussierung von Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA.** **A)** Darstellung des ersten verwendeten IEF-Gradientengels pH 3-9 mit Myrcludex B (D), HBVpreS/2-21-yK (C) und HBVpreS/2-21-yK-LCA (B). Zusätzlich wurde der IEF-Marker (A) aufgetragen, der die folgenden Substanzen enthält: I: Amyloglucosidase (pI 3,5), II: Glucoseoxidase (pI 4,2), III: Trypsininhibitor (Sojabohne; pI 4,5), IV:  $\beta$ -Lactoglobulin (IVa: pI 5,15; IVa: pI 5,3), V: Carboanhydrase (pI 6,0), VI: Myoglobin (Pferdeherz; VIa: pI 6,9; VIb: pI 7,35), VII: Linsenlektin (VIIa: pI 7,75; VIIb: pI 8,0; VIIc: pI 8,3). **B)** Darstellung der zu Gel 1 gehörenden Kalibriergeraden aus dem IEF-Marker zur Berechnung des pI der verschiedenen Substanzen.

In Abbildung 3.15 **A)** ist in den Reihen A die Auftrennung des IEF-Markers erkennbar, die zur Erstellung der Kalibriergeraden (Abbildung 3.15 **B)**) verwendet wurde. Nach Auftragung der isoelektrischen Punkte der Markerbestandteile gegen die Laufweite ergibt sich die Geradengleichung  $y = -0,5256x + 8,165$  mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,9862$ . Diese wurde nun zur Berechnung der isoelektrischen Punkte der zu untersuchenden Substanzen auf dem zugehörigen Gel verwendet. Für die Wiederholungsmessungen wurde analog hierzu verfahren und der Mittelwert der drei durchgeführten Messungen gebildet und die Standardabweichung berechnet. Bei HBVpreS/2-21-yK (Abbildung 3.15 **A)C)** und HBVpreS/2-21-yK-LCA (Abbildung 3.15 **A)B)** sind jeweils eindeutige Spots erkennbar. Daraus resultieren  $pI(\text{HBVpreS/2-21-yK}) = 5,95 \pm 0,16$  und  $pI(\text{HBVpreS/2-21-yK-LCA}) = 5,27 \pm 0,07$ . Bei Myrcludex B (Abbildung 3.15 **A)D)** war eine breitere Streuung der Spots erkennbar. Aus diesem Grund wurden hier zusätzlich zum Mittelwert auch noch der Minimal- und der Maximalwert des isoelektrischen Punkts bestimmt. Diese sind  $pI_{\text{Min}}(\text{MyrB}) = 4,35 \pm 0,03$ ;  $pI_{\text{Max}}(\text{MyrB}) = 5,99 \pm 0,09$  und der daraus resultierende Mittelwert  $pI(\text{MyrB}) = 5,17 \pm 0,04$ . Diese große Anzahl an Spots ist vermutlich auf die Länge des Peptids und die dadurch vorhandenen verschiedenen ionisierbaren Seitenketten zurückzuführen. Zudem ist bekannt, dass bei der Synthese von Myrcludex B verschiedene Nebenprodukte durch die Aspartimidbildung, wie zum Beispiel  $\alpha$ - und  $\beta$ -

Peptide in jeweils D- und L-Konfiguration, entstehen können. Alle diese verschiedenen Produkte haben minimale Unterschiede in ihren isoelektrischen Punkten, weshalb es zu einer breiteren Aufspaltung als bei den kürzeren Peptiden kommt.

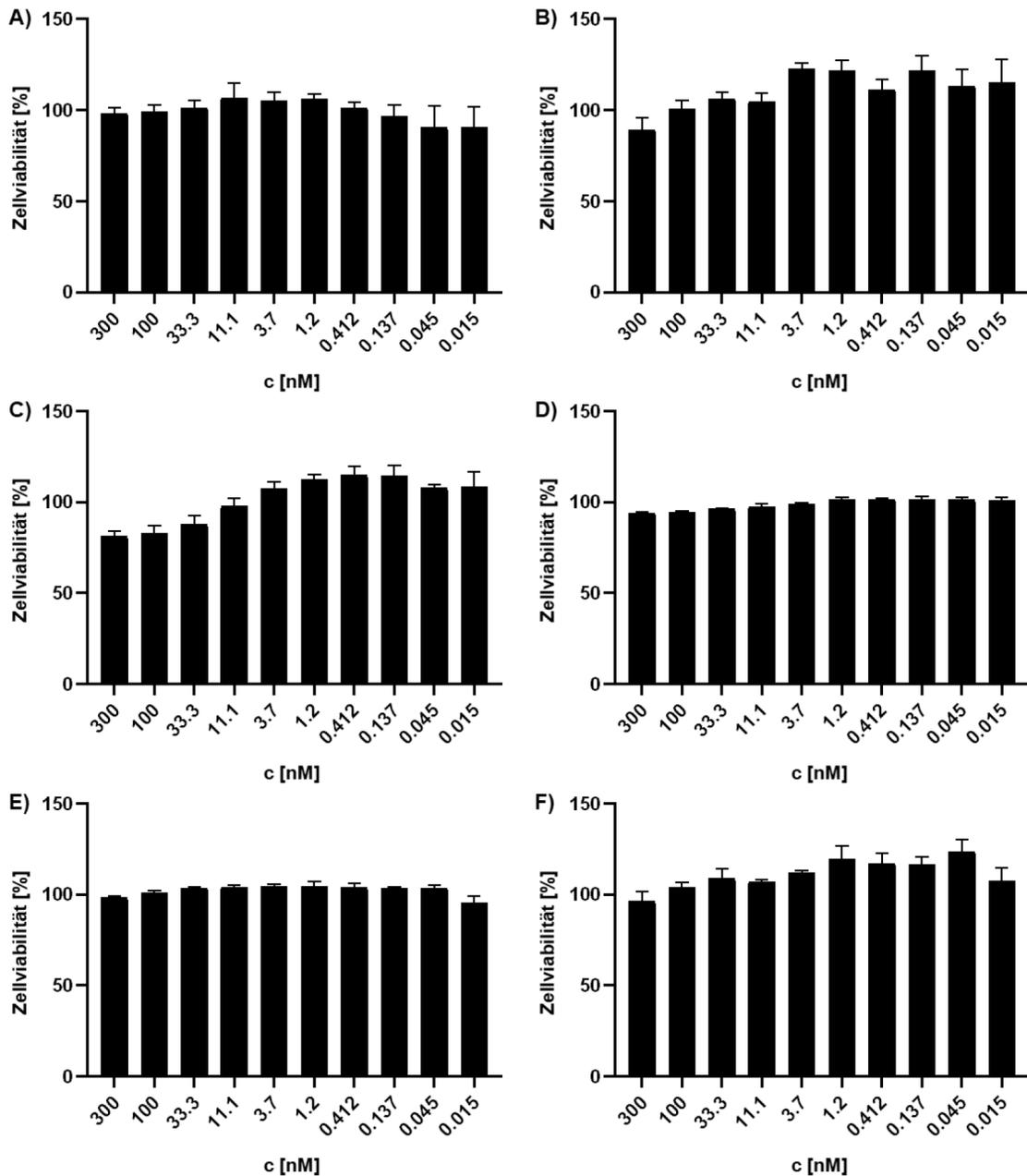
Bei einem Vergleich der untersuchten Derivate besitzt HBVpreS/2-21-yK den höchsten und Myrcludex B den niedrigsten isoelektrischen Punkt. HBVpreS/2-21-yK-LCA liegt dazwischen, jedoch näher an Myrcludex B als am gekürzten Peptid ohne Gallensäure. Dies stimmt mit den Berechnungen der LogD-Werte überein und bestätigt daher die Vermutung, dass HBVpreS/2-21-yK-LCA durch die Konjugation der Gallensäure ein zu Myrcludex B ähnliches Verhalten zeigt. Ebenso ist durch die isoelektrischen Punkte die geringe Löslichkeit von Myrcludex B und den Derivaten bei niedrigen pH-Werten zu erklären. Es ist bekannt, dass am isoelektrischen Punkt die geringste Löslichkeit vorliegt<sup>[191]</sup>. Somit ist zu erwarten, dass aufgrund der niedrigen isoelektrischen Punkte von Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA die Löslichkeit im sauren pH-Bereich, genauer zwischen pH 4 und pH 6, schlecht ist. Bei zunehmendem pH-Wert liegt wieder eine Ladung der Seitenketten vor, die somit zu einer Steigerung der Löslichkeit führt.

### **3.4 Charakterisierung der Gallensäure-Peptid-Konjugate *in vitro* und *in vivo***

Zur weiteren Charakterisierung der verschiedenen Gallensäure-Peptid-Konjugate wurden verschiedene *in vitro* und *in vivo* Experimente durchgeführt. Hierdurch sollte die Stabilität unter verschiedenen physiologischen Bedingungen, die hämolytischen Aktivität und die Bioverteilung der Substanzen näher untersucht werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind für die verschiedenen Versuche in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

#### **3.4.1 Zellviabilität nach HDV-Infektionsinhibitionsassay**

Nach Durchführung des HDV-Infektionsinhibitionsassays wurde, von Franziska Schlund (AG Urban), ein Janus Green Assay durchgeführt. Dieser Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Zelldichte und Zellviabilität<sup>[192]</sup>. Der verwendete Konzentrationsbereich entspricht somit dem des HDV-Infektionsinhibitionsassays (300 – 0,015 nM). Neben den untersuchten Gallensäure-Peptid-Konjugaten befinden sich auf den 96-Well Platten ebenfalls Wells, die nicht behandelt (100 % Zellviabilität) und zudem Wells, die vollständig lysiert (0 % Zellviabilität) wurden. In Abbildung 3.16 sind die erhaltenen Ergebnisse exemplarisch für die sechs synthetisierten Substanzen Myrcludex B (Abbildung 3.16 **A**), HBVpreS/2-21-yK (Genotyp J) (Abbildung 3.16 **B**), HBVpreS/2-21-yK-G-LCA (Abbildung 3.16 **C**), HBVpreS/2-21 (T3K)-yK-LCA (Abbildung 3.16 **D**), HBVpreS/2-21-yK-LCA-Triazol-LCA (Abbildung 3.16 **E**) und HBVpreS/2-21-yK-CDCA-CDCA (Abbildung 3.16 **F**) dargestellt.



**Abbildung 3.16: Ergebnisse des Janus Green Assays beispielhaft für sechs synthetisierte und auf HDV-Infektionsinhibition untersuchte Gallensäure-Peptid-Konjugate.** A) Myrcludex B, B) HBVpreS/2-21-yK (Genotyp J), C) HBVpreS/2-21-yK-G-LCA, D) HBVpreS/2-21 (T3K)-yK-LCA E) HBVpreS/2-21-yK-LCA-Triazol-LCA, F) HBVpreS/2-21-yK-CDCA-CDCA. Der betrachtete Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM, die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht.

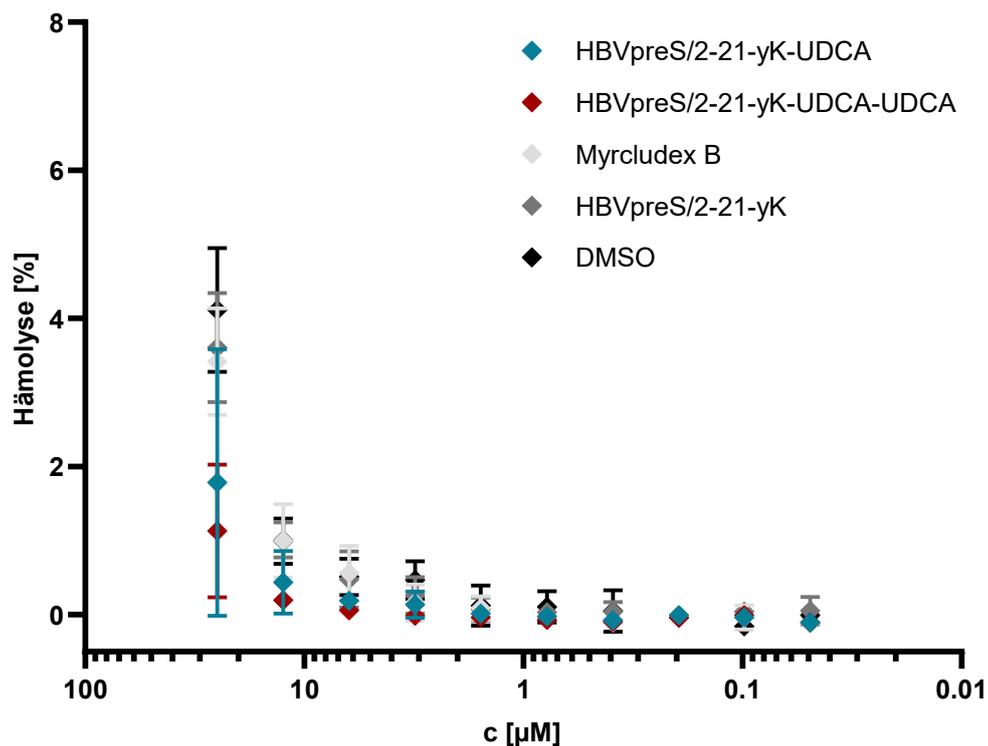
Bei Betrachtung der in Abbildung 3.16 gezeigten Ergebnisse des Janus Green Assays für die sechs Beispielsubstanzen war zu erkennen, dass bei keiner der betrachteten Substanzen eine Abnahme der Zellviabilität eintritt. Die Vergleichssubstanz Myrcludex B (Abbildung 3.16 **A**) zeigt hierbei das gleiche Verhalten wie die gekürzte Peptidsequenz mit Variation des Genotyps (HBVpreS/2-21-yK (Genotyp J), Abbildung 3.16 **B**), sowie die vier Gallensäure-Peptid-Konjugate. Zudem war kein Unterschied zwischen der Konjugation eines Gallensäuremonomers (Abbildung 3.16 **C** und **D**) an die Ausgangs-peptidsequenz HBVpreS/2-21-yK oder einer Variante mit leicht höherer inhibitorischer Aktivität im HDV-

Infektionsinhibitionsassay (Kapitel 3.2.1) zu erkennen. Auch die Gallensäure-dimere (Abbildung 3.16 E und F) zeigen ein identisches Verhalten mit vollständiger Zellviabilität. Alle berechneten Werte für die Zellviabilität liegen zwischen 80 und 115 %. Diese Schwankungen sind jedoch zum Beispiel auf minimale Unterschiede in der Zellzahl oder die allgemeine Versuchsdurchführung zurückzuführen. Ebenso sind bei keiner der untersuchten Substanzen konzentrationsabhängigen Effekte innerhalb der einzelnen Messreihen zu beobachten. Die Durchführung des Janus Green Assays beinhaltet die Aufnahme des Azofarbstoffs Janus Green B in lebenden Zellen. Durch anschließende Lysis wird dieser wieder freigesetzt und kann kolorimetrisch vermessen werden. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Zellviabilität durch die verschiedenen Gallensäure-Peptid-Konjugate und Varianten mit geänderter Peptidsequenz nicht beeinflusst wird. Ebenso kann daraus geschlossen werden, dass die getesteten Substanzen keine cytotoxischen Effekte in Leberzellen aufweisen. Da die  $IC_{50}$ -Werte der untersuchten Substanzen ebenfalls innerhalb des mittels Janus Green Assay betrachteten Bereich liegen, kann davon ausgegangen werden, dass die inhibitorische Aktivität auf die Interaktion der jeweiligen Substanz mit NTCP und somit auf die HDV-Infektionsinhibition zurückzuführen ist und nicht durch cytotoxische Effekte hervorgerufen wurde. Zusätzlich können hier auch weitere Zelllinien eingesetzt werden, durch die die Cytotoxizität der Substanzen in der Leber, oder auch in anderen Organen, genauer beurteilt werden können. Da innerhalb der szintigraphischen Untersuchungen (Kapitel 3.4.5) gezeigt werden konnte, dass sich die Substanzen hauptsächlich in der Leber anreichern, ist die Cytotoxizität der verschiedenen Substanzen in weiteren Organen jedoch nur von geringer Bedeutung.

### **3.4.2 Hämolytische Aktivität**

Zur weiteren Charakterisierung der Substanzen wurde beispielhaft für Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK, HBVpreS/2-21-yK-UDCA und HBVpreS/2-21-yK-UDCA-UDCA die hämolytische Aktivität bestimmt. Dadurch kann eine Aussage über die Toxizität gegenüber roten Blutkörperchen getätigt werden. Zur Untersuchung der hämolytischen Aktivität wurde das Blut von drei freiwilligen Spendern aufgereinigt und mit den Substanzen, wie in Kapitel 5.4.4 beschrieben, behandelt. Da alle Substanzen in DMSO gelöst wurden, wurde ebenfalls eine Kontrolle von DMSO in gleicher Konzentration mitgeführt. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde Triton-X-100 in PBS zugegeben, da dies als Referenzwert zur Berechnung der hämolytischen Aktivität benötigt wurde. Die aus der Berechnung erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.17 aufgeführt. Als Positivkontrolle wurde eine Platte mit einer Verdünnungsreihe von NaCl mit einer Startkonzentration von 0,81 % im ersten Well angesetzt, das den physiologischen Bedingungen entspricht. Diese wurde

ebenfalls mit dem aufgereinigten Blut der verschiedenen Spender inkubiert. Hierbei konnte ein zunehmender hämolytischer Effekt bei abnehmender Salzkonzentration beobachtet werden, da eine zu geringe Salzkonzentration aufgrund osmotischer Wechselwirkungen zum Aufplatzen der roten Blutkörperchen führt<sup>[193]</sup>. Ebenso ist bekannt, dass Gallensäuren aufgrund ihrer Fähigkeit zur Mizellenbildung und somit ihrer Detergenzeigenschaften in der Lage sind, die Zellmembran zu schädigen und so zur Lyse der roten Blutkörperchen führen können. Dieser Effekt ist jedoch pH- und konzentrationsabhängig und für die verschiedenen Gallensäuren unterschiedlich stark ausgeprägt<sup>[194-195]</sup>.



**Abbildung 3.17: Hämolytische Aktivität der Gallensäure-Peptid-Konjugate im Vergleich mit unkonjugiertem Peptid und Myrcludex B.** Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente mit drei verschiedenen freiwilligen Spendern in Triplikaten durchgeführt.

Bei Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse kann, bei der höchsten Konzentration von 25  $\mu\text{M}$ , bei allen untersuchten Substanzen ein minimaler hämolytischer Effekt beobachtet werden, der zwischen 1,1 und 4,1 % liegt. Der Fehler war jedoch aufgrund der Versuchsdurchführung mit verschiedenen Spendern ebenfalls sehr groß, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die hämolytische Aktivität für alle Substanzen im gleichen Bereich liegt. Zudem zeigt die Kontrolle mit DMSO, das zum Lösen aller Substanzen verwendet wurde, einen hämolytischen Effekt in der gleichen Größenordnung. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Hämolyse nicht von den untersuchten Substanzen, sondern vom verwendeten DMSO stammt. Des Weiteren war die Startkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  mindestens 1000-fach höher als die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der jeweiligen Substanzen. Im Bereich, der eine HDV-

Infektionsinhibition zeigt (25 nM und weniger), war keine hämolytische Aktivität zu beobachten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die synthetisierten Gallensäure-Peptid-Konjugate keine Toxizität gegenüber roten Blutkörperchen und somit keine hämolytischen Eigenschaften besitzen.

### 3.4.3 Stabilität in der Leber (CYP P450-Stabilität)

Als weitere Kontrolle der Stabilität der verschiedenen Gallensäure-Peptid-Konjugate wurde die CYP P450-Stabilität in einem Assay mit S9-Mikrosomen bestimmt. Hierzu wurden die Proben laut Herstellerangaben vorbereitet, inkubiert und nach 60 min gefällt und lyophilisiert. Anschließend wurden diese mittels HPLC-MS auf Abbauprodukte untersucht. Die identifizierten Abbauprodukte sind mit prozentuaalem Anteil in Tabelle 3.27 aufgeführt.

Die untersuchten linearen Peptide Myrcludex B (als Referenzsubstanz), HBVpreS/2-21-yK, HBVpreS/2-21-yK-UDCA, HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA und HBVpreS/2-21-yK-LCA-NH-CA, sowie die cyclischen Varianten cyclo-HBVpreS/2-21-yK und cyclo-HBVpreS/2-21-yK-UDCA zeigen nach 60 min keine Veränderung ihrer Retentionszeit in der UV-Absorption. Aus diesem Grund wurden die jeweiligen Peaks mit der Analysesoftware näher betrachtet, wobei Abbauprodukte verschiedener Länge identifiziert werden konnten.

Bei Betrachtung der in Tabelle 3.27 gezeigten Ergebnisse war zu erkennen, dass durch die Mikrosomen verschiedene Abbauprodukte gebildet wurden, der Großteil der Peptide aber als Hauptprodukt das vollständige Peptid aufweist. Bei den linearen Peptiden war das Hauptabbauprodukt ein N-Terminal um acht Aminosäuren und Myristinsäure gekürztes Produkt. Dieses war sowohl bei Myrcludex B (10-48), als auch bei der gekürzten Variante HBVpreS/2-21-yK (10-23), gebildet worden. Ebenso sind im gekürzten Peptid, in geringen Mengen, weitere Abbauprodukte vorzufinden, die ebenfalls N-Terminal abgebaut wurden. Das Gallensäure-Peptid-Konjugat, mit der Konjugation des Gallensäuremonomers UDCA (HBVpreS/2-21-yK-UDCA), zeigt das gleiche Verhalten. Die beiden Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate weichen hiervon etwas ab. Beim Konjugat HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA, bei dem das Dimer über eine Esterbindung verknüpft wurde, war mit 82,3 % das Hauptprodukt das vollständige lineare Peptid mit lediglich dem Gallensäuremonomer. Auch das um acht Aminosäuren gekürzte Abbauprodukt mit Konjugation des Gallensäuremonomers liegt vor (8,3 %). Auch die weiteren Abbauprodukte, bei denen N-Terminal vier bis sechs Aminosäuren abgebaut wurden, sind in geringen Mengen vorzufinden. Lediglich 4,3 % sind in diesem Fall das vollständig vorhandene Gallensäuredimer-Peptid-Konjugat. Das Konjugat HBVpreS/2-21-yK-LCA-NH-CA, bei dem das Gallensäuredimer über eine Amidbindung

verknüpft wurde, zeigt eine höhere CYP P450-Stabilität. Hier war, mit 70,2 %, das vollständige Gallensäuredimer-Peptid-Konjugat das Hauptprodukt. Als Abbauprodukt kann lediglich das um acht Aminosäuren gekürzte Gallensäuredimer-Peptid-Konjugat vorgefunden werden.

**Tabelle 3.27: Übersicht der Ergebnisse der CYP P450-Stabilität der linearen und cyclischen Peptide und Gallensäure-Peptid-Konjugate nach 1 h.** Die untersuchten Substanzen wurden in 100 mM Natriumphosphat-Puffer mit gepoolten S9-Mikrosomen nach Herstellerangaben behandelt und anschließend mittels HPLC-MS auf Abbauprodukte untersucht.

<b>Substanz</b>	<b>Abbauprodukt [Aminosäurenummer]</b>	<b>Anteil [%]</b>
<b>Myrcludex B</b>	5-48	0,9
	10-48	7,2
	2-48 (vollständig)	91,9
<b>HBVpreS/2-21-yK</b>	5-23	0,6
	6-23	3,4
	7-23	2,7
	10-23	6,4
	2-23 (vollständig)	86,9
<b>HBVpreS/2-21-yK-UDCA</b>	4-23-UDCA	3,9
	5-23-UDCA	3,9
	7-23-UDCA	1,1
	10-23-UDCA	7,1
	2-23-UDCA (vollständig)	84,0
<b>HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA</b>	4-23-LCA	0,5
	5-23-LCA	0,9
	6-23-LCA	3,3
	10-23-LCA	8,3
	2-23-LCA	82,3
	2-23-LCA-LCA (vollständig)	4,3
<b>HBVpreS/2-21-yK-LCA-NH-CA</b>	5-23-LCA-NH-CA	9,0
	10-23-LCA-NH-CA	20,8
	2-23-LCA-NH-CA (vollständig)	70,2
<b>cyclo-HBVpreS/2-21-yK</b>	cyclo-2-23	2,4
	myr-cyclo-2-23 (vollständig)	97,6
<b>cyclo-HBVpreS/2-21-yK-UDCA</b>	myr-cyclo-2-23-UDCA (vollständig)	100

Bei allen linearen Peptiden konnte das N-terminal um acht Aminosäuren gekürzte Peptid ausgemacht werden. Dies könnte, bei steigendem Anteil dieses Abbauprodukts, problematisch werden, da es zur Spaltung innerhalb der für die HDV-Infektionsinhibition essentiellen Domäne kommt.

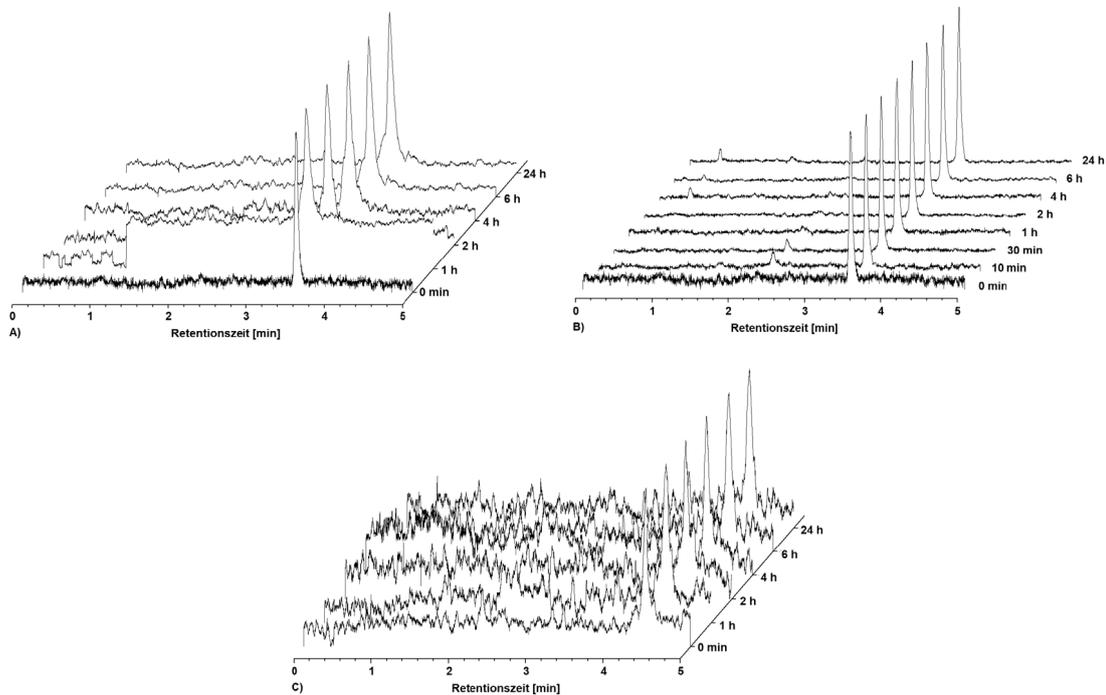
Bei den cyclischen Peptiden wurde ein anderes Abbauverhalten beobachtet. Das Peptid ohne Gallensäure wurde nicht gespalten und blieb vollständig erhalten. Beim cyclischen Gallensäure-Peptid-Konjugat war mit 97,6 % das Hauptprodukt ebenfalls das vollständige Konjugat. Mit 2,4 % konnte als Abbauprodukt das cyclische Peptid ohne Gallensäure beobachtet werden. Auch hier fand keine Spaltung innerhalb der Peptidsequenz statt. Es scheint somit auf den ersten Anblick, als wenn, durch die Cyclisierung des HBVpreS/2-21-Peptids über die Disulfidbrücke, eine Stabilisierung gegenüber CYP P450-Enzymen stattgefunden hat. Jedoch war die jetzige Schwachstelle die Verknüpfung zwischen Gallensäure und Peptid. Dies könnte, wenn durch eine längere Inkubation der Anteil des Abbauprodukts größer wird, einen negativen Einfluss auf die HDV-Infektionsinhibition haben, da diese durch die Konjugation der Gallensäure bei den cyclischen Peptiden deutlich zunimmt.

Zusammenfassend kann bei den untersuchten Peptiden von einer guten Stabilität der peptidischen Bestandteile gesprochen werden. Es konnten zwar bei allen linearen Peptiden und Gallensäure-Peptid-Konjugaten Abbausequenzen beobachtet werden, das Hauptprodukt stellt jedoch das vollständige Konjugat dar. Das Abbauprodukt, welches am häufigsten beobachtet werden konnte, entstand durch Spaltung zwischen Asparagin und Prolin. Dies kann problematisch sein, da diese Spaltung innerhalb der für die Bindung essentiellen Domäne stattfindet. Da die jeweilige Menge an gebildetem Abbauprodukt jedoch weniger als 10 % betrug, ist der Einfluss auf die inhibitorische Aktivität vernachlässigbar. Wird die CYP P450-Stabilität der beiden Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate betrachtet, weisen diese einen enormen Unterschied auf. Während das über eine Amidbindung verknüpfte Gallensäuredimer eine sehr gute Stabilität aufweist, kommt es beim Gallensäuredimer mit Esterverknüpfung zu einer fast vollständigen Spaltung, wodurch lediglich das Gallensäuremonomer-Peptid-Konjugat vorlag. Somit konnte gezeigt werden, dass die über einen Ester verknüpften Gallensäuredimere keine ausreichende Stabilität in der Leber gegen CYP P450-Enzyme besitzen. Aus diesem Grund ist die Dimersynthese über die Ausbildung eines Amids zu bevorzugen, auch wenn diese einen höheren synthetischen Aufwand darstellt.

### **3.4.4 Serumstabilität**

Zur weiteren Charakterisierung der Gallensäure-Peptid-Konjugate wurde eine Untersuchung der Stabilität in humanem AB-Serum durchgeführt. Die zu untersuchenden Substanzen, Myrcludex B, das gekürzte Ausgangspeptid HBVpreS/2-21-yK und das Gallensäure-Peptid-Konjugat HBVpreS/2-21-yK-LCA, wurden mit <sup>125</sup>Iod radiomarkiert (Kapitel 5.5.1) und anschließend bei 37 °C im Serum bis zu 24 h inkubiert. Nach den verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils Proben entnommen, mit Acetonitril gefällt und

mittels Radio-HPLC analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind für Myrcludex B in Abbildung 3.18 **A**), HBVpreS/2-21-yK in Abbildung 3.18 **B**) und für HBVpreS/2-21-yK-LCA in Abbildung 3.18 **C**) dargestellt.



**Abbildung 3.18: Serumstabilitätsmessung von A) Myrcludex B, B) HBVpreS/2-21-yK und C) HBVpreS/2-21-yK-LCA in humanen AB-Serum.** Es wurde jeweils ungefähr 1 MBq des  $^{125}\text{I}$ -markierten Peptids verwendet und Proben nach 0 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h entnommen. Bei HBVpreS/2-21-yK wurden zusätzlich Proben nach 10 min und 30 min entnommen. Nach Fällung der Serumproteine mit Acetonitril wurden die Überstände mittels Radio-HPLC analysiert.

Bei Betrachtung der Ergebnisse für Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK (Abbildung 3.18 **A**) und **B**)) ist zu erkennen, dass das jeweilige Peptid über den gesamten Zeitraum stabil war, da der Produktpeak bei 3,5 min in allen Messungen vorhanden und gleich groß war. Bei HBVpreS/2-21-yK war bei 4 h, 6 h und 24 h zusätzlich ein Peak bei 0,4 min zu erkennen. Dieser war auf freies Iod zurückzuführen, welches sich während der Inkubation in Serum vom Peptid löst. Weitere Peaks, die auf einen Abbau des Produkts schließen lassen, sind jedoch nicht erkennbar. Die Ergebnisse für das Gallensäure-Peptid-Konjugat HBVpreS/2-21-yK-LCA (Abbildung 3.18 **C**)) stimmen mit den Beobachtungen für das Ausgangspeptid überein. Auch hier war der charakteristische Produktpeak bei 4,5 min über den gesamten Analysezeitraum eindeutig zu erkennen. Es war jedoch ein stärkeres Rauschen der Basislinie zu beobachten. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass Teile des Peptids mit den Serumproteinen ausfallen und somit die gemessene Aktivität im Überstand geringer war. Bei Analyse des abgetrennten Pellets nach Fällung war auch dort Radioaktivität messbar. Dies lässt darauf schließen, dass im Fall des Gallensäure-Peptid-Konjugats eine stärkere Bindung an die Serumbestandteile vorliegt und deshalb

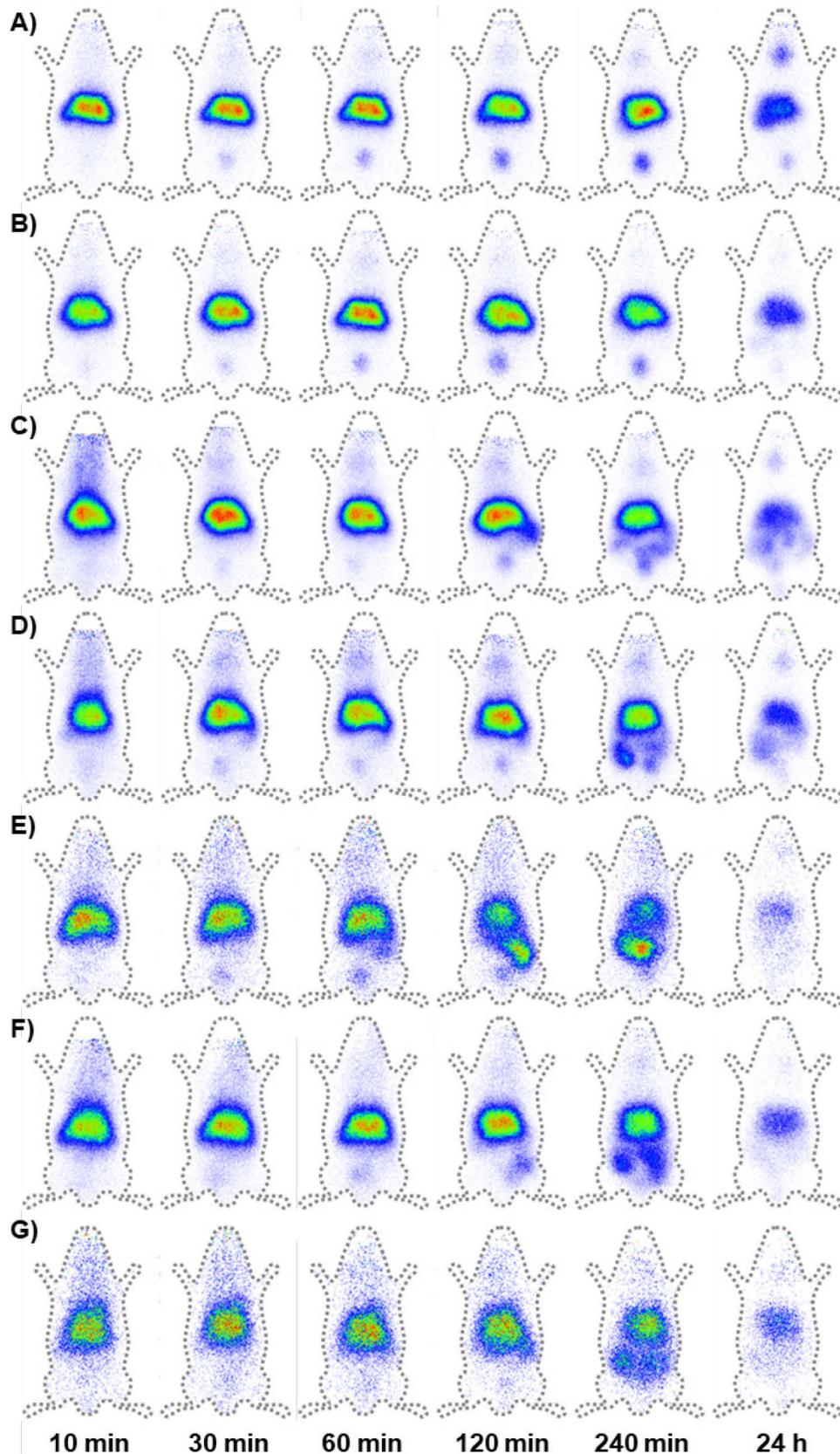
womöglich ein größerer Teil des Peptids, im Vergleich zu den Peptiden ohne Gallensäure-Konjugation, mit ausgefällt wird. Für eine genauere Charakterisierung wäre es hier nötig die genaue Bindung der verschiedenen Peptide an die Serumbestandteile, wie zum Beispiel Albumin, genauer zu untersuchen. In einer, im Rahmen dieser Arbeit betreuten, Bachelorarbeit (Tyra Christian, *Preclinical Examinations Of Myrcludex B Derivatives*, Oktober 2022 – Januar 2023) wurden zur Bestimmung der Proteinbindung verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die jedoch bisher noch keine Aussage über die Bindung der verschiedenen Myrcludex B-Derivate an Serumproteine zulassen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei allen untersuchten Peptiden die Stabilität in Serum gegeben war und keine Abbauprodukte während des untersuchten Zeitraums zu beobachten waren.

### **3.4.5 Vergleich der Bioverteilung verschiedener Gallensäure-Peptid-Konjugate mittels szintigraphischer Aufnahmen in SWISS-Mäusen**

Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Gallensäure-Peptid-Konjugate wurden ebenfalls *in vivo*-Studien zur Untersuchung der Verteilung im Körper durchgeführt. Hierzu wurden die jeweiligen Konjugate mit <sup>125</sup>Iod radiomarkiert (Kapitel 5.5.1), in die Schwanzvene von SWISS-Mäusen injiziert und die Verteilung szintigraphisch (Kapitel 5.5.2) beobachtet. Die erhaltenen Ergebnisse sind für alle linearen HBVpreS/2-21-yK-Konjugate in Abbildung 3.19 gezeigt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse für alle linearen Peptide zeigen diese auf den ersten Blick alle ein ähnliches Verhalten. Für Myrcludex B (Abbildung 3.19 **A**), welches als Referenzsubstanz ebenfalls untersucht wurde, ist die Bioverteilung bereits gut charakterisiert und publiziert<sup>[13, 96]</sup>. Es konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden, dass Myrcludex B, kurz nach Injektion in die Schwanzvene, ausschließlich in der Leber angereichert wird. Durch renale Ausscheidung, diese wird durch die Sichtbarkeit der Blase bestätigt, wird Myrcludex B abgegeben, weshalb die Menge in der Leber abnimmt, wobei es nach 24 h aber noch nicht vollständig ausgeschieden war. Für das gekürzte Peptid HBVpreS/2-21-yK zeigt sich ein ähnliches Verhalten (Abbildung 3.19 **B**). Auch dieses wird bereits kurz nach Injektion in der Leber angereichert und biliär sowie renal ausgeschieden. Ebenfalls sind auch hier nach 24 h noch Reste in der Leber beobachtbar.

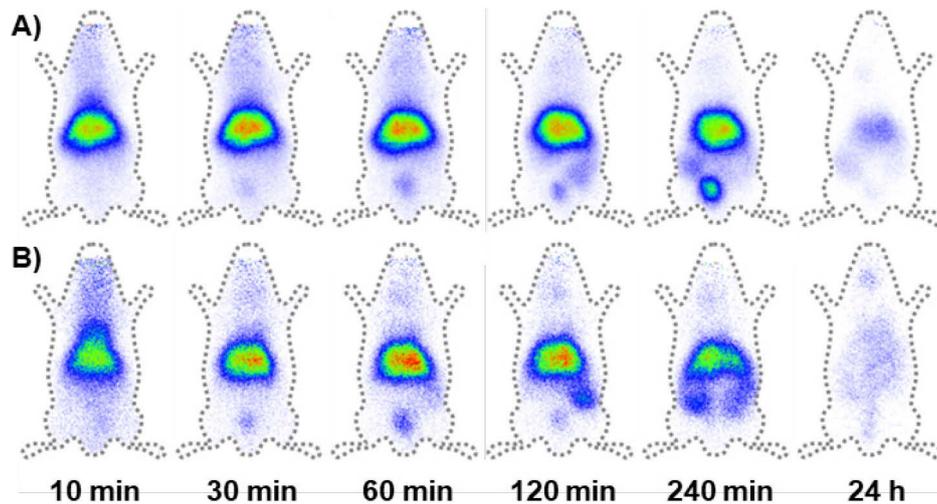


**Abbildung 3.19: Szintigraphische Aufnahmen verschiedener Gallensäure-Peptid-Konjugate nach 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min und 24 h.** Die Peptide wurden mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und in die Schwanzvene weiblicher SWISS-Mäuse appliziert. **A)** MyrB-y als Vergleichssubstanz, **B)** HBVpreS/2-21-yK, **C)** HBVpreS/2-21-yK-CA, **D)** HBVpreS/2-21-yK-UDCA, **E)** HBVpreS/2-21-yK-C<sub>12</sub>EtNH-LCA, **F)** HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA, **G)** HBVpreS/2-21-yK-LCA-NH-LCA.

Die Gallensäure-Peptid-Konjugate mit den monomeren Gallensäuren CA (Abbildung 3.19 C) und UDCA (Abbildung 3.19 D) wurden ebenso untersucht. Hierbei war nach kurzer Zeit bei beiden Konjugaten eine Anreicherung in der Leber erkennbar, die auch nach 24 h noch anhält. Auch die renale Ausscheidung konnte durch die Sichtbarkeit der Blase zu den späteren Zeitpunkten bestätigt werden. Zusätzlich waren bei 240 min und 24 h die Darmschlingen erkennbar. Dies lässt auf eine Ausscheidung über die Galle und somit den Verdauungstrakt schließen. Das Gallensäure-Peptid-Konjugat, mit dem zur Verknüpfung zusätzlich eingesetzten Linker (Abbildung 3.19 E), zeigte ein ähnliches Verhalten mit der direkten Anreicherung in der Leber. Die Ausscheidung fand hier um einiges schneller statt und bereits nach 120 min war eine deutliche Abnahme der Substanzmenge in der Leber und eine Ausscheidung über den Verdauungstrakt erkennbar. Nach 24 h waren lediglich geringe Reste der Substanz in der Leber erkennbar.

Als letztes wurden die Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA (Abbildung 3.19 F) und HBVpreS/2-21-yK-LCA-NH-LCA (Abbildung 3.19 G) betrachtet. Auch bei diesen beiden Verbindungen war eine schnelle Anreicherung in der Leber zu erkennen, die ebenfalls auch nach 24 h noch erkennbar war. Das Ausscheidungsverhalten war mit dem der Monomere vergleichbar. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle untersuchten linearen Gallensäure-Peptid-Konjugate ein, mit Myrcludex B vergleichbares, Verhalten *in vivo*, mit schneller Anreicherung in der Leber und langsamer Ausscheidungsrate, zeigen. Im Unterschied zu Myrcludex B ist jedoch ebenfalls Aktivität in den Darmschlingen erkennbar. Dies deutet auf eine Ausscheidung über den Verdauungstrakt hin. Die Leberspezifität war auch bei den Gallensäure-Peptid-Konjugaten, bei intravenöser Applikation, gegeben und somit eine weitere Anwendung als HBV/HDV-Medikament denkbar.

Ebenso wurde das cyclische HBVpreS/2-21-yK-Peptid und das zugehörige cyclische Gallensäure-Peptid-Konjugat betrachtet und die zugehörigen Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 dargestellt.



**Abbildung 3.20: Szintigraphische Aufnahmen des cyclischen HBVpreS/2-21-yK-Peptids mit und ohne Konjugation einer Gallensäure nach 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min und 24 h.** Die Peptide wurden mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und in die Schwanzvene weiblicher SWISS-Mäuse appliziert. **A)** cyclo-HBVpreS/2-21-yK, **B)** cyclo-HBVpreS/2-21-yK-UDCA.

Sowohl beim cyclischen HBVpreS/2-21-yK-Peptid (Abbildung 3.20 **A**), als auch bei dem zugehörigen Gallensäure-Peptid-Konjugat (Abbildung 3.20 **B**) wurde ein vergleichbares Verhalten mit den linearen Peptiden beobachtet. Auch hier findet bereits nach 10 min eine Anreicherung in der Leber statt, die auch nach 240 min noch deutlich zu erkennen war. Nach 24 h waren lediglich noch minimale Reste der radioaktivmarkierten Peptide in der Leber zu sehen. Es ist daher davon auszugehen, dass die Ausscheidungsrate bei den cyclischen Derivaten höher ist, als bei den linearen. Dennoch war auch hier ein, mit Myrcludex B vergleichbares, Verhalten mit schneller Anreicherung in der Leber und anschließender langsamer renaler Ausscheidung zu beobachten.

Bei allen szintigraphisch untersuchten Peptiden und Gallensäure-Peptid-Konjugaten konnte ein ähnliches Verhalten zu Myrcludex B beobachtet werden. Die schnelle Anreicherung in der Leber ist für die Wirkung eines HBV/HDV-Inhibitors essentiell. Aus diesem Grund ist es positiv, dass auch die Gallensäure-Peptid-Konjugate dort schnell angereichert werden und ebenfalls eine langsame renale Ausscheidung stattfindet. Dies war in gewisser Weise zu erwarten, da in verschiedenen, bereits publizierten, Arbeiten gezeigt wurde, dass Gallensäuren als *Drug-Carrier* fungieren können, um Wirkstoffe gezielt in Hepatozyten zu transportieren und somit ein Leber-Targeting zu ermöglichen<sup>[133, 196-197]</sup>. Die Beobachtung, dass die Gallensäure-Peptid-Konjugate ebenso im Magen-Darm-Trakt vorzufinden sind, ist dadurch zu erklären, dass es neben NTCP noch weitere Rezeptoren und Transporter für die Aufnahme der Gallensäuren gibt, welche ebenfalls bereits für spezifisches Drug-Targeting genutzt wurden<sup>[198]</sup>. Dieses ist zum Beispiel der ASBT im Dünndarm, der somit ebenfalls mit den Gallensäuren interagieren kann<sup>[133]</sup>. Dies führt dazu, dass die Gallensäure-Peptid-Konjugate ebenfalls in geringen Mengen dort adsorbieren und die Darmschlingen bei den szintigraphischen Untersuchungen sichtbar

werden. Durch die szintigraphischen Untersuchungen in SWISS-Mäusen konnte für die Gallensäure-Peptid-Konjugate das erwartete ähnliche Verhalten im Vergleich zu Myrcludex B bestätigt werden. Es ist daher zu erwarten, dass auch in anderen Spezies ein ähnliches Verhalten eintritt. Dies ist positiv für die weitere Entwicklung potentieller Wirkstoffkandidaten.

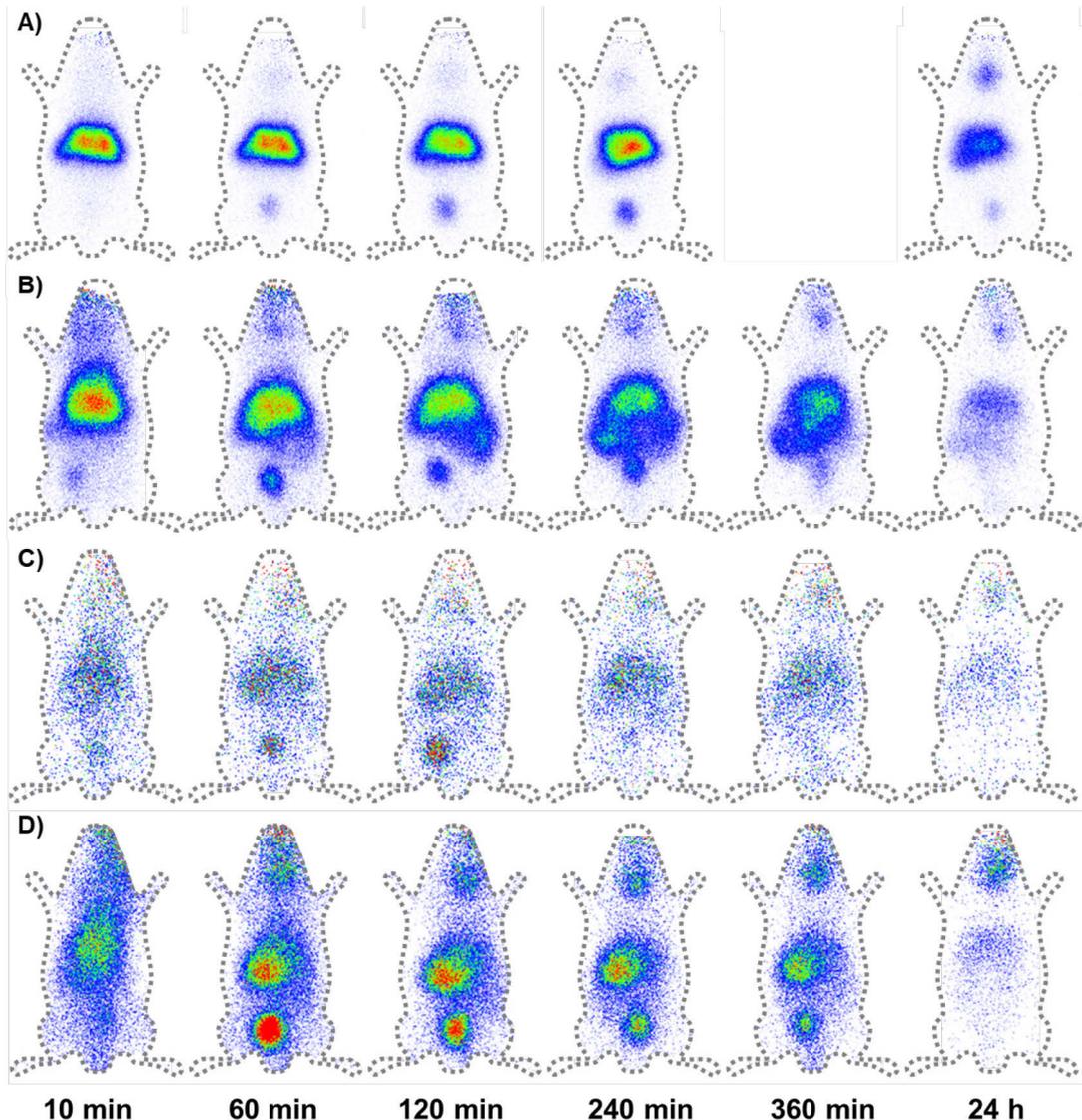
### **3.4.6 Szintigraphische Aufnahmen und Bioverteilungen der inhibitorisch aktivsten Gallensäure-Peptid-Konjugate im Vergleich mit Myrcludex B.**

Für die Gallensäure-Peptid-Konjugate mit der besten HDV-Infektionsinhibition *in vitro* wurden szintigraphische Aufnahmen in weiblichen SWISS Mäusen durchgeführt, nachdem die Substanzen nach verschiedenen Applikationsarten verabreicht wurden: intravenös (Abbildung 3.21), subkutan (Abbildung 3.23) und oral (Abbildung 3.25). Zusätzlich wurde zur genaueren Charakterisierung die Organverteilung von HBVpreS/2-21-yK-LCA und Myrcludex B (Abbildung 3.22, Abbildung 3.24 und Abbildung 3.26) in jeweils drei weiblichen SWISS-Mäusen pro Applikationsart bestimmt.

Für die Gallensäure-Peptid-Derivate HBVpreS/2-21-yK-LCA (Abbildung 3.21 **B**) und HBVpreS/2-21-yK-DCA (Abbildung 3.21 **C**) war ein ähnliches Verhalten wie bei den zuvor betrachteten Gallensäure-Peptid-Konjugaten (Abbildung 3.19) zu beobachten. Zunächst findet eine, mit Myrcludex B vergleichbare, schnelle Anreicherung in der Leber statt, die auch nach 24 h noch erkennbar war. Auch die renale Ausscheidung kann durch die Sichtbarkeit der Blase zu den späteren Zeitpunkten bestätigt werden. Zusätzlich sind bei 240 min und 24 h die Darmschlingen erkennbar. Dies lässt auf eine Ausscheidung über die Galle und somit den Verdauungstrakt schließen.

Für HBVpreS/2-21(T3K)-yK-LCA (Abbildung 3.21 **D**) war ein vollständig anderes Verhalten *in vivo*, nach intravenöser Applikation, zu beobachten. Nach 10 min war keine Anreicherung in der Leber zu erkennen und die Verteilung lässt auf eine Zirkulation im Blut schließen. Bereits nach 1 h war die Blase sehr deutlich sichtbar und ein Großteil der radioaktiv-markierten Substanz wurde somit direkt renal ausgeschieden. Zusätzlich waren Magen und Schilddrüse erkennbar. Dies ist vermutlich auf das Vorhandensein von freiem <sup>125</sup>Iod zurückzuführen. Im Vergleich zu den anderen Gallensäure-Peptid-Konjugaten, wie zum Beispiel HBVpreS/2-21-yK-LCA (Abbildung 3.21 **B**), ist der Unterschied von HBVpreS/2-21(T3K)-yK-LCA (Abbildung 3.21 **D**) eine Aminosäuremodifikation an Position 3, bei der das standardmäßig vorhandene Threonin durch Lysin ersetzt wurde. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Modifikation zur Ausbildung einer Spaltstelle führt, die zur enzymatischen Abtrennung der Myristinsäure führt. Daher würde die erste Wechselwirkung der HBVpreS/1-Sequenz mit NTCP, nämlich die reversible Bindung von Myristinsäure an HPSG ausbleiben. Daraus wiederum resultiert, dass die Bindung des Peptids an NTCP nicht stattfindet und somit keine Anreicherung in der Leber stattfinden

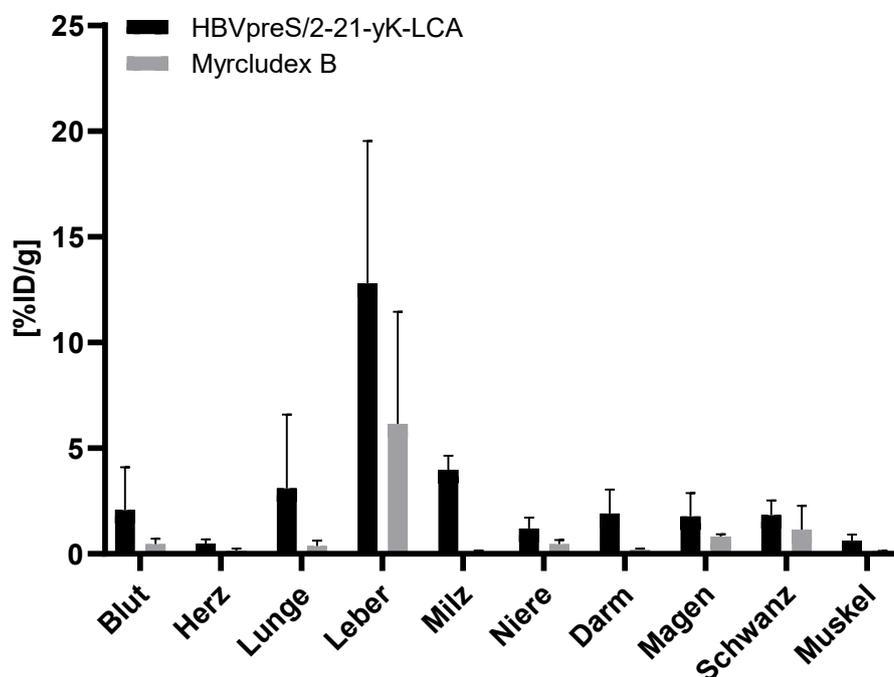
kann. In Zellversuchen konnte hier bereits gezeigt werden, dass durch das Fehlen von Myristinsäure bei Myrcludex B keine Bindung an die Zellen stattfindet<sup>[90]</sup>. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch die basische Aminosäure Lysin eine ungewünschte Wechselwirkung stattfindet, die zur Abstoßung von der Zelloberfläche und somit zum Ausbleiben der Bindung an NTCP führt. Da bei intravenöser Applikation keine Leberanreicherung zu beobachten war, wurde diese Verbindung bei den anderen Applikationsarten nicht weiter untersucht.



**Abbildung 3.21: Vergleichende Darstellung szintigraphischer Aufnahmen nach intravenöser Applikation nach 10 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min und 24 h.** Die Peptide wurden mit <sup>125</sup>I radiomarkiert und in die Schwanzvene weiblicher SWISS-Mäuse appliziert. **A)** Myrcludex B als Vergleichssubstanz **B)** HBVpreS/2-21-yK-LCA, **C)** HBVpreS/2-21-yK-DCA und **D)** HBVpreS/2-21(T3K)-yK-LCA.

Zur genaueren Charakterisierung der Gallensäure-Peptid-Konjugate wurde, für HBVpreS/2-21-yK-LCA und Myrcludex B als Vergleichssubstanz, zusätzlich eine Bioverteilung nach intravenöser Applikation in die Schwanzvene von SWISS-Mäusen

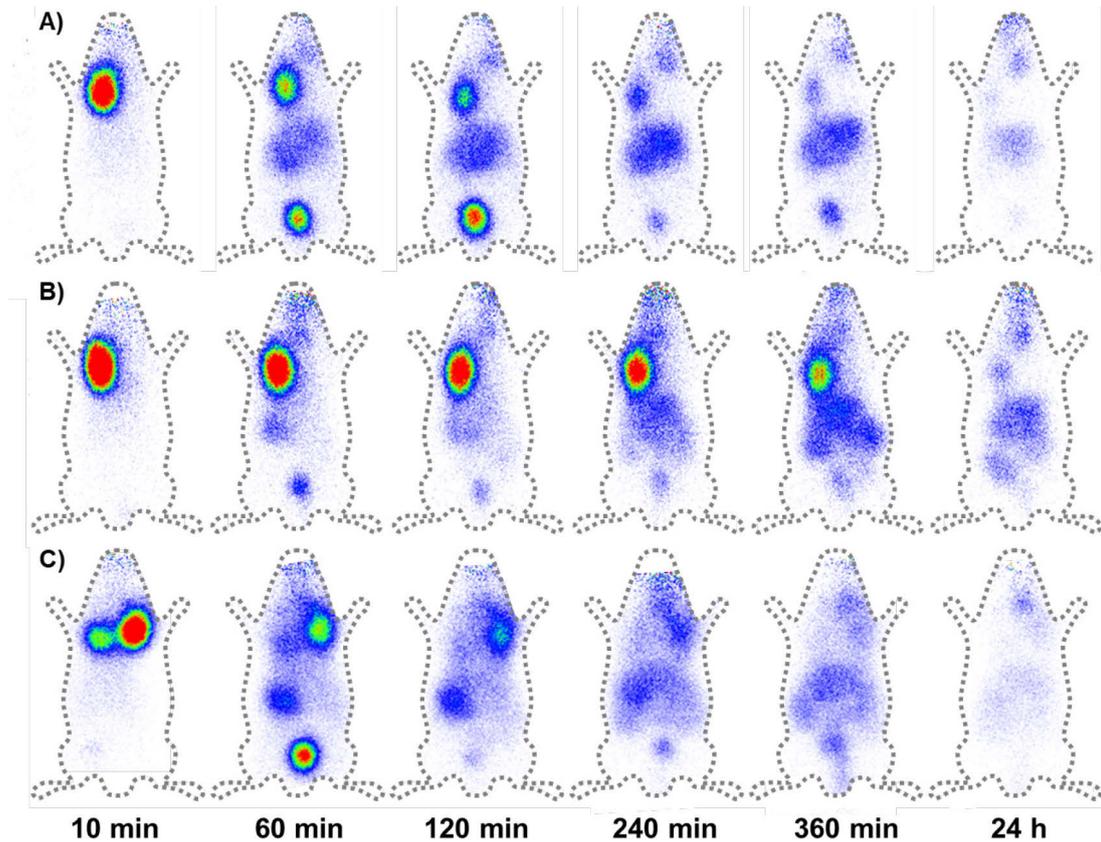
nach 2 h durchgeführt. Die Messung wurde jeweils mit drei Mäusen durchgeführt und die daraus resultierende Organverteilung mit Standardabweichung (n = 3) ist in Abbildung 3.22 gezeigt.



**Abbildung 3.22: Organverteilung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA bei intravenöser Applikation nach 2 h.** <sup>125</sup>I-markiertes Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA wurde jeweils drei SWISS-Mäusen intravenös in die Schwanzvene appliziert. Nach 2 h wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet, die Organe entnommen, gewogen und mit dem  $\gamma$ -Counter vermessen.

Auch mit der Organverteilung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK nach intravenöser Applikation nach 2 h kann die Anreicherung in der Leber bestätigt werden. Zusätzlich war bei HBVpreS/2-21-yK-LCA eine gesteigerte Aktivität in der Milz zu erkennen. Dies stimmt auch mit den Beobachtungen der szintigraphischen Aufnahmen überein, da hier unterhalb der Leber weitere Aktivität beobachtet werden kann, die somit einer Anreicherung zu kleinen Teilen in der Milz entspricht. Bei beiden betrachteten Peptiden war die größte Menge der markierten Substanz bei der Organverteilung in der Leber vorzufinden. Es scheint hier, als wenn die Anreicherung von HBVpreS/2-21-yK-LCA mit 12 % sogar größer war als die von Myrcludex B mit 7 %. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Fehlerabweichung relativ groß ist, da es sich um ein *in vivo*-Experiment handelt. Es ist somit nicht 100 % sichergestellt, dass das Gallensäure-Peptid-Konjugat eine bessere Anreicherung als Myrcludex B zeigt. Zur genaueren Untersuchung müsste eine höhere Anzahl Tiere verwendet werden.

Als nächstes wurde die Verteilung von HBVpreS/2-21-yK-LCA, HBVpreS/2-21-yK-DCA und Myrcludex B nach subkutaner Applikation mittels szintigraphischen Aufnahmen betrachtet. Die erhaltenen Aufnahmen sind in Abbildung 3.23 dargestellt.

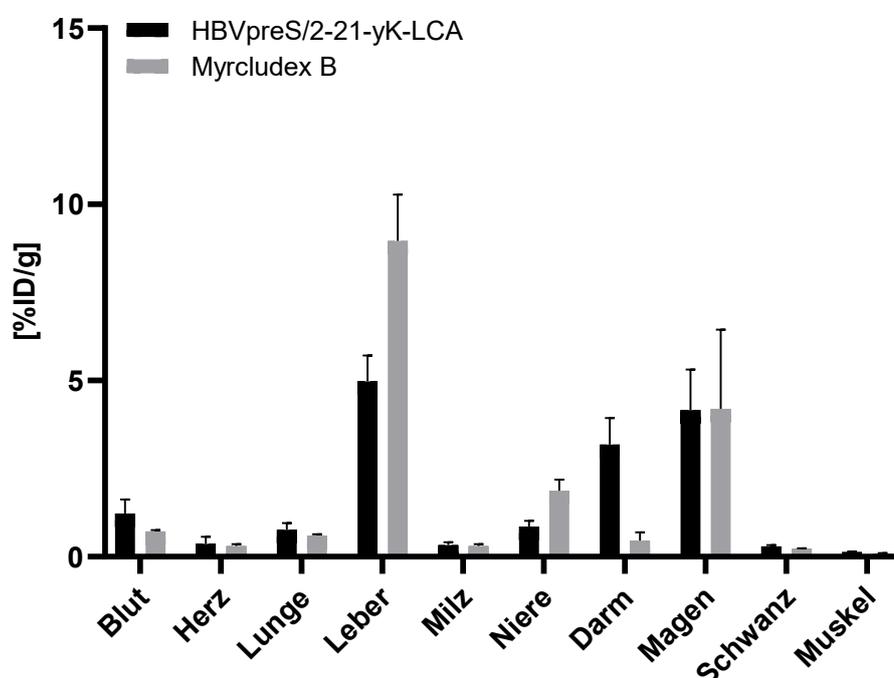


**Abbildung 3.23: Vergleichende Darstellung szintigraphischer Aufnahmen nach subkutaner Applikation nach 10 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min und 24 h.** Die Peptide wurden mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und in die Nackenfalte weiblicher SWISS-Mäuse appliziert. **A)** Myrcludex B als Vergleichssubstanz, **B)** HBVpreS/2-21-yK-LCA und **C)** HBVpreS/2-21-yK-DCA.

Bei Myrcludex B (Abbildung 3.23 **A**)) war bei subkutaner Applikation nach 10 min die Injektionsstelle deutlich zu erkennen, eine Anreicherung in der Leber hat hier jedoch noch nicht begonnen. Von 1 h bis 6 h nimmt die Anreicherung von Myrcludex B deutlich zu und es erfolgte somit eine relativ zügige Verteilung aus der Injektionsstelle in die Leber. Die stärkste Anreicherung in der Leber lag bei 2 bis 4 h vor. Ebenso war ab der szintigraphischen Aufnahme nach 1 h deutlich die Blase zu erkennen. Dies ist wieder ein Zeichen für renale Ausscheidung. Nach 24 h sind noch minimale Reste von Myrcludex B in der Leber zu erkennen. Bei den Gallensäure-Peptid-Konjugaten HBVpreS/2-21-yK-LCA (Abbildung 3.23 **B**)) und HBVpreS/2-21-yK-DCA (Abbildung 3.23 **C**)) war die Injektionsstelle nach 10 min ebenso deutlich zu erkennen. Die weitere Verteilung zeigte jedoch Unterschiede zu Myrcludex B. Nach 1 h war bereits eine geringe Aktivität in der Leber zu erkennen, jedoch lag die Hauptmenge des radioaktiven Konjugats weiterhin in der Injektionsstelle vor. Die maximale Anreicherung in der Leber wurde erst nach 6 h erreicht und bei 2, 4 und 6 h war die Injektionsstelle noch deutlich zu erkennen. Auch nach 24 h war noch eine deutlichere Anreicherung als bei Myrcludex B zu erkennen. Es kann in diesem Fall von einem Depot-Effekt, bei der Abgabe aus der Injektionsstelle an den Wirkort, gesprochen werden. Zusätzlich zur renalen Ausscheidung über die Blase, sind

auch bei subkutaner Applikation der Gallensäure-Peptid-Konjugate die Darmschlingen erkennbar. Bei Vergleich der beiden Gallensäure-Peptid-Konjugate scheint es, als wäre die Anreicherung in der Leber bei HBVpreS/2-21-yK-LCA stärker ausgeprägt als bei HBVpreS/2-21-yK-DCA. Ebenso war auch der Depoteffekt bei HBVpreS/2-21-yK-DCA weniger stark zu beobachten als bei HBVpreS/2-21-yK-LCA.

Zur genaueren Charakterisierung der Gallensäure-Peptid-Konjugate wurde für HBVpreS/2-21-yK-LCA und Myrcludex B als Vergleichssubstanz zusätzlich eine Bioverteilung nach subkutaner Applikation in die Nackenfalte von SWISS-Mäusen nach 4 h durchgeführt. Die Messung wurde jeweils mit drei Mäusen durchgeführt und die daraus resultierende Organverteilung mit Standardabweichung ( $n = 3$ ) ist in Abbildung 3.24 dargestellt.



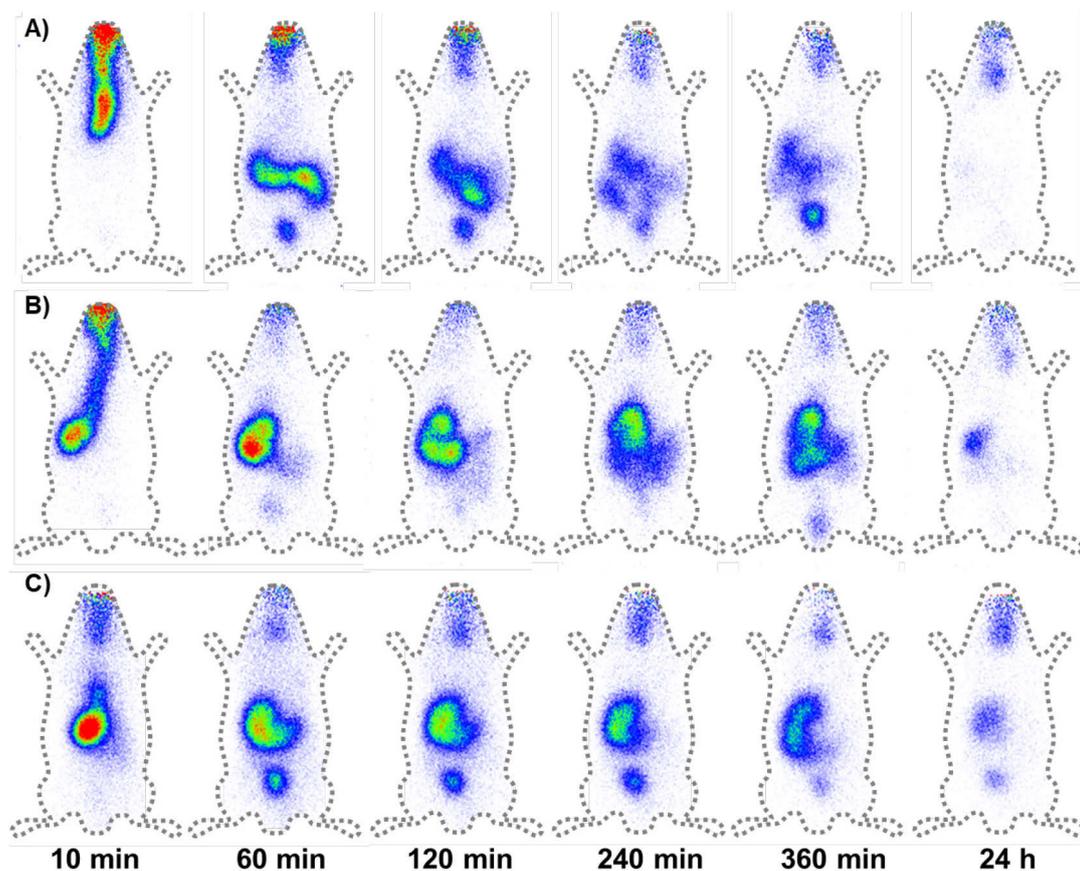
**Abbildung 3.24: Organverteilung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA bei subkutaner Applikation nach 4 h.**  $^{125}\text{I}$ -markiertes Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA wurde jeweils drei Mäusen subkutan in die Nackenfalte appliziert. Nach 4 h wurden die Tiere mit  $\text{CO}_2$  getötet, die Organe entnommen, gewogen und mit dem  $\gamma$ -Counter vermessen.

Bei Betrachtung der Organverteilung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA nach subkutaner Applikation nach 4 h war zu erkennen, dass der größte Anteil der gemessenen Radioaktivität in der Leber vorliegt. Mit 9,0 %ID/g war die Anreicherung bei Myrcludex höher als bei HBVpreS/2-21-yK-LCA mit 5,0 %ID/g. Bei einem Vergleich mit den szintigraphischen Aufnahmen (Abbildung 3.23) war dies so zu erwarten, da das Maximum der Leberanreicherung bei HBVpreS/2-21-yK-LCA erst nach 6 h und nicht wie bei Myrcludex B nach 4 h erreicht wurde. Zusätzlich konnte bei beiden Substanzen Radioaktivität im Magen beobachtet werden. Diese könnte eventuell auf freies  $^{125}\text{I}$ od, welches vom Peptid abgetrennt wurde zurückzuführen sein. Des Weiteren war beim

Gallensäure-Peptid-Konjugat auch Radioaktivität im Darm messbar. Auch dies stimmt mit den szintigraphischen Aufnahmen, bei denen die Darmschlingen sichtbar sind, überein. Es konnte für beide Substanzen eine gute Anreicherung in der Leber nach subkutaner Applikation nach 4 h beobachtet werden. Aufgrund des leichten Depot-Effekts bei HBVpreS/2-21-yK-LCA war nach 6 h noch eine Steigerung der Leberanreicherung zu erwarten, wohingegen die Menge Myrcludex B in der Leber vermutlich schon wieder abnimmt.

Als letztes wurde die Verteilung von HBVpreS/2-21-yK-LCA, HBVpreS/2-21-yK-DCA und Myrcludex B, nach oraler Applikation, mittels szintigraphischen Aufnahmen betrachtet.

Die erhaltenen Aufnahmen sind in Abbildung 3.25 dargestellt.

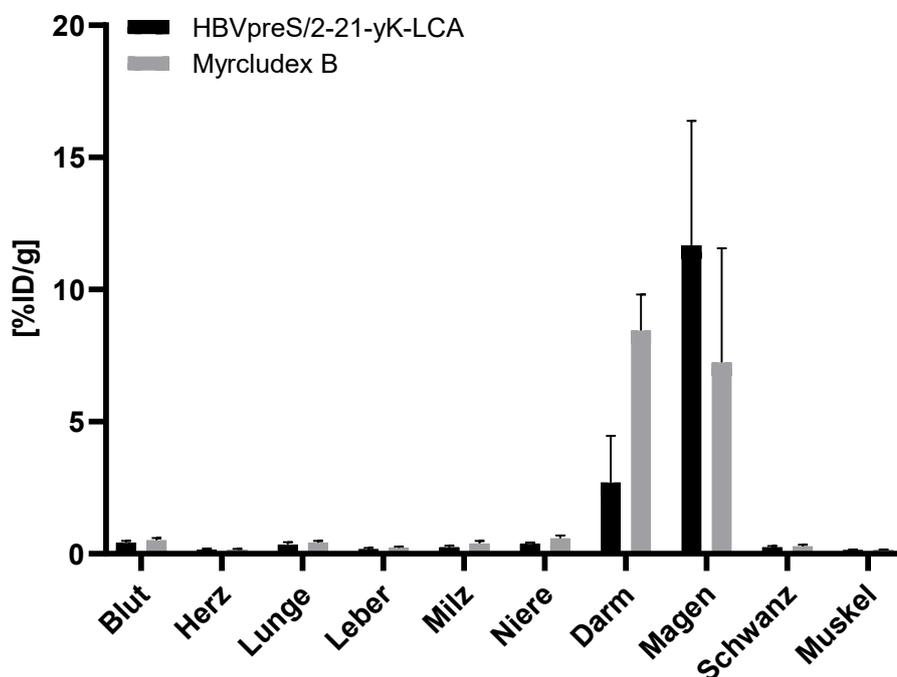


**Abbildung 3.25: Vergleichende Darstellung szintigraphischer Aufnahmen nach oraler Applikation nach 10 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min und 24 h.** Die Peptide wurden mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und mittels Schlundsonde weiblichen SWISS-Mäusen oral verabreicht. **A)** Myrcludex B als Vergleichssubstanz, **B)** HBVpreS/2-21-yK-LCA und **C)** HBVpreS/2-21-yK-DCA.

Bei oraler Applikation war für keine der untersuchten Substanzen eine Anreicherung in der Leber zu beobachten. Die gesamte Radioaktivität befand sich in Magen und Darm, oder wurde renal über die Blase ausgeschieden. Eine orale Aufnahme war somit mit einer einfachen Formulierung als Lösung nicht möglich.

Zur genaueren Charakterisierung der oralen Aufnahme der Gallensäure-Peptid-Konjugate wurde für HBVpreS/2-21-yK-LCA und Myrcludex B als Vergleichssubstanz zusätzlich eine

Organverteilung nach oraler Applikation mittels Schlundsonde in SWISS-Mäusen nach 2 h durchgeführt. Hierzu wurden jeweils drei Mäuse verwendet und die resultierende Organverteilung mit Standardabweichung ( $n = 3$ ) ist in Abbildung 3.26 aufgeführt.



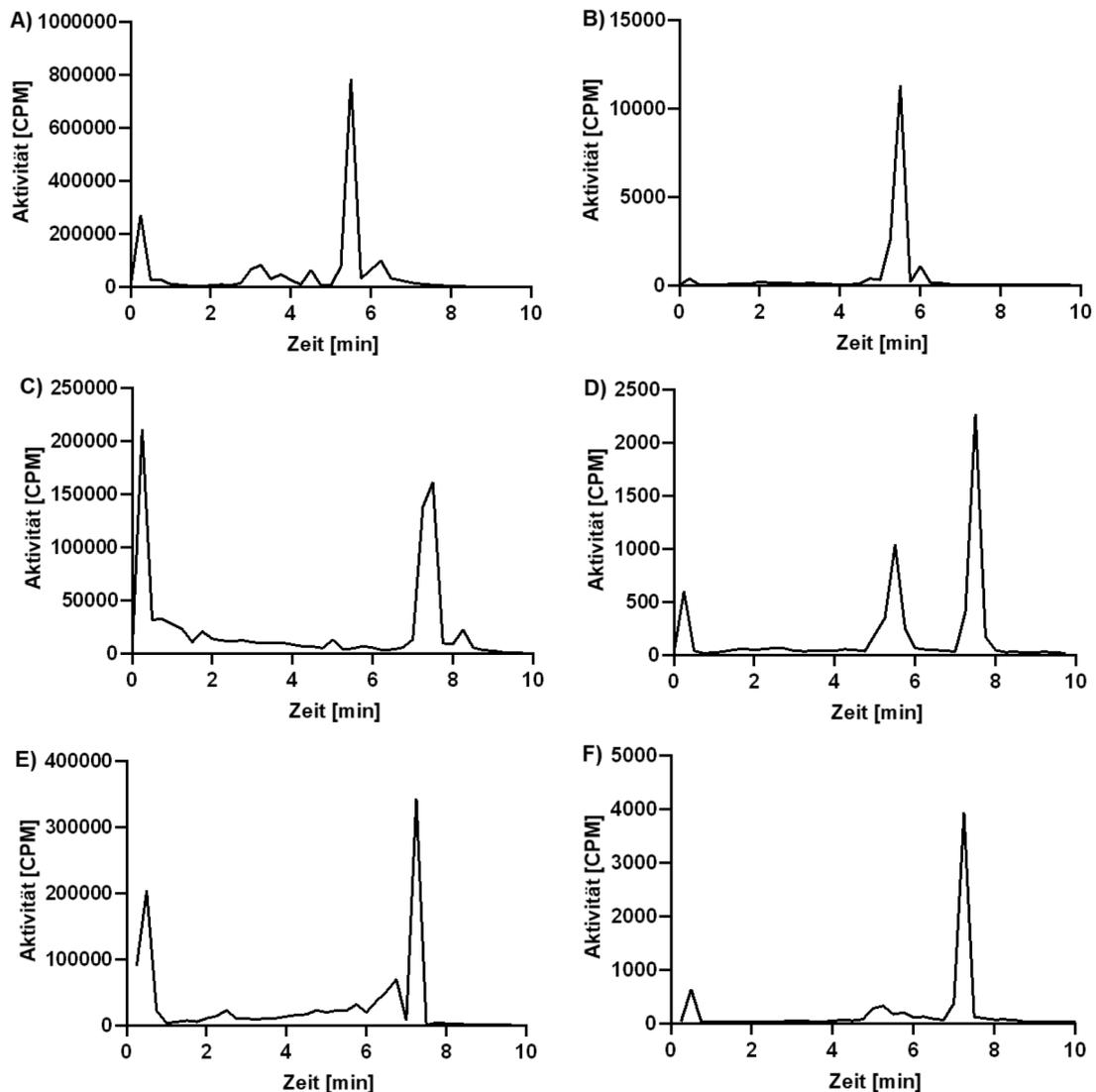
**Abbildung 3.26: Organverteilung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA bei oraler Applikation nach 4 h.**  $^{125}\text{I}$ -markiertes Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA wurde jeweils drei Mäusen oral mittels Schlundsonde appliziert. Nach 4 h wurden die Tiere mit  $\text{CO}_2$  getötet, die Organe entnommen, gewogen und mit dem  $\gamma$ -Counter vermessen.

Wie bereits in den szintigraphischen Aufnahmen zu erkennen war, erfolgt durch orale Verabreichung von HBVpreS/2-21-yK-LCA und Myrcludex B keine Aufnahme in die Leber. Die gesamte Radioaktivität konnte bei beiden Substanzen in Magen und Darm detektiert werden, oder wurde bereits ausgeschieden. Die orale Aufnahme des Gallensäure-Peptid-Konjugats war somit auf diesem Weg nicht möglich. Dies war nach Betrachtung der pharmakokinetischen Daten, LogD-Wert und isoelektrischem Punkt (Kapitel 3.3) auch so zu erwarten. Zur oralen Gabe wäre es somit nötig eine Modifikation des Konjugats oder eine geeignete Formulierung zu wählen, die dies ermöglicht. Hier wäre zum Beispiel der Einschluss in Liposomen oder die Synthese von Nanopartikeln denkbar, die bei geeigneter Modifikation die orale Aufnahme ermöglichen könnten. Für Myrcludex B konnte bereits ein System gezeigt werden, bei dem die orale Aufnahme durch den Einschluss in Liposomen verbessert werden konnte<sup>[199]</sup>.

### 3.4.7 *In vivo* Stabilität in der Leber

Zur Untersuchung der Stabilität der Gallensäure-Peptid-Konjugate in der Leber *in vivo* wurden diese mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und im Mausmodell weibliche SWISS-Maus in die

Schwanzvene injiziert. Nach 2 h wurde die Maus mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet und die Leber entnommen. Diese wurde anschließend homogenisiert und extrahiert. Die Überstände wurden mittels HPLC fraktioniert gesammelt und im  $\gamma$ -Counter analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.27 gezeigt. Als Vergleichssubstanz wurde auch hier Myrcludex B verwendet.



**Abbildung 3.27: Chromatogramme der Leberextrakte nach subkutaner Applikation der <sup>125</sup>I-markierten Substanzen 4 h nach Injektion im Vergleich mit der Ursprungssubstanz. A) <sup>125</sup>I-Myrcludex B, B) Leberextrakt <sup>125</sup>I-Myrcludex B, C) <sup>125</sup>I-HBVpreS/2-21-yK-LCA, D) Leberextrakt <sup>125</sup>I-HBVpreS/2-21-yK-LCA, E) <sup>125</sup>I-HBVpreS/2-21-yK-DCA, F) <sup>125</sup>I-Leberextrakt HBVpreS/2-21-yK-DCA.**

Für Myrcludex B ist eine gute Stabilität in der Leber erkennbar. Wird hier das Chromatogramm des Leberextrakts (Abbildung 3.27 B) mit dem Chromatogramm der ursprünglichen Substanz (Abbildung 3.27 A) verglichen, so ist bei beiden ein Peak bei einer Retentionszeit von 5,75 min erkennbar. Es ist somit davon auszugehen, dass kein Abbau stattgefunden hat, da dies zu einer Verschiebung der Retentionszeit führen würde. Für HBVpreS/2-21-yK-DCA ist ebenfalls eine gute Stabilität erkennbar, da die

Retentionszeit des Peaks aus dem Leberextrakt (Abbildung 3.27 **F**) mit 7,25 min mit der Retentionszeit des Peaks der Ursprungssubstanz (Abbildung 3.27 **E**) übereinstimmt. Beim Gallensäure-Peptid-Konjugat HBVpreS/2-21-yK-LCA ist, zusätzlich zum ursprünglichen Peak mit einer Retentionszeit von 7,75 min (Abbildung 3.27 **C**), ein weiterer Peak bei 5,75 min (Abbildung 3.27 **D**) zu erkennen. Dieser stimmt mit dem Peak des Peptids ohne Gallensäure überein. Das zugehörige Diagramm ist im Anhang gezeigt (Abbildung 11.2). Somit ist das Gallensäure-Peptid-Konjugat *in vivo* in der Leber nicht vollständig stabil. Die Abspaltung der Gallensäure ist womöglich auf ein Enzym in der Leber zurückzuführen, welches in der Gallensäurebiosynthese und somit dem Abbau von Cholesterin zum Einsatz kommt. Der Stabilitätsunterschied zwischen HBVpreS/2-21-yK-LCA und HBVpreS/2-21-yK-DCA ist eventuell auf den unterschiedlichen Syntheseprozess zurückzuführen. Bei beiden Gallensäuren handelt es sich um sekundäre Gallensäuren, jedoch sind bei ihrer Synthese unterschiedliche Enzyme beteiligt<sup>[131]</sup>. Diese haben vermutlich eine unterschiedliche Aktivität, weshalb die Abspaltung der Gallensäure bei HBVpreS/2-21-yK-LCA stärker ausgeprägt sein kann als bei HBVpreS/2-21-yK-DCA. Somit zeigen die Gallensäure-Peptid-Konjugate eine ausreichend gute Stabilität und vor allem Anreicherung in der Leber, sowie eine sehr gute HDV-Infektionsinhibition. Für eine genauere Aussage, welches der beiden Gallensäure-Peptid-Konjugate am besten für die HDV- oder HBV-Therapie geeignet ist, sind weitere Untersuchungen nötig. Von großer Bedeutung wäre hier ein *in vivo* Infektionsmodell, um eine bessere Aussage treffen zu können.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde, ausgehend vom bereits zugelassenen HDV-Eintrittsinhibitor Myrcludex B (Hepcludex®), eine gekürzte Aminosäuresequenz, HBVpreS/2-21-yK, verwendet. Hierzu wurde in einem ersten Schritt ein Vergleich der verschiedenen bekannten HBV-Genotypen durchgeführt, in dem eine unterschiedlich starke HDV-Infektionsinhibition für die verschiedenen Genotypen beobachtet werden konnte. Lediglich Genotyp G zeigte hier keine inhibitorische Aktivität. Dieser ist der einzige Genotyp mit Alanin an Position 7 und somit wird davon ausgegangen, dass dadurch der drastische Verlust der inhibitorischen Aktivität hervorgerufen wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass, bei einer Verlängerung des Peptids zu HBVpreS/-11-21, eine Abnahme der HDV-Infektionsinhibition eintritt. Durch die Synthese einer Mutante von Genotyp B (HBVpreS/-11-21(L5S,S6L)-yK), konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch eine Veränderung in der Sequenz, vor dem Bereich der bindenden Domäne, zu einem Verlust der inhibitorischen Aktivität führt. Die beste HDV-Infektionsinhibition zeigte, neben der consensus-Sequenz, die Mutante von Genotyp G2 (HBVpreS/2-21-yK, L14F). Durch Kombination der beiden Sequenzen konnte keine weitere Steigerung der HDV-Infektionsinhibition erzielt werden und für die weiteren Versuche wurde die gekürzte Myrcludex B-Sequenz (HBVpreS/2-21-yK consensus) verwendet.

Bei Verwendung des gekürzten HBVpreS/2-21-yK-Peptids mit verschiedenen Fettsäuren von C10 bis C18 konnte der gleiche Effekt, wie bereits bei Myrcludex B, beobachtet werden, dass mit zunehmender Fettsäurelänge auch eine zunehmende HDV-Infektionsinhibition einherzugehen scheint. Dies ist jedoch nur bedingt der Fall, da mit zunehmender Länge auch die cytotoxischen Eigenschaften steigen. Aus diesem Grund wurde, wie auch bei Myrcludex B, Myristinsäure (C14) verwendet, da diese ein guter Mittelweg zwischen inhibitorischer und cytotoxischer Aktivität darstellt und zudem auch die natürliche Modifikation des HBV darstellt<sup>[163]</sup>.

Als weitere Modifikation wurden verschiedene Gallensäuremonomere an das C-terminal angefügte Lysin konjugiert. Hierbei konnte, bei allen natürlich vorkommenden Gallensäuremonomeren, eine Steigerung der inhibitorischen Aktivität erzielt werden. Dies spricht in gewisser Weise dafür, dass es zwei verschiedene Bindestellen am NTCP für Gallensäuren und essentieller Domäne des HBV gibt und durch die gebildeten Gallensäuremonomer-Peptid-Konjugate beide Stellen adressiert werden können<sup>[116, 200]</sup>. Die beste inhibitorische Aktivität zeigten hierbei HBVpreS/2-21-yK-DCA, HBVpreS/2-21-yK-LCA und die Mutante HBVpreS/2-21(T3K)-yK-LCA. Bei der Konjugation von Myrcludex B mit zusätzlicher Gallensäure trat eine Verringerung der HDV-Infektionsinhibition ein. Es wird daher angenommen, dass hierbei die akzessorische Domäne und die Gallensäure um die zweite Bindestelle im NTCP konkurrieren, sodass

die Interaktion abnimmt und dadurch die Verringerung eintritt<sup>[116, 200]</sup>. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Konfiguration des Lysins für die Bindung und Inhibition von großer Bedeutung ist. Bei Verwendung von D-Lysin statt L-Lysin an der Konjugationsstelle nimmt die inhibitorische Aktivität stark ab. Des Weiteren wurde die Anordnung von Myristinsäure und Gallensäure an C- und N-Terminus variiert und deren Einfluss charakterisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Myristinsäure für eine gute HDV-Infektionsinhibition essentiell ist. Die Position ist hierbei weniger entscheidend, jedoch zeigt die standardmäßig verwendete N-terminale Fettsäurekopplung, welche der natürlichen Modifikation entspricht, eine minimal bessere inhibitorische Aktivität. Insgesamt konnte durch die Modifikationen mit den verschiedenen Gallensäuremonomeren ein positiver Effekt auf die HDV-Infektionsinhibition erzielt werden und Vermutungen, bezüglich der Bindung an NTCP, bestätigt werden.

Als weitere Optimierung wurden verschiedene Gallensäuredimere synthetisiert und ans Peptid konjugiert, da diese bei anderen Einsatzbereichen einen positiven Effekt im Vergleich zu den Gallensäuremonomeren gezeigt haben<sup>[125, 145, 201-202]</sup>. Ebenso konnte, gerade bei der HBV-Infektion, durch den Einsatz verschiedener Gallensäuredimere, eine gute Inhibition erzielt werden. Den besten Effekt zeigte hier das Kopf-Schwanz-verknüpfte Gallensäuredimer-Konjugat TauroUDCA-UDCA mit 58 nM<sup>[125]</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Arten der Verknüpfung (Kopf-Schwanz und Schwanz-Schwanz über 3-OH), wie auch der Einsatz verschiedener Linker zwischen den Gallensäuren getestet. Die HDV-Infektionsinhibition konnte hierdurch bei den meisten Gallensäuredimer-Peptid-Konjugaten, im Vergleich zum Ausgangspeptid HBVpreS/2-21-yK, zwar verbessert werden, eine weitere Steigerung im Vergleich zu den Gallensäuremonomer-Peptid-Konjugaten jedoch nicht erreicht werden. Zudem war die Ausbeute der Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate gering, da der Umsatz während der Konjugation nicht vollständig war. Dies ist vermutlich auf den sterischen Anspruch der Gallensäure und die damit zusammenhängende anspruchsvolle Reaktion, zurückzuführen. Trotz diverser Weiterentwicklungen in der Katalyse und anderen Optimierungen in der Reaktionsführung, ist die Dimerisierung der Gallensäure immer noch eine Herausforderung<sup>[140]</sup>. Zur Steigerung der Kopplungseffizienz und somit der Ausbeute, wäre eventuell die Synthese eines Aktivesters, wie zum Beispiel ein NHS-Ester, denkbar. Dadurch könnte eventuell die Aktivierung der Carbonsäure verbessert und somit die Ausbeute des Gallensäuredimer-Peptid-Konjugats erhöht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre den Aufbau der Gallensäuredimere zu variieren und, statt der verwendeten 3-OH-Position, zur Verknüpfung der beiden Gallensäurebausteine andere, je nach Gallensäure vorhandenen, Hydroxy-Gruppen zu verwenden. Dadurch kann die räumliche Struktur der Gallensäuredimere variiert werden und statt der bisher synthetisierten und untersuchten

symmetrischen Gallensäuredimere würden asymmetrische Gallensäuredimere erhalten werden. Bei geeigneter Schützung der verschiedenen Hydroxy-Gruppen und passender Reaktionsführung ist dies möglich, da dadurch auch Verknüpfungen über 7-OH oder 12-OH ermöglicht werden würde<sup>[178-179, 181, 203-204]</sup>. Die geänderte Struktur könnte dann auch einen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität haben, da dadurch eventuell die Bindetasche besser adressiert und somit die Bindung verstärkt werden könnte.

Durch die Cyclisierung der Peptide über die Ausbildung einer Disulfidbrücke wurde ebenfalls versucht, eine geänderte räumliche Struktur zu erreichen und die Bindung an NTCP und die Virusinhibition positiv zu beeinflussen. In einem ersten Schritt konnte durch die Cyclisierung des Ausgangs-peptids HBVpreS/2-21-yK eine Verbesserung der inhibitorischen Aktivität im Vergleich zum linearen Peptid erreicht werden. Durch die folgende Konjugation der Gallensäure konnte diese auch weiter verbessert werden, die inhibitorische Aktivität der linearen Gallensäuremonomer-Peptid-Konjugate wurde aber nicht erreicht. Im cyclischen HBVpreS/2-21-yK-Peptid befinden sich Myristinsäure und Gallensäure in direkter räumlicher Nähe zueinander. Es wurde vermutet, dass dies die HDV-Infektionsinhibition negativ beeinflusst, weshalb weitere Derivate mit anderen Konjugationsstellen der Gallensäure synthetisiert wurden. Bei einem Vergleich der verschiedenen cyclischen Derivate zeigt jeweils das Gallensäure-Peptid-Konjugat eine bessere HDV-Infektionsinhibition als das zugehörige Peptid. Dennoch war keine der synthetisierten Varianten besser als das cyclische HBVpreS/2-21-yK-Peptid. Es konnte so zwar der positive Einfluss der Gallensäurekonjugation bestätigt werden, eine weitere Verbesserung der inhibitorischen Aktivität wurde dadurch aber nicht erreicht. Dies ist in gewisser Weise von Nachteil, da bei Betrachtung der CYP P450-Stabilität (Kapitel 3.4.3) gerade die cyclische Variante eine sehr hohe Stabilität ohne Ausbildung verschiedener Abbauprodukte zeigte. Die schlechte Stabilität der Disulfidbrücke in Serum könnte durch den Einsatz einer Cyclisierung über eine Amidbindung verbessert werden<sup>[205-206]</sup>. Da hier die Synthese jedoch aufwendiger ist, wurde in dieser Arbeit für die ersten Versuche und Anhaltspunkte des Einflusses auf die HDV-Infektionsinhibition der synthetisch einfachere Weg über die Ausbildung der Disulfidbrücke gewählt.

Bei Betrachtung des Verhaltens der Gallensäure-Peptid-Konjugate *in vivo* zeigen sowohl Gallensäuremonomer- als auch Gallensäuredimer-Peptid-Konjugate ein mit Myrcludex B vergleichbares Verhalten bei intravenöser Applikation, mit einer schnellen Anreicherung in der Leber und einer langsamen Ausscheidung, bei der auch nach 24 h noch Substanz in der Leber vorzufinden ist. Dies war zu erwarten, da NTCP sowohl für die HBVpreS-Sequenz als auch für Gallensäuren eine Bindestelle besitzt, dennoch ist die Bestätigung ein positiver Aspekt für die weitere Entwicklung<sup>[116-117]</sup>.

Da innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Sequenz einen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität hat und bei den drei verschiedenen Peptidlängen HBVpreS/2-48, HBVpreS/2-21 und HBVpreS/-11-21 ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse in der HDV-Infektionsinhibition zeigten, wurde, in einer im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten und betreuten Masterarbeit (Sonja Sailer, *Bile acid-peptide conjugates in the treatment of hepatitis B and D*, August 2022 – Februar 2023), eine Untersuchung der Gallensäure-Peptid-Konjugate mit verschiedenen Peptidlängen zwischen Myrcludex B (HBVpreS/2-48) und HBVpreS/2-18 genauer untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Peptide unterschiedlicher Länge auch unterschiedliche inhibitorische Aktivitäten aufweisen. Hierbei war jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen Peptidlänge und Zunahme der HDV-Infektionsinhibition erkennbar. Dies stimmt ebenfalls mit den von Glebe *et al.* gezeigten Ergebnissen zur Charakterisierung der akzessorischen Domäne überein<sup>[92]</sup>. Auch eine Kürzung auf der N-terminalen Seite, zwischen Myristinsäure und bindender Domäne, wurde in diesem Zusammenhang untersucht, führte jedoch ebenfalls nicht zu einer weiteren Steigerung der HDV-Infektionsinhibition. Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der inhibitorischen Aktivität wäre, die Position der Gallensäurekonjugationsstelle zu variieren und diese, statt am C-terminalen Ende des Peptids, an eine Position innerhalb der Peptidsequenz zu positionieren. Dies könnte vor allem bei minimal verlängerten Peptiden oder bei Myrcludex B von Interesse sein, da dadurch eventuell die Kombination von Gallensäure und akzessorischer Domäne möglich werden und einen positiven Einfluss auf die Bindung der Gallensäure-Peptid-Konjugate an NTCP und somit auf die inhibitorische Aktivität haben könnte.

Zukünftig ist es wichtig, die Bindung der Gallensäure-Peptid-Konjugate an NTCP genauer zu untersuchen und zu verstehen, da nur dadurch gezielte Modifikationen zur weiteren Steigerung der Bindung und somit eventuell auch der HDV-Inhibition erzielt werden können.

Die beiden monomeren Gallensäure-Peptid-Konjugate HBVpreS/2-21-yK-LCA ( $IC_{50} = 1,6 \text{ nM}$ ) und HBVpreS/2-21-yK-DCA ( $IC_{50} = 1,2 \text{ nM}$ ) zeigen gegenüber HBV sehr gute inhibitorische Effekte. Ebenso konnte für beide Substanzen eine Leberanreicherung *in vivo* in der Maus, nach intravenöser Applikation, gezeigt werden. Vielversprechend ist hier der, bei subkutaner Applikation, beobachtete Depoteffekt der beiden Konjugate, da dies ein verbessertes Wirkprofil gegenüber Myrcludex B darstellen könnte. Hier wäre es als weitere Bestätigung empfehlenswert auch die Inhibition gegenüber HBV zu untersuchen. Des Weiteren ist bekannt, dass durch Myrcludex B die eigentliche Funktion des NTCP, die Wiederaufnahme von Gallensäuren, gehemmt wird. Diese sind für den Fettstoffwechsel von großer Bedeutung. Eventuelle Spätfolgen hiervon sind zwar noch nicht bekannt,

können aber nicht ausgeschlossen werden<sup>[11, 36, 99]</sup>. Deshalb wäre es ebenfalls von Bedeutung, die Aufnahme der Gallensäuren bei Verwendung der Gallensäure-Peptid-Konjugate genauer zu untersuchen. Gerade HBVpreS/2-21-yK-LCA, stellt hier einen vielversprechenden Kandidaten dar, da LCA kein natürliches Substrat für NTCP ist<sup>[127]</sup>. Somit besteht die Möglichkeit, dass die Aufnahme der Gallensäuren eventuell unbeeinflusst bleibt, eine Infektion mit HDV oder HBV jedoch inhibiert werden könnte.

Ein weiterer großer Vorteil der monomeren Gallensäure-Peptid-Konjugate ist die deutlich gekürzte Peptidsequenz, die, statt 47 Aminosäuren in Myrcludex B, lediglich aus 22 Aminosäuren besteht. Dies führt zu einer leichteren Synthese mit besserer Ausbeute. Zusätzlich können die Synthesekosten verringert werden, da der Verbrauch an Chemikalien ebenfalls reduziert wird.

Letztendlich zeigen die Gallensäure-Peptid-Konjugate HBVpreS/2-21-yK-LCA und HBVpreS/2-21-yK-DCA sehr gute Ergebnisse *in vitro* und *in vivo* und sind somit vielversprechende Kandidaten für die HBV und HDV-Therapie.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5.1: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe.

Bezeichnung	Hersteller
Alufolie	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, DE)
Cellstar® Tubes (15 mL; 50 mL)	Greiner Bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
DC-Platten: Kieselgel 60 F <sub>254</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Faltenfilter, 125 mm	VWR International (Radnor, US)
Filterpapier	VWR International (Radnor, US)
Filterplatte 35 µm	Reichert Chemietechnik GmbH (Heidelberg, DE)
Handschuhe	Paul Hartmann AG (Heidenheim, DE)
HPLC Vials	Wicom Germany GmbH (Heppenheim, DE)
Kanülen	Becton Dickinson (Franklin Lakes, US) TSK Laboratory (Vancouver, CA)
Micro Inserts	Wicom Germany GmbH (Heppenheim, DE)
Microplatte 96-Well, PS, transparent, F-Boden	Greiner Bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Microplatte 96-Well, PS, transparent, V-Boden	Greiner Bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Norell® Standard Series™ 5 mm NMR-Röhrchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)
PhastGel™ IEF 3-9	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE)
Reagiergefäß (1,5 mL; 2 mL)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)
Regiergefäß (Röhre 4 mL)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)
Röhren (5 mL, 75×12 mm, PS)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)
Schraubkappen für Vials	Wicom Germany GmbH (Heppenheim, DE)
S-Monovette®	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)
Lithium-Heparin-Gel	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)
Spritzenfilter ROTILABO® (0,45 µM, PTFE)	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, DE)
Spritzen (2 mL, 5 mL, 10 mL)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, US)

## 5.1.2 Chemikalien

Tabelle 5.2: Übersicht der verwendeten Chemikalien mit Herstellerangabe.

Bezeichnung	Hersteller
<b>0,9 %-NaCl-Lösung (isoton)</b>	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
<b>1,12-Dodecandisäure</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b><sup>125</sup>Iod</b>	Hartmann Analytic (Braunschweig, DE)
<b>4-Methylmorpholin</b>	FLUKA Chemie GmbH (Buchs, CH)
<b>Acetonitril (HPLC Qualität)</b>	Honeywell International Inc. (Morristown, US)
<b>Aluminiumsulfat-Hydrat</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, DE)
<b>Ascorbinsäure</b>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
<b>Benzylbromid</b>	FLUKA Chemie GmbH (Buchs, CH)
<b>Bernsteinsäureanhydrid</b>	FLUKA Chemie GmbH (Buchs, CH)
<b>Borandimethylaminkomplex</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Caprinsäure</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Casein</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, DE)
<b>Chenodesoxycholsäure</b>	abcr GmbH (Karlsruhe, DE)
<b>Chlorameisensäureethylester</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Chloramin-T</b>	Caesar und Loretz GmbH (Hilden, DE)
<b>Chloroform-d</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Cholsäure</b>	abcr GmbH (Karlsruhe, DE)
<b>COMU</b>	Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, DE)
<b>Coomassie G250</b>	AppliChem (Darmstadt, Germany)
<b>CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O</b>	Grüssing GmbH (Filsum, DE)
<b>DCC</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>DCM</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Desoxycholsäure</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>DIC</b>	Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, DE)
<b>Diethylether</b>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
<b>Dinatriumhydrogenphosphat</b>	Grüssing GmbH (Filsum, DE)
<b>DIPEA</b>	Biosolve BV (Valkenswaard, NL)
<b>DMAP</b>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)

<b>DMEM</b>	Invitrogen (Waltham, US)
<b>DMF</b>	Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, DE)
<b>DMSO</b>	Honeywell International Inc. (Morristown, US)
<b>EDC-HCl</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, DE)
<b>ELISABright Chemilumineszenzsubstrat</b>	Advansta Inc. (San Jose, US)
<b>Essigsäure</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Essigsäureethylester</b>	Zentralbereich Neuenheimer Feld (Heidelberg, DE)
<b>Ethanol</b>	Zentralbereich Neuenheimer Feld (Heidelberg, DE)
<b>Ethylendiamin</b>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
<b>Ethylenglykol</b>	Grüssing GmbH (Filsum, DE)
<b>Fetal Bovine Serum Gold</b>	GE Healthcare (Chicago, US)
<b>Fmoc-D-Lysin(Mtt)</b>	Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, DE)
<b>Fmoc-D-Tyrosin</b>	Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, DE)
<b>Fmoc-L-Aminosäuren</b>	Orpegen Peptide Chemicals GmbH (Heidelberg, DE)
<b>Fmoc-L-Lysin(alloc)</b>	Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, DE)
<b>Fmoc-OSu</b>	Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, DE)
<b>HATU</b>	Biosynth AG (Staad, CH)
<b>HBTU</b>	Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, DE)
<b>Hexan</b>	VWR International (Radnor, US)
<b>HOBt</b>	Biosolve BV (Valkenswaard, NL)
<b>IEF-Marker 3-10, mix</b>	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE)
<b>Iod</b>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
<b>Isofluran</b>	Baxter Deutschland GmbH (Unterschleißheim, DE)
<b>Jones Reagenz</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Kaliumcarbonat</b>	Zentralbereich Neuenheimer Feld (Heidelberg, DE)
<b>Kieselgel 60 (0,063 – 0,0200 mm)</b>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
<b>Laurinsäure</b>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
<b>L-Glu 200 mM</b>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
<b>Lithocholsäure</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Magnesiumsulfat</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, DE)
<b>Methanol</b>	VWR International (Radnor, US)

---

<b>Methansulfonsäurechlorid</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Myristinsäure</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>NADPH-Tetranatriumsalz</b>	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, US)
<b>Natriumazid</b>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
<b>Natriumchlorid</b>	Bernd Kraft GmbH (Duisburg, DE)
<b>Natriumdihydrogenphosphat-1-Hydrat</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Natriumhydrogencarbonat</b>	Zentralbereich Neuenheimer Feld (Heidelberg, DE)
<b>Natriumphosphat-Konzentrat</b>	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
<b>NMP</b>	Iris Biotech GmbH (Marktrechwitz, DE)
<b>o-Phosphorsäure</b>	Bernd Kraft GmbH (Duisburg, DE)
<b>Oxalylchlorid</b>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
<b>Oxyma pure</b>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
<b>Palmitinsäure</b>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
<b>Paraformaldehyd</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>PBS</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Pd/C</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL)</b>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
<b>Piperidin</b>	Biosolve BV (Valkenswaard, NL)
<b>Propargylamin</b>	FLUKA Chemie GmbH (Buchs, CH)
<b>p-Toluolsulfonsäure*H<sub>2</sub>O</b>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
<b>Puromycin</b>	InvivoGen (San Diego, US)
<b>PyAOP</b>	FLUKA Chemie GmbH (Buchs, CH)
<b>Pyridin</b>	VWR International (Radnor, US)
<b>S9 (Pooled, human)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Salzsäure</b>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
<b>Stearinsäure</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Succinylchlorid</b>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
<b>Sulfurylchlorid</b>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
<b>Taurin</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Tentagel R Rink-Amid-Harz (0,2 mmol/g)</b>	Rapp Polymere GmbH (Tübingen, DE)
<b>Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)

<b>TFA</b>	Biosolve BV (Valkenswaard, NL)
<b>THF</b>	Honeywell International Inc. (Morristown, US)
<b>TIS</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Toluol</b>	Honeywell International Inc. (Morristown, US)
<b>Triethylamin</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Triphenylphosphin</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)
<b>Triton X-100</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, DE)
<b>Tween 20</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, DE)
<b>Ursodeoxycholsäure</b>	abcr GmbH (Karlsruhe, DE)
<b>Wasser (HPLC Qualität)</b>	VWR International (Radnor, US)
<b>Wasserstoffperoxid-Lösung (35 %)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE)

### 5.1.3 Geräte

Tabelle 5.3: Übersicht der verwendeten Geräte mit Modell und Hersteller.

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Aktivimeter</b>	Isomed 2010	Nuvia Instruments (Dülmen, DE)
<b>Analytische HPLC</b>	1100 series	Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, US)
<b>Analytische Radio-HPLC (<math>\gamma</math>-Detektion)</b>	Säule: Chromolith® RP18e, 100 × 3 mm	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
	1100 series	Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, US)
<b>Fraktionssammler</b>	Säule: Chromolith® RP18e, 100 × 3 mm	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
	FC 203 B	Gilson Inc. (Middleton, US)
<b>Gefriertrockner</b>	Alpha 2-4 LDplus	Martin Christ GmbH (Osterode, DE)
<b><math>\gamma</math>-Counter</b>	Cobra auto-gamma	PerkinElmer® (Waltham, US)
<b><math>\gamma</math>-Kamera</b>	Gammaimager	Biospace Lab, (Nesles-la-Vallée, FR)
<b>Homogenisator</b>	Ultra-Turrax I8	IKA Labortechnik (Staufen im Breisgau, DE)
<b>Massenspektrometer</b>	Exacte Plus Orbitrap	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
	HPLC: 1200 series	Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, US)
	Säule: Hypersil Gold, aQ, 200 × 2,1 mm	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
<b>Mikrotiterplattenleser</b>	Infinite Tecan M200	Tecan Group AG (Männedorf, CH)

<b>Mikrowelle</b>	R-220A	Sharp K.K. (Osaka, JP)
<b>Narkosemittelverdampfer</b>	Vapor 2000 Sevoflurane	Drägerwerk AG & Co. KgaA (Lübeck, DE)
<b>NMR-Spektrometer</b>	Varian Systems 300 MHz und 500 MHz	Varian, Inc. (Palo Alto, US)
<b>PhastSystem Separationseinheit</b>	PhastSystem	Pharmacia (Upsala, SE)
<b>Peptidsynthesizer</b>	ABI 433A	Applied Biosystems (Foster City, US)
	Liberty Blue™	CEM Corporation (Matthews, US)
<b>Präparative HPLCs</b>	LaPrep P110	VWR International (Radnor, US)
	331 series	Gilson Inc. (Middleton, US)
	Säule: Chromolith® SemiPrep RP18e, 100 × 10 mm	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
	Säule: ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 250 × 25 mm	Dr. Maisch GmbH (Ammerbuch-Entringen, DE)
	Säule: ReproSil Gold C18, 150 × 20 mm	Dr. Maisch GmbH (Ammerbuch-Entringen, DE)
<b>Präparative Radio-HPLC</b>	LaChrom	Hitachi (Chiyoda, JP)
	Säule: Chromolith® RP-18e, 100 × 3 mm	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
<b>Rotationsverdampfer</b>	Rotavapor R-200	BÜCHI Labortechnik GmbH (Essen, DE)
	Rotavapor M (radioaktiv)	BÜCHI Labortechnik GmbH (Essen, DE)
<b>Schüttler Eppis</b>	Thermomixer compact	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
<b>Schüttler Peptide</b>	Vibramax 100	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, DE)
<b>UV-Analysator</b>	UV Cabinet 4	CAMAG Chemie- Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG & Co. GmbH (Berlin, DE)
<b>Vakuumpumpe</b>	Trivac D8B	Lexbold GmbH (Köln, DE)
<b>Vortexer</b>	Vortex Genie 2	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, DE)
<b>Waagen</b>	XS105 Dual Range	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, DE)
	A120S	Sartorius AG (Göttingen, DE)
<b>Zentrifugen</b>	Universal 16 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE)
	Biofuge pico	Heraeus (Hanau, DE)
	Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau, DE)

### 5.1.4 Tiere

Tabelle 5.4: Übersicht der für Tierversuche verwendeten Tiere mit Herstellerangabe.

Bezeichnung	Hersteller
<b>SWISS (RjOrl:SSWISS) Mäuse</b>	Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, FR)

### 5.1.5 Software

Tabelle 5.5: Übersicht der verwendeten Software mit Anwendungsgebiet und Herstellerangabe.

Name	Anwendung	Hersteller
<b>ChemDraw Professional 16.0</b>	Strukturformeln	PerkinElmer® (Waltham, US)
<b>EndnoteX9</b>	Literaturverwaltung	Clarivate Analytics (London, UK)
<b>GraphPad Prism 8</b>	graphische Auswertung	GraphPad Software (San Diego, US)
<b>γ-Acquisition</b>	Aufnahme SPECT	Biospace Lab (Nesles-la-Vallée, FR)
<b>γ-Vision</b>	Bearbeitung SPECT	Biospace Lab (Nesles-la-Vallée, FR)
<b>Liberty Blue Application Software</b>	Peptidsynthese	CEM Corporation (Matthews, US)
<b>MestReNova</b>	NMR-Auswertung	Mestrelab Research (Santiago de Compostela, ES)
<b>Microsoft Office Excel</b>	Berechnungen	Microsoft Corporation (Redmond, US)
<b>Microsoft Office Powerpoint</b>	Grafiken	Microsoft Corporation (Redmond, US)
<b>Microsoft Office Word</b>	Textverarbeitung	Microsoft Corporation (Redmond, US)
<b>Origin 9</b>	Datenauswertung	OriginLab® (Northampton, US)
<b>SynthAssist3.1</b>	Peptidsynthese	Applied Biosystems (Foster City, US)

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc/tBu-Strategie

#### 5.2.1.1 Automatisierte Festphasensynthese

Zur automatisierten Festphasenpeptidsynthese wurde ein ABI 433A Synthesizer (Applied Biosystems) verwendet. Hierbei wurde standardmäßig eine 0,05 mmol-Synthese auf Rink-Amid-Harz (Tentagel R RAM, Rapp Polymere) durchgeführt. Die Aminosäuren (0,5 mmol; 10 Äq.) wurden mittels HBTU in DMF (0,45 M; 9 Äq.) versetzt und durch Zugaben von DIPEA (1 mmol; 20 Äq.) aktiviert und gekoppelt. Als Lösungsmittel wurde NMP verwendet. Nach erfolgter Kopplung wurde die Fmoc-Schutzgruppe mittels 20 % Piperidin in NMP entfernt, was mittels UV/Vis-Detektion bei 301 nm kontrolliert wurde. Nach einem weiteren NMP-Waschschritt wurde die nächste Aminosäure gekoppelt. Dies wurde so lange wiederholt, bis das Peptid vollständig aufgebaut war. Bei den Aminosäuren Asp, Asn und Pro wurde die Kopplungszeit um 15 min verlängert.

Zusätzlich wurde gegen Ende der Arbeit ein Liberty Blue™ Mikrowellensynthesizer (CEM Corporation) verwendet. Der Syntheseansatz hatte die gleiche Größe (0,05 mmol), jedoch wurden nur 4 Äq. der Aminosäuren eingesetzt. Die Aktivierung erfolgte hierbei mittels 0,25 M DIC in DMF und 0,5 M Oxyma in DMF. Als Lösungsmittel diente DMF.

#### 5.2.1.2 Manuelle Aminosäurekopplung

Zur manuellen Aminosäurekopplung wurde zunächst das verwendete Harz mit DCM gequollen und mit DMF gewaschen. Anschließend wurde, wenn nötig, die Fmoc-Schutzgruppe durch zweimalige Inkubation (5 min) in 20 % Piperidin in DMF entfernt. Es wurden 4 Äq. der jeweiligen Aminosäure und 3,8 Äq. HBTU in 2 mL DMF gelöst, durch Zugabe von 8 Äq. DIPEA aktiviert und zum Harz auf die Spritze aufgezogen und 1 h bei RT auf dem Schüttler zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde drei Mal mit DMF gewaschen, Fmoc wie zuvor beschrieben abgespalten, erneut mit DMF gewaschen und die nächste Aminosäure aufgezogen. Diese Schritte wurden so lange wiederholt, bis die Peptidsequenz vollständig aufgebaut war.

#### 5.2.1.3 Alloc-Abspaltung

Zur Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe wurde das zuvor getrocknete Harz mit DCM gewaschen. Zudem wurden 3 mg Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) und 30 mg Borandimethylaminkomplex in 2 mL DCM gelöst, zum Harz auf die Spritze aufgezogen und für 20 min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und drei Mal mit DCM und Methanol gewaschen. Zur vollständigen Entfernung aller Verunreinigungen wurde das Harz zwei Mal 30 min in 2 mL DCM/MeOH 10:1 inkubiert

und danach je drei Mal mit DCM und Diethylether gewaschen und abschließend im Vakuum getrocknet.

#### **5.2.1.4 Kopplung von Myristinsäure**

Zur Kopplung der Myristinsäure (myr) an den N-Terminus wurden 10 Äq. der zu koppelnden Substanz und 9,8 Äq. HBTU in 3 mL DMF gelöst, durch Zugabe von 20 Äq. DIPEA aktiviert und zum Harz auf die Spritze aufgezogen und 2,5 h bei RT auf dem Schüttler zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde je drei Mal mit DMF, DCM und Diethylether gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet.

#### **5.2.1.5 Kopplung von Gallensäuremonomeren**

Die Kopplung der Gallensäuremonomere an die Lysinseitenkette des Peptids erfolgte analog zur in Kapitel 5.2.1.4 beschriebenen Myristinsäurekopplung.

#### **5.2.1.6 Kopplung von 1,12-Dodecandisäure**

Die Kopplung von 1,12-Dodecandisäure an die Lysinseitenkette des Peptids erfolgte analog zur in Kapitel 5.2.1.4 beschriebenen Myristinsäurekopplung.

#### **5.2.1.7 Kopplung von Gallensäuredimeren**

Zur Kopplung der verschiedenen Gallensäuredimere wurden 100 mg HBVpreS/2-21-yK auf Tentagel R RAM Harz (0,0125 mmol) in eine Spritze eingewogen. Zudem wurden 2 Äq. des jeweiligen Dimers (0,025 mmol) und 10 mg HATU (0,024 mmol; 1,9 Äq.) in 2 mL DMF gelöst und durch Zugabe von 10 µL DIPEA (0,05 mmol; 4 Äq.) aktiviert. Die Lösung wurde zum Harz auf die Spritze aufgezogen und 3 h bei RT auf dem Schüttler zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde je drei Mal mit DMF, DCM und Diethylether gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet.

#### **5.2.1.8 Kopplung von Bernsteinsäureanhydrid**

Die Kopplung von Bernsteinsäureanhydrid erfolgte an die Lysinseitenkette des Peptids (HBVpreS/2-21-yK) zur Verlängerung und Bereitstellung einer freien Säuregruppe zur weiteren Kopplung von Aminen.

Es wurden 1,75 mg Bernsteinsäureanhydrid (0,0175 mmol; 1,25 Äq.) in 2 mL Pyridin gelöst und anschließend 0,85 mg DMAP (0,007 mmol; 0,5 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde zum Peptid (0,014 mmol; 1 Äq.) auf die Spritze aufgezogen und über Nacht auf dem Schüttler zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde die Reaktionslösung entfernt und das Harz je drei Mal mit DMF, DCM und Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

### 5.2.1.9 Kopplung von Ethylendiamin

1,9  $\mu\text{L}$  Ethylendiamin (1,7 mg; 0,028 mmol; 2 Äq.) wurden in 1 mL DMF gelöst und 7,6  $\mu\text{L}$  DIPEA (0,042 mmol; 3 Äq.) zugegeben. Als zweite Lösung wurden 2,1 mg HOBt (0,015 mmol; 1,1 Äq.) und 8,0 mg PyAOP (0,015 mmol; 1,1 Äq.) in 1 mL DMF gelöst. Beide Lösungen wurden nacheinander zum Peptid (HBVpreS/2-21-yK) auf die Spritze aufgezogen und 2 h auf dem Schüttler zur Reaktion gebracht.

### 5.2.1.10 Kopplung von Fmoc-Taurin-Chlorid

Zur Kopplung wurden 54,8 mg Fmoc-Taurin-Chlorid (0,15 mmol; 0,15 mmol) in 3 mL Dichlormethan gelöst. Anschließend wurden 35  $\mu\text{L}$  N-Methylmorpholin (30 mg; 0,3 mmol; 6 Äq.) zugegeben, das Gemisch invertiert und zum Peptid am Harz (0,025 mmol) auf die Spritze aufgezogen. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Reaktionslösung entfernt und das Harz je drei Mal mit DMF, DCM und Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.<sup>[207]</sup>

### 5.2.1.11 Kopplung von Gallensäuren in Lösung

Es wurden 5 mg Peptid (HBVpreS/2-21-yK, 1,8  $\mu\text{mol}$ , 1 Äq.); 7 mg UDCA (17,8  $\mu\text{mol}$ ; 10 Äq.) und 6,3 mg HBTU (16,6  $\mu\text{mol}$ ; 9,3 Äq.) in 2 mL DMF gelöst und durch Zugabe von 7  $\mu\text{L}$  DIPEA (38,5  $\mu\text{mol}$ ; 21,4 Äq.) aktiviert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 5 h bei RT auf dem Schüttler zur Reaktion gebracht. Danach wurde die Lösung direkt mittel präparativer HPLC aufgereinigt.

### 5.2.1.12 Testabspaltung

Zur Kontrolle der Peptidsynthese an fester Phase wurde eine Spatelspitze des getrockneten Harzes mit 100  $\mu\text{L}$  Abspalllösung (2,5 % TIS/2,5 % Wasser/95 % TFA) 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Harz durch eine Filterspitze abfiltriert und das Peptid durch Zugabe von 1 mL Diethylether gefällt. Das gefällte Peptid wurde 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet getrocknet. Dieses wurde anschließend in 50 – 100  $\mu\text{L}$  Wasser/Acetonitril 1:1 gelöst und mittels RP-HPLC und LC-MS analysiert.

### 5.2.1.13 Abspaltung von Peptiden

Zur Abspaltung der Peptide von der festen Phase und Entfernung aller Schutzgruppen wurde das Harz zunächst im Vakuum getrocknet. Anschließend wurden 1,5 mL Abspalllösung, bestehend aus 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % Wasser, je 100 mg des beladenen Harzes angesetzt, auf die Spritze aufgezogen und für 2 h bei RT auf dem

Schüttler inkubiert. Danach wurde das Peptid mit kaltem Diethylether (40 mL) gefällt und bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann im Vakuum getrocknet.

Bei der Abspaltung aller Peptide mit Gallensäurederivaten wurde zur Vermeidung eines bei der Abspaltung entstehenden Nebenprodukts die Abspaltungszeit auf zwei Mal 20 min verkürzt.

### **5.2.1.14 Ausbildung einer Disulfidbrücke**

Das abgespaltene Peptid wurde in 3 mL Wasser/Acetonitril 1:1 gelöst. Anschließend wurde so lange Iodlösung (in Eisessig, 20 mg/mL) zugegeben, bis eine bleibende Gelbfärbung zu beobachten war. Das überschüssige Iod wurde dann durch Zugabe von gesättigter Ascorbinsäurelösung reduziert. Anschließend erfolgte direkt die Aufreinigung mittels präparativer HPLC.

### **5.2.1.15 Reinigung und Charakterisierung von Peptiden**

Zur Reinigung wurde das vom Harz abgespaltene Peptid in Wasser/Acetonitril 1:1 gelöst und mittels präparativer HPLC gereinigt. Als Lösungsmittel wurden Wasser (+ 0,1 % TFA) und Acetonitril (+ 0,1 % TFA) verwendet. Zur Trennung wurde ein produktspezifischer Gradient bei einer Flussrate von 20 mL/min über 15 min verwendet. Das gereinigte Peptid wurde abschließend durch Lyophilisation erhalten.

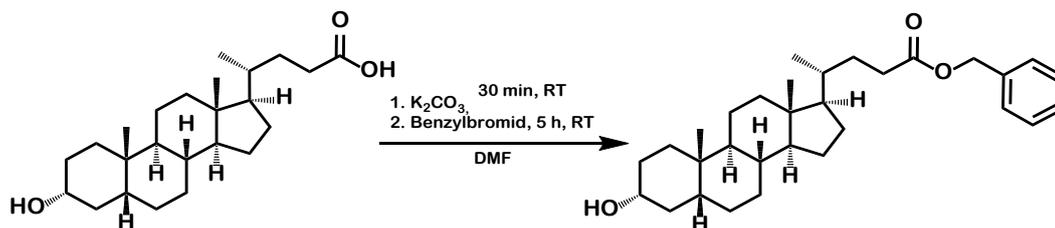
Zur Charakterisierung der hergestellten Peptide wurde eine analytische HPLC (RP-HPLC) und LC-MS verwendet.

Die HPLC-Analyse unter Standardbedingungen wurde mit einem Agilent 1100 System bei einer UV-Detektion von 214 nm durchgeführt. Die stationäre Phase war eine Chromolith® Performance RP-18e 100×3 mm. Als mobile Phase wurde über 5 min ein linearer Gradient von 0 bis 100 % Acetonitril (+ 0,1 % TFA) in Wasser (+ 0,1 % TFA) bei einer Flussrate von 2 mL/min verwendet.

Die LC-MS Analytik wurde an einem ESI-Orbitrap Massenspektrometer mit vorangeschaltetem Agilent 1200 HPLC-System durchgeführt. Die stationäre Phase war eine Hypersil Gold (200×2,1 mm) Säule. Als mobile Phase wurde über 20 min ein linearer Gradient von 0 bis 100 % Acetonitril (+ 0,05 % TFA) in Wasser (+ 0,05 % TFA) bei einer Flussrate von 200 µL/min verwendet. Bei der Analyse der Peptide, an denen verschiedene Gallensäurederivate gekoppelt waren, wurde die Detektion anschließend an den linearen Gradienten um weitere 5 min bei 100 % Acetonitril verlängert.

## 5.2.2 Synthese von Gallensäurederivaten zur Peptidmodifikation

### 5.2.2.1 Synthese von 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester



5,00 g LCA (13,3 mmol; 1 Äq.) wurden in 30 mL DMF gelöst. Anschließend wurden 2,00 g Kaliumcarbonat (14,5 mmol; 1,1 Äq.) zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Danach wurden 2,40 mL Benzylbromid (3,453 g; 20,2 mmol, 1,5 Äq.) zugegeben und 5 h bei RT gerührt. Zum Reaktionsgemisch wurde destilliertes Wasser gegeben und vier Mal mit Ethylacetat (je 50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das verbliebene gelbliche Öl wurde anschließend säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Laufmittel: EE/Hex 1:4) aufgereinigt. Es wurden 4,5 g (9,6 mmol; 72,5 %) weiße Kristalle erhalten<sup>[169]</sup>.

$$m/z_{\text{calc}} = 449,3414 [M+H-H_2O]^+$$

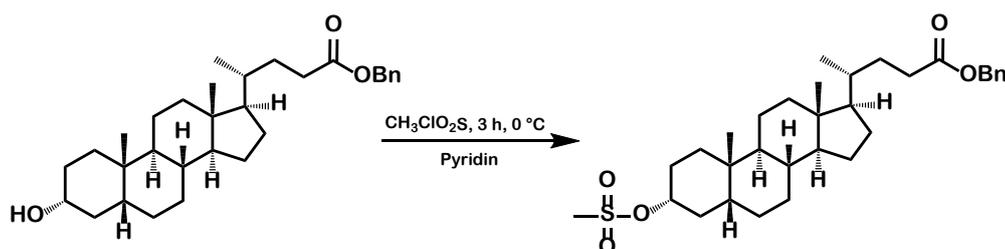
$$m/z_{\text{obs}} = 449,3279 [M+H-H_2O]^+$$

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.44 - 7.28 (m, 5H), 5.17 - 5.03 (t, 2H), 3.73 - 3.50 (m, 1H), 2.52 - 0.94 (m, 24H), 0.91 (s, 6H), 0.89 (s, 2H), 0.62 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 174.12, 136.13, 128.54, 128.23, 128.16, 71.88, 66.09, 56.49, 55.95, 42.73, 42.10, 40.43, 40.16, 36.47, 35.85, 35.35, 35.32, 34.58, 31.29, 30.98, 30.56, 28.18, 27.20, 26.42, 24.21, 23.38, 20.82, 18.26, 12.03 ppm.

Analog wurden 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester, 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester und 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester synthetisiert. Die erhaltenen LC-MS und NMR-Daten sind im Anhang (Kapitel 11.1 bis 11.6) aufgeführt.

### 5.2.2.2 Synthese von 3 $\alpha$ -Mesyloxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester



Zu 2,80 g 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester (5,9 mmol; 1 Äq.) in Pyridin (25 mL) wurden 2,3 mL Methansulfonylchlorid (3,40 g; 29,7 mmol; 5 Äq.) bei 0 °C zugegeben und weitere 3 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 50 mL destilliertes Wasser zugegeben und das Reaktionsgemisch zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert (je 80 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit destilliertem Wasser und Brine gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das verbliebene gelbe Öl (4,4 g) wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Laufmittel: EE/Hex 1:4). Es wurden 3,00 g (5,5 mmol; 92 %) weißer Feststoff erhalten<sup>[169]</sup>.

$$m/z_{\text{calc}} = 527,3189 [M+H-H_2O]^+$$

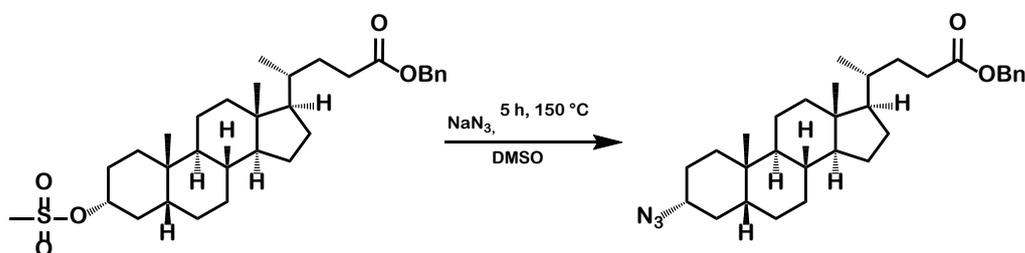
$$m/z_{\text{obs}} = 528,3693 [M+H-H_2O]^+$$

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.44 - 7.29 (m, 5H), 5.18 - 5.02 (t, 2H), 4.77 - 4.53 (m, 1H), 3.00 (s, 3H), 2.57 - 0.96 (m, 24H), 0.93 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.89 (s, 2H), 0.62 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 174.20, 136.26, 128.67, 128.36, 128.30, 83.10, 66.22, 56.55, 56.08, 42.85, 42.29, 40.55, 40.19, 38.99, 35.86, 35.43, 35.14, 34.52, 33.32, 31.41, 31.09, 28.28, 28.01, 27.01, 26.36, 24.29, 23.29, 20.95, 18.39, 12.16 ppm.

Analog wurde 3 $\alpha$ -(2-Hydroxyethoxy)-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester umgesetzt. Die LC-MS- und NMR-Daten des erhaltenen Produkts sind im Anhang (Kapitel 11.7) aufgeführt.

### 5.2.2.3 Synthese von 3 $\alpha$ -Azido-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester



1,65 g 3 $\alpha$ -Mesyloxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester (3,0 mmol; 1 Äq.) wurden in 50 mL DMSO gelöst und 1,97 g Natriumazid (30,3 mmol; 10 Äq.) unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 6 h bei 150 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser versetzt und drei Mal mit Ethylacetat (je 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Laufmittel: EE/Hex 1:10). Es wurden 1,1 g (2,2 mmol; 74,6 %) eines farblosen Öls erhalten, welches bei -20 °C auskristallisierte<sup>[171]</sup>.

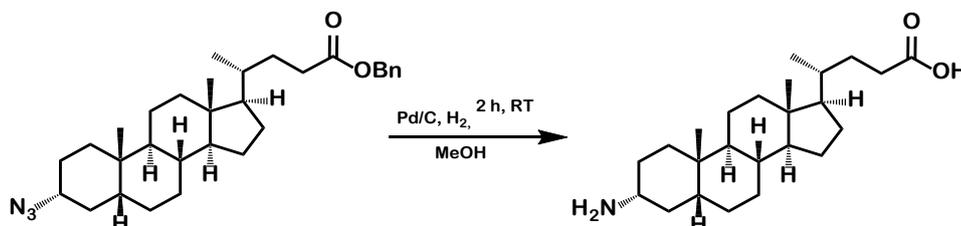
$$m/z_{\text{calc}} = 472,3312 [M+H-N_3]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 471,3120 [M+H-N_3]^+$$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.41 - 7.29$  (m, 5H), 5.24 - 5.02 (t, 2H), 3.95 (m, 1H), 2.49 - 0.98 (m, 24H), 0.95 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.89 (d, 2H), 0.62 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 174.23, 136.27, 128.68, 128.37, 128.31, 66.24, 58.95, 56.74, 56.16, 42.90, 40.33, 40.29, 37.48, 35.80, 35.46, 35.12, 31.43, 31.13, 30.83, 30.36, 28.32, 26.69, 26.44, 24.86, 24.32, 23.94, 21.15, 18.41, 12.19$  ppm.

#### 5.2.2.4 Synthese von 3 $\alpha$ -Amino-5 $\beta$ -cholan-24-säure (LCA-Amin)



200 mg 3 $\alpha$ -Azido-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester (0,4 mmol, 1 Äq.) und 40 mg Pd/C wurden in 10 mL Methanol gelöst. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 2 h bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre kräftig gerührt. Zur Aufarbeitung wurde Pd/C mittels Spritzenfilter abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

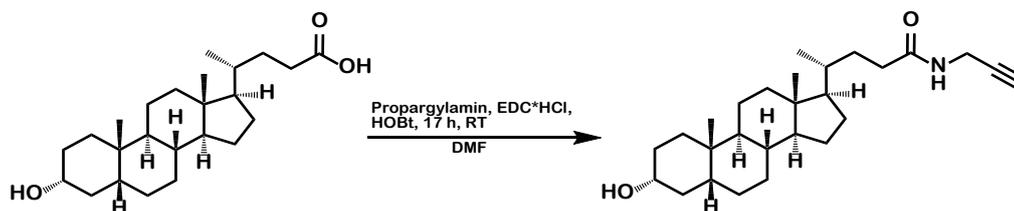
$$m/z_{\text{calc}} = 376,3210 [\text{M}+\text{H}]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 376,3 [\text{M}+\text{H}]^+$$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.39 - 1.00$  (m, 30H), 0.92 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.64 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 179.16, 56.77, 56.22, 43.89, 42.93, 42.11, 40.67, 37.75, 36.05, 35.53, 31.34, 31.14, 28.36, 27.68, 27.41, 27.20, 26.72, 24.43, 24.40, 21.50, 20.99, 18.44, 12.23$  ppm.

#### 5.2.2.5 Synthese von Propargyl-3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oat



500 mg LCA (1,3 mmol; 1 Äq.) wurden bei 0 °C in 5 mL DMF gelöst und unter Rühren wurden 89,5  $\mu\text{L}$  Propargylamin (76,9 mg; 1,4 mmol; 1,1 Äq.) zugegeben. 365,2 mg EDC\*HCl (1,95 mmol; 1,5 Äq.) und 86,1 mg HOBT (0,65 mmol; 0,5 Äq.) wurden ebenfalls in 5 mL DMF gelöst und zum Reaktionsgemisch zugefügt. Dieses wurde anschließend weitere 30 min bei 0 °C und danach weitere 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mL Eis gestoppt und die erhaltene Lösung drei Mal mit Ethylacetat (je 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit

destilliertem Wasser und Brine gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde das erhaltene Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Laufmittel: EE/Hex 2:1. Es wurden 250 mg (0,61 mmol; 46,9 %) eines weißen Feststoffes erhalten<sup>[208]</sup>.

$$m/z_{\text{calc}} = 414,3366 [M+H]^+$$

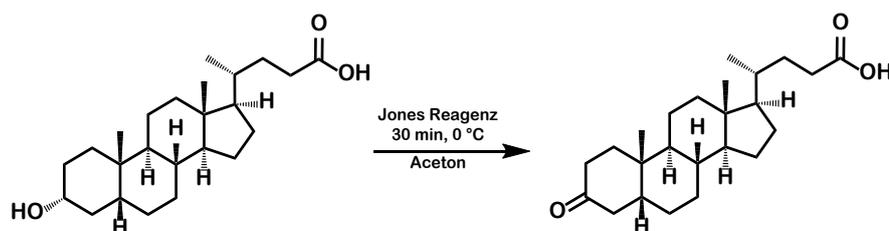
$$m/z_{\text{obs}} = 414,3206 [M+H]^+$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5.67 (s, OH), 4.05 - 4.04 (m, 2H), 3.65 - 3.59 (m, 1H), 2.28 - 0.96 (m, 30H), 0.92 - 0.90 (m, 6H), 0.63 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173.31, 79.82, 72.00, 71.68, 56.63, 56.10, 42.88, 42.22, 40.56, 36.58, 35.98, 35.58, 35.48, 34.71, 33.43, 31.70, 30.67, 29.32, 28.38, 27.32, 26.55, 24.34, 23.51, 20.96, 18.52, 12.19 ppm.

Analog hierzu wurde UDCA umgesetzt. Die LC-MS-Daten der erhaltenen Verbindung sind im Anhang (Kapitel 11.7) aufgeführt.

### 5.2.2.6 Synthese von 3-Oxo-5β-cholan-24-säure



500 mg LCA wurden in 75 mL Aceton gelöst und im Eisbad gerührt. Anschließend wurde über wenige Minuten 2 mL Jones Reagenz zugetropft und weitere 30 min im Eisbad gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeeengt, anschließend in 200 mL Diethylether aufgenommen, mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und erneut für 30 min gerührt. Die organische Phase wurde danach mit Brine gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt<sup>[170]</sup>.

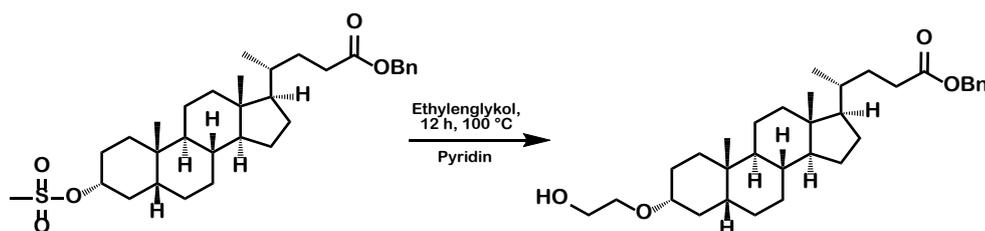
$$m/z_{\text{calc}} = 375,2894$$

$$m/z_{\text{obs}} = 375,2871$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.40 - 2.24 (m, 4H), 1.90 - 1.80 (m, 5H), 1.62 - 1.07 (m, 19H), 1.01 (s, 3H), 0.94 - 0.93 (d, 3H), 0.69 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 213.71, 179.68, 56.58, 56.10, 44.47, 42.97, 42.51, 40.89, 40.20, 37.36, 37.16, 35.68, 35.44, 35.08, 31.04, 30.89, 28.29, 26.76, 25.92, 24.30, 22.80, 21.35, 18.40, 12.23 ppm.

### 5.2.2.7 Synthese von 3 $\alpha$ -(2-Hydroxyethoxy)-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester



450 mg 3 $\alpha$ -mesyloxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester (0,83 mmol, 1 Äq.) wurden in einem Gemisch aus 5 mL Ethylenglykol und 1 mL Pyridin gelöst und für 18 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und auf ein Gemisch aus 15 mL destilliertem Wasser und 1 mL konzentrierter Schwefelsäure gegossen. Die Lösung wurde danach drei Mal mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, Laufmittel: EE/Hex 1:1) gereinigt. Es wurden 220 mg des Produkts erhalten (0,43 mmol, 51,8 %)<sup>[209]</sup>.

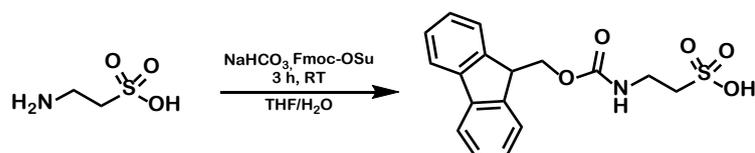
$$m/z_{\text{calc}} = 533,3601 [M+\text{Na}]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 533,3465 [M+\text{Na}]^+$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.36 - 7.32 (m, 5H), 5.11 - 5.10 (d, 2H), 3.72 - 3.71 (m, 2H), 3.50 - 3.47 (m, 2H), 2.40 - 1.01 (m, 29H), 0.93 (s, 3H), 0.91 - 0.89 (d, 3H), 0.62 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 174.27, 136.27, 128.67, 128.36, 128.30, 75.04, 66.72, 66.24, 66.26, 56.78, 56.17, 42.92, 40.40, 40.12, 37.17, 35.83, 35.47, 35.10, 31.44, 31.14, 30.89, 30.53, 28.33, 26.63, 26.43, 24.88, 24.34, 24.04, 21.26, 18.41, 12.20 ppm.

### 5.2.2.8 Synthese von Fmoc-Taurin



Es wurden 1,25 g (10 mmol; 1 Äq.) Taurin und 840 mg Natriumhydrogencarbonat (10 mmol; 1 Äq.) in 40 mL THF/Wasser (1:1) gelöst. Unter Rühren wurden 3,3 g (9,8 mmol; 0,98 Äq.) Fmoc-OSu portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2 eingestellt und THF am Rotationsverdampfer entfernt. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Ethylacetat gewaschen und anschließend lyophilisiert.<sup>[210]</sup>

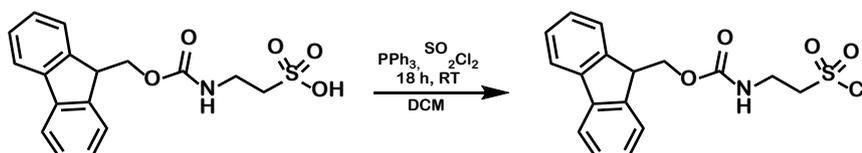
$$m/z_{\text{calc}} = 348,0900 [M+\text{H}]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 348,0892 [M+\text{H}]^+$$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 7.89 - 7.88$  (d, 2H),  $7.67 - 7.66$  (d, 2H),  $7.43 - 7.40$  (dd, 2H),  $7.35 - 7.33$  (dd, 2H),  $4.29 - 4.28$  (d, 2H),  $4.22 - 4.20$  (d, 1H),  $3.29 - 3.24$  (dt, 2H),  $2.59 - 2.57$  (t, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 155.79, 143.89, 140.70, 127.59, 127.06, 125.11, 120.10, 65.35, 50.71, 46.71, 37.28$  ppm.

### 5.2.2.9 Synthese von Fmoc-Taurin-Chlorid



Es wurden 1,7 g Triphenylphosphin (6,5 mmol; 2 Äq.) in 8 mL DCM bei 0 °C gelöst. Anschließend wurden 1,2 mL Sulfurylchlorid (19,2 mg; 14,3 mmol; 4,4 Äq.) langsam unter Rühren zugegeben und danach das Eisbad entfernt. 1,1 g Fmoc-Taurin (3,25 mmol; 1 Äq.) wurden in 30 mL DCM suspendiert und zum Reaktionsgemisch zugetropft, wodurch eine trübe Lösung entstand. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und 500 mL Diethylether/Hexan 1:1 zu der nun klaren Lösung zugegeben, um Triphenylphosphin zu fällen. Die Lösung wurde anschließend filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC mit einem Gradienten von 50 – 80 % Acetonitril über 15 min<sup>[211]</sup>.

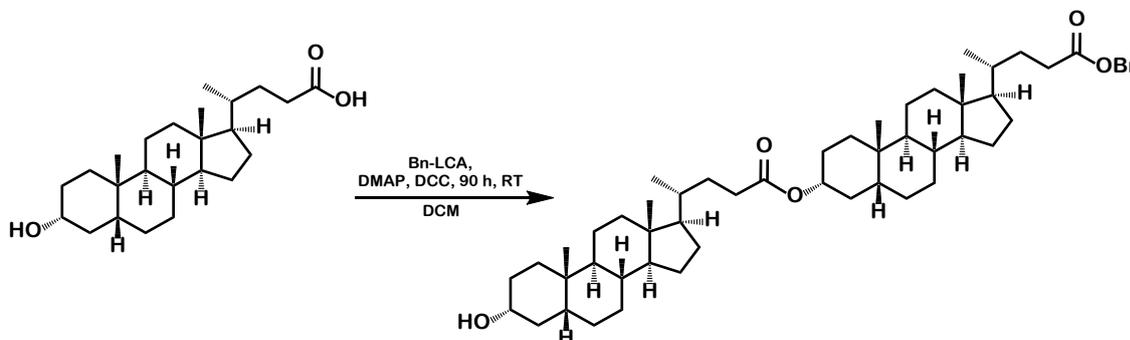
$$m/z_{\text{calc}} = 365,0483 \text{ [M+H]}^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 365,1165 \text{ [M+H]}^+$$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.69 - 7.62$  (d, 2H),  $7.55 - 7.51$  (d, 2H),  $7.37 - 7.33$  (dd, 2H),  $7.16 - 7.13$  (dd, 2H),  $4.44 - 4.41$  (d, 2H),  $4.20 - 4.18$  (d, 1H),  $3.60 - 3.55$  (m, 2H),  $23.18 - 3.14$  (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 156.08, 145.19, 139.04, 128.51, 127.55, 125.54, 121.20, 66.50, 64.76, 47.29, 35.52$  ppm.

### 5.2.2.10 Synthese von 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester



97 mg LCA (0,26 mmol; 1 Äq.) wurden in 3 mL DCM suspendiert. Anschließend wurden 3,18 mg DMAP ( $26 \times 10^{-3}$  mmol; 0,1 Äq.) und 130 mg 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester (0,26 mmol, 1 Äq.) zugegeben und die Suspension auf 0 °C gekühlt. Danach wurden 55,7 mg DCC (0,27 mmol; 1,1 Äq.), gelöst in 1 mL DCM, zugetropft und das Reaktionsgemisch 90 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit DCM nachgewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde erneut in DCM aufgenommen und zwei Mal mit 0,5 M HCl und zwei Mal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Anschließend wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, wodurch ein weißer Feststoff erhalten wurde<sup>[170]</sup>.

$$m/z_{\text{calc}} = 825,6391 [M+H]^+$$

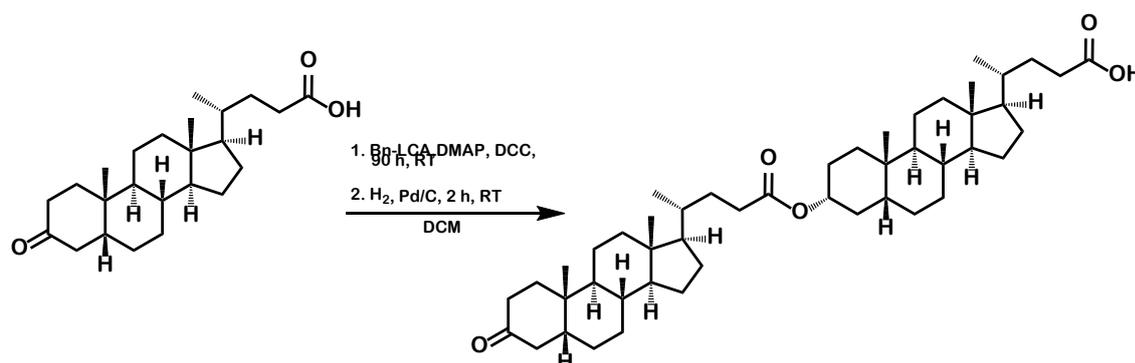
$$m/z_{\text{obs}} = 825,6023 [M+H]^+$$

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.37 - 7.31 (m, 5H), 5.11 - 5.10 (d, 2H), 4.76 - 4.68 (m, 1H), 3.66 - 3.58 (m, 1H), 2.40 - 1.04 (m, 56H), 0.92 - 0.91 (d, 9H), 0.90 (d, 3H), 0.64 (s, 3H), 0.62 (s, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 174.24, 173.96, 136.26, 128.68, 128.36, 128.31, 74.22, 74.02, 66.24, 56.65, 56.20, 56.16, 40.89, 42.24, 42.02, 40.57, 40.31, 36.60, 36.02, 35.92, 35.47, 35.46, 35.20, 34.73, 34.72, 32.44, 31.90, 31.48, 31.19, 31.13, 30.70, 28.33, 27.35, 27.17, 26.82, 26.58, 26.45, 24.39, 24.33, 23.52, 23.48, 20.98, 18.44, 18.41, 12.23, 12.19 ppm.

Es wurden analog 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(7 $\beta$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(7 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester, 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester, 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester, 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester und 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester synthetisiert. Die erhaltenen LC-MS- und NMR-Daten sind im Anhang (Kapitel 11.9 bis Kapitel 11.17) aufgeführt.

### 5.2.2.11 Synthese von 3-Oxo-5 $\beta$ -cholan-24-säure(cholan-24-säure)-3-ylester



315 mg 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester (0,84 mmol; 1 Äq.) wurden in 15 mL DCM gelöst. Danach wurden 11 mg DMAP (0,087 mmol; 0,11 Äq.) und 392 mg 3-Oxo-5 $\beta$ -cholan-24-säure (0,84 mmol; 1 Äq.) zugeben und das Reaktionsgemisch im Eisbad auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurden 180 mg DCC (0,87 mmol; 1,1 Äq.) in 3 mL DCM gelöst und ebenfalls zugegeben. Nach weiteren 30 min wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion bei RT für 40 h gerührt. Zum Reaktionsgemisch wurden 20 mL Hexan zugegeben und der feste Rückstand abfiltriert. Das Filtrat wurde eingengt und anschließend in DCM gelöst. Die organische Phase wurde mit 0,5 M HCl und gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, Laufmittel: EE/Hex 1:5). Die Entfernung der Benzyl-Schutzgruppe wurde abschließend, wie in Kapitel 5.2.2.16 beschrieben, durchgeführt<sup>[170]</sup>.

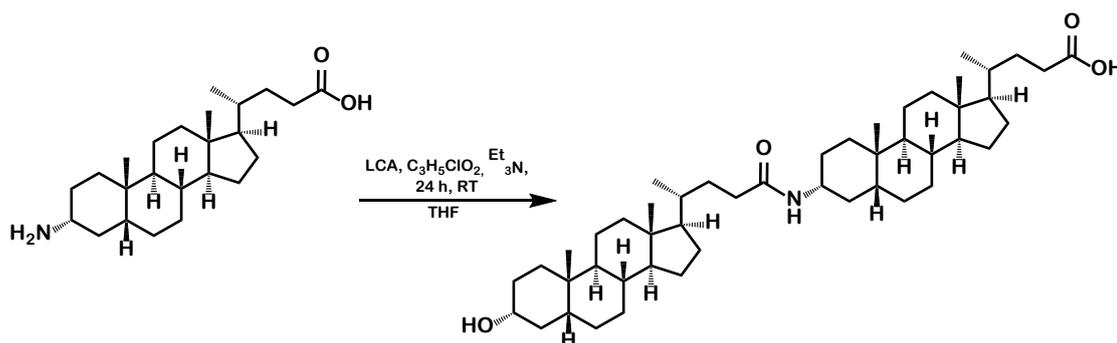
$$m/z_{\text{calc}} = 733,5765$$

$$m/z_{\text{obs}} = 732,8551$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 4.75 - 4.69 (m, 1H), 2.39 - 1.07 (m, 56H), 1.02 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.68 (s, 3H), 0.65 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 213.74, 174.03, 74.25, 56.68, 56.61, 56.18, 56.17, 44.48, 42.95, 42.92, 42.52, 42.03, 40.88, 40.59, 40.35, 40.20, 37.37, 37.17, 35.93, 35.71, 35.47, 35.46, 35.21, 35.05, 34.71, 32.49, 31.89, 31.18, 30.93, 29.68, 28.35, 28.31, 27.17, 26.83, 26.78, 26.46, 25.95, 24.35, 24.34, 23.49, 22.81, 21.35, 21.00, 18.46, 18.41, 12.26, 12.21 ppm.

### 5.2.2.12 Synthese von 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(cholan-24-säure)-3-ylamid



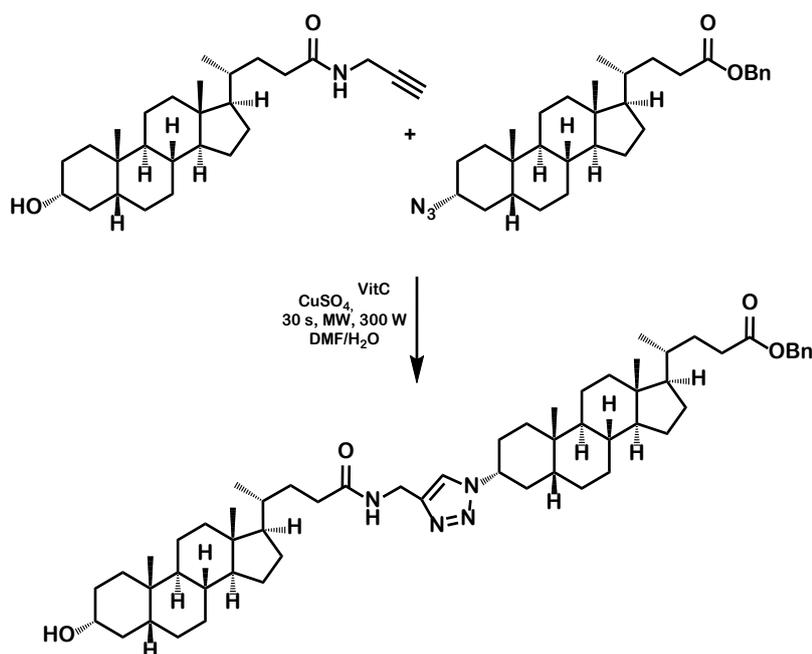
Es wurden 100 mg LCA (0,27 mmol; 1 Äq.) in 3 mL THF und 1,2 mL Triethylamin gelöst und auf 0 °C im Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurden 27,9  $\mu$ L Chlorameisensäureethylester (31,8 mg; 0,27 mmol; 1 Äq.) zugetropft und 30 min gerührt. Anschließend wurden 100 mg 3 $\alpha$ -amino-5 $\beta$ -cholan-24-säure (0,27 mmol; 1 Äq.) hinzugefügt und 24 h bei RT gerührt. Zur Aufreinigung wurden 10 mL Natriumhydrogenphosphat-Lösung (10 %) zugegeben und die wässrige Phase drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel anschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, Laufmittel: EE/Hex 1:4)<sup>[165]</sup>.

$$m/z_{\text{calc}} = 823,6551 [M+H]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 823,5988 [M+H]^+$$

Analog hierzu wurde 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(cholan-24-säure)-3-ylamid hergestellt. Die erhaltenen LC-MS- und NMR-Daten sind im Anhang (Kapitel 11.18) aufgeführt.

### 5.2.2.13 Synthese von 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(cholan-24-säurebenzylester)-3-yl-1h-1,2,3-triazol



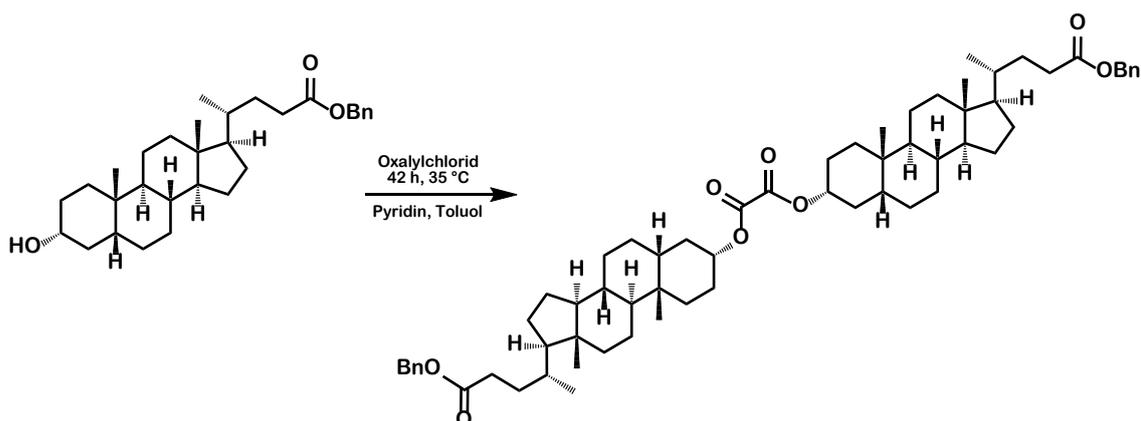
Es wurden 50 mg Propargyl-3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oat (0,12 mmol; 1 Äq.) und 71 mg 3 $\alpha$ -Azido-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester (0,16 mmol; 1,3 Äq.) in 3 mL DMF gelöst. Anschließend wurden 1,5 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (6×10<sup>-3</sup> mmol, 0,05 Äq.) und 9,5 mg Ascorbinsäure (0,05 mmol; 0,4 Äq.) in 400 mL destilliertem Wasser zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann zwei Mal 10 s in einer Haushaltsmikrowelle bei 240 W erhitzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur gekühlt, destilliertes Wasser zugegeben und drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann mit Wasser und Brine gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene klare Öl wurde ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt<sup>[181-182]</sup>.

$$m/z_{\text{calc}} = 1115,6630 [M+H+2TFA-H_2O]^+ \quad m/z_{\text{obs}} = 1115,7682 [M+H+2TFA-H_2O]^+$$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.61 (s, 1H), 7.36 - 7.34 (m, 5H), 5.11 - 5.10 (t, 2H), 4.65 (s, OH), 4.52 - 4.50 (m, 1H), 3.65 - 3.59 (m, 2H), 2.42 - 0.99 (m, 56H), 0.95 (s, 3H), 0.91 - 0.89 (d, 9H), 0.63 - 0.62 (d, 6H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 174.23, 173.74, 144.13, 136.27, 128.68, 128.36, 128.31, 121.55, 70.01, 66.24, 58.95, 57.09, 56.74, 56.62, 56.16, 42.90, 42.88, 42.25, 40.65, 40.57, 40.33, 40.29, 37.48, 36.62, 36.00, 35.80, 35.64, 35.46, 35.12, 34.97, 34.72, 33.62, 31.80, 31.44, 31.13, 30.83, 30.71, 30.36, 28.39, 28.31, 27.35, 26.99, 26.56, 26.43, 26.28, 25.03, 24.86, 24.31, 23.94, 23.52, 21.15, 20.97, 18.53, 18.42, 12.19 ppm.

Analog hierzu wurde 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(cholan-24-säurebenzylester)-3-yl-1H-1,2,3-triazol hergestellt. Die erhaltenen LC-MS- und NMR-Daten sind im Anhang (Kapitel 11.16) aufgeführt.

5.2.2.14 Synthese von Bis(5 $\beta$ -Cholan-24-säurebenzylester)-3 $\alpha$ -yloxalat

300 mg 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester (0,64 mmol; 2 Äq.) wurden in 0,63 mL Toluol und 0,35 mL Pyridin unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Währenddessen wurden 44,9 mg Oxalylchlorid (0,35 mmol; 1,1 Äq.) in 1 mL Toluol gelöst und langsam zum Reaktionsgemisch zugetropft. Anschließend wurde für 42 h bei 35 °C gerührt. Durch Zugabe von destilliertem Wasser wurde die Reaktion beendet und anschließend drei Mal mit EE extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde danach säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Laufmittel: EE/Hex 3:7) aufgereinigt<sup>[170]</sup>.

$$m/z_{\text{calc}} = 987,6708 [M+H]^+$$

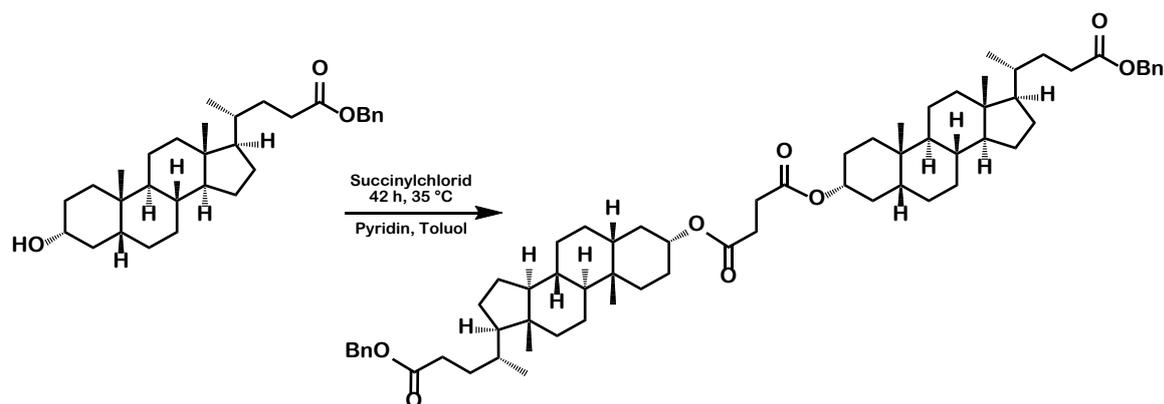
$$m/z_{\text{obs}} = 987,6408 [M+H]^+$$

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.37 - 7.33 (m, 10H), 5.11 - 5.10 (d, 4H), 4.93 - 4.86 (m, 2H), 2.48 - 1.04 (m, 56H), 0.94 (s, 6H), 0.91 - 0.89 (d, 6H), 0.62 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 174.22, 157.95, 136.27, 128.67, 128.37, 128.30, 77.93, 66.22, 56.59, 56.14, 42.87, 42.08, 40.48, 40.25, 39.92, 35.47, 35.08, 34.37, 31.95, 31.45, 31.11, 28.31, 27.13, 26.43, 26.37, 24.33, 23.36, 20.96, 18.39, 12.16 ppm.

Analog hierzu wurden Bis(7 $\beta$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester)-3 $\alpha$ -yloxalat und Bis(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3 $\alpha$ -yloxalat aus UDCA und CA synthetisiert. Die erhaltenen LC-MS-Daten sind im Anhang (Kapitel 11.19 und 11.20) gelistet.

### 5.2.2.15 Synthese von Bis(5 $\beta$ -Cholan-24-säurebenzylester)-3 $\alpha$ -ylsuccinat



Die Synthese wurde, wie in Kapitel 5.2.2.14 beschrieben, durchgeführt. Anstelle von Oxalylchlorid wurde in diesem Fall Succinylchlorid eingesetzt. Für die säulenchromatographische Aufreinigung ( $\text{SiO}_2$ ) wurde als Laufmittel: EE/Hex 1:1 verwendet.

Die Analytik wurde in diesem Fall erst nach der in Kapitel 5.2.2.16 beschriebenen Entfernung der Benzyl-Schutzgruppe durchgeführt.

$$m/z_{\text{calc}} = 835,6082 \text{ [M+H]}^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 835,5837 \text{ [M+H]}^+$$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4.78 - 4.72$  (m, 4H), 2.68 - 0.99 (m, 69H), 0.93 - 0.92 (t, 3H), 0.65 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 179.84, 171.72, 74.61, 56.49, 55.98, 42.75, 41.87, 40.44, 40.13, 35.77, 35.30, 35.02, 34.57, 32.23, 30.94, 30.79, 29.75, 28.13, 27.02, 26.66, 26.33, 24.20, 23.33, 20.86, 18.28, 12.04$  ppm.

Analog hierzu wurde ebenfalls Bis(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -Cholan-24-säurebenzylester)-3 $\alpha$ -ylsuccinat synthetisiert. Die erhaltenen LC-MS- und NMR-Daten sind im Anhang (Kapitel 11.21) aufgeführt.

### 5.2.2.16 Entfernung der Benzyl-Schutzgruppe

Die Benzyl-Schutzgruppe wurde nach erfolgreicher Synthese der Dimere katalytisch mittels Hydrogenolyse entfernt.

Hierzu wurden die synthetisierten Dimere (jeweils 100 – 200 mg) in 5 mL THF in einem Schlenkcolben gelöst und 30 mg Pd/C (10 % w/w) zugegeben. Anschließend wurde der Kolben mehrfach evakuiert und mit Wasserstoff geflutet. In der Wasserstoffatmosphäre wurde die Lösung 2 h kräftig gerührt. Zur weiteren Aufarbeitung wurde die Lösung über einen Spritzenfilter gegeben, mit THF nachgewaschen und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde

anschließend mittels Säulenchromatographie ( $\text{SiO}_2$ ) mit einem produktspezifischen Laufmittelgemisch gereinigt.

### 5.2.3 Analytik der Gallensäurederivate

#### 5.2.3.1 Dünnschichtchromatographie der Gallensäurederivate

Zur Analyse mittels Dünnschichtchromatographie wurde jeweils ein produktspezifisches Laufmittel bestehend aus Ethylacetat/Hexan verwendet. UV-aktive Substanzen wurden unter einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm ausgewertet. Wenn dies nicht möglich war, wurde eine Färbelösung spezifisch für Gallensäuren und Steroide bestehend aus 20 g *p*-Toluolsulfonsäure in Ethanol verwendet. Nach dem Eintauchen der DC-Platte in die Lösung und durch anschließendes Erhitzen wurde der Spot sichtbar gemacht und es konnte eine Fluoreszenz bei Anregung mit einer Wellenlänge von 366 nm beobachtet werden<sup>[212]</sup>.

#### 5.2.3.2 HPLC-Analytik der Gallensäurederivate

Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften der Gallensäuren und der synthetisierten Derivate konnte die Analytik nicht unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 5.2.1.15) durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde das Gradientenprogramm angepasst. Es wurde zunächst über 2 min ein linearer Gradient von 50 bis 100 % Acetonitril (+ 0,1 % TFA) in Wasser (+ 0,1 % TFA) gefahren. Anschließend wurden weitere 3 min mit 100 % Acetonitril (+ 0,1 % TFA) eluiert. Die UV-Detektion erfolgte bei 214 nm.

#### 5.2.3.3 LC/MS-Analytik der Gallensäurederivate

Auch hier konnten aufgrund der physikochemischen Eigenschaften der Gallensäuren nicht die Standardbedingungen (siehe Kapitel 5.2.1.15) verwendet werden. Das System wurde manuell gesteuert und der Fluss der HPLC-Anlage auf 0,2 mL/min bei 1:1 Wasser/Acetonitril (+ 0,05 % TFA) eingestellt. Die Probe wurde über einen Injektor direkt injiziert und vermessen.

Bei der Auswertung der für Gallensäuren erhaltenen MS-Daten, war zu beachten, dass verschiedene charakteristische Fragmente auftreten können. Diese sind, wie auch bei anderen Messungen, standardmäßig die Ausbildung von  $[\text{M}+\text{H}]^+$ - und  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Addukten. Ebenso tritt häufig die Abspaltung von einem oder mehreren Wassermolekülen, je nach Anzahl der Hydroxy-Gruppen,  $[\text{M}+\text{H}-n \text{H}_2\text{O}]^+$  auf<sup>[164, 213]</sup>.

## 5.3 Physikochemische Charakterisierung

### 5.3.1 Bestimmung LogD-Wert

Zur Bestimmung des LogD-Wertes wurden die Substanzen in einer Konzentration 0,5 mg/mL in Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst. Zur Bestimmung der Fläche unter der Kurve (AUC) der Startkonzentration wurden 40 µL der Lösung entnommen und mittels HPLC bei 214 nm vermessen (siehe 5.2.1.15). Anschließend wurden in einem 1,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen 500 µL Wasser-gesättigtes Octanol mit 250 µL Octanol-gesättigtes Wasser und 250 µL der jeweiligen Substanz-Lösung vermischt. Diese wurden dann für 45 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Proben vorsichtig zentrifugiert und 30 min zur Phasentrennung stehen gelassen. Als nächster Schritt wurde die Octanolphase möglichst vollständig entfernt. Mit einer 1 mL-Spritze mit aufgesetzter Kanüle wurden nun ungefähr 300 µL der Pufferphase entnommen und in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Dieses Mikrozentrifugenröhrchen wurde nun erneut für 5 s zentrifugiert und danach 200 µL mit einer Pipette aus der Mitte entnommen und in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Hiervon wurden nun 50 µL in ein HPLC-Vial überführt und mittels HPLC bei 214 nm vermessen<sup>[187]</sup>.

### 5.3.2 Bestimmung des isoelektrischen Punkts

Die Bestimmung des isoelektrischen Punkts wurde mittels isoelektrischer Fokussierung durchgeführt. Hierzu wurden spezielle Gele mit einem pH-Gradienten von pH 3 bis pH 9 in einer PhastSystem Separationseinheit verwendet. Zur Platzierung des Gels wurden 100 µL Wasser vorgelegt, das Gel platziert und anschließend die Elektroden direkt auf dem Gel positioniert. Alle Substanzen wurden in einer Konzentration von 0,5 mg/mL in Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst und jeweils 4 µL auf den Applikator gegeben. Zusätzlich wurden 4 µL Marker, nach Angaben des Herstellers 1:5 verdünnt, auf den Applikator aufgetragen.

Die isoelektrische Fokussierung wurde nun nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Setup auf 15 °C gekühlt. Nach dem Erreichen der elektrischen Parameter von 200 V; 2,5 mA; 3,5 W und 75 Vh wurde der Applikator automatisch auf der Kathodenseite in das Gel gedrückt und die Proben aufgetragen. Die Messung wurde nach ungefähr 1,5 h beendet, nachdem 500 Vh erreicht waren. Anschließend wurde das Gel über Nacht in Coomassie-Lösung „Blue Silver“, nach dem Protokoll von Kang *et al.*, gefärbt<sup>[214]</sup>. Die Zusammensetzung der Färbelösung ist in Tabelle 5.6 aufgeführt. Nach erfolgreicher Färbung wurde das Gel mit Wasser gewaschen und eingescannt.

**Tabelle 5.6: Zusammensetzung der Färbelösung "Blue Silver" nach Kang et al..**

Substanz	Menge
Coomassie Brilliantblau G250	0,02 %
Aluminiumsulfat-Hydrat	5 %
Ethanol (96 %)	10 %
Ortho-Phosphorsäure (100 %)	2 %
mit Wasser auf 1L auffüllen	

Anhand der Retentionszeiten des Markers wurde eine Kalibriergerade erstellt und mithilfe der Geradengleichung konnten die isoelektrischen Punkte bestimmt werden.

## 5.4 *In vitro* Charakterisierung

### 5.4.1 HDV-Infektionsinhibitionsassay

Der HDV-Infektions-Inhibitionsassay wurde von Franziska Schlund (AG Urban) durchgeführt. Als Zelllinie wurde Huh7-hNTCP- Zellen verwendet. Diese sind mit humanem NTCP stabil transfiziert.

Ein Tag vor Beginn des eigentlichen Assays wurden die Zellen ausgesät, wobei jeweils 100 µL einer Suspension mit  $2,5 \times 10^5$  Zellen/mL in DMEM-Wachstumsmedium (10 % FKS, 1 % P/S, 1 % l-Glu, 2,5 µg/mL Puromycin) je Well verwendet wurden. An Tag 0 wurden, für die Vorbehandlung, der Zellen eine serielle Verdünnungsreihe (1:3) in einer separaten 96-Well-Platte (Verdünnungsplatte) in DMEM-Infektionsmedium (10 % FKS, 1 % P/S, 1 % l-Glu, 2 % DMSO) vorbereitet. Hierbei betrug die Peptidstartkonzentration 300 nM (Reihe 2). Von der Platte mit Zellen wurde nun der Überstand entfernt und die Verdünnungsplatte auf diese transferiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurde die Infektionslösung vorbereitet und in einer weiteren 96-Well-Platte erneut eine serielle Verdünnungsreihe vorbereitet, bei der dem DMEM-Infektionsmedium zusätzlich Virus zugesetzt wurde (Reihe 2 bis 12). In Reihe 1 wurde DMEM-Medium ohne Virus und Peptid zugegeben. Anschließend wurde das Vorbehandlungsmedium entfernt und das Virus-DMEM-Infektionsmedium mit Peptid auf die Platte mit Zellen übertragen und inkubiert. An Tag 1 nach der Infektion wurde erneut eine serielle Verdünnungsreihe in DMEM-Infektionsmedium (ohne Virus) erstellt. Das Virus-DMEM-Infektionsmedium mit Peptid wurde anschließend von der Platte mit Zellen entfernt, die Platte drei Mal mit PBS gewaschen, das vorbereitete DMEM-Infektionsmedium mit Peptid zugegeben und die Platte erneut inkubiert. Dieser Vorgang wurde an Tag 3 nach der Infektion erneut wiederholt. An Tag 5 nach der Infektion wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und zur Analyse ein *in-cell*-ELISA nach dem Protokoll von Lempp et al. durchgeführt<sup>[215]</sup>.

#### **5.4.1.1 *In-Cell*-ELISA**

Der *In-Cell*-ELISA wurde von Franziska Schlund (AG Urban) zur Auswertung des HDV-Infektionsinhibitionsassays durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µL Permealisierungspuffer (PBS mit 0,25 % Triton X-100) zugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 100 µL Blockingpuffer (PBS mit 0,05 % Tween 20 und 1 % Casein) für 30 min bei RT wurden die Zellen geblockt. Danach wurden 100 µL Primärantikörper (Anti-Rabbit-HDAg, 1:3000) in Blockingpuffer zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Im Folgenden Schritt wurde drei Mal 1 min mit 200 µL Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween 20) gewaschen. Danach wurden 100 µL 3 %ige Wasserstoffperoxidlösung in PBS zugegeben und 10 min bei RT inkubiert und erneut vier Mal 1 min mit 200 µL Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µL Sekundärantikörper (Goat-Anti-Rabbit, 1:5000) in Blockingpuffer für 1 h unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen drei Mal 1 min und zwei Mal 10 min mit 200 µL Waschpuffer gewaschen. Als abschließenden Waschschrift wurde einmal 10 min mit Permealisierungspuffer gewaschen. Danach wurden 50 µL Lumineszenz-Substrat zugegeben und die Platten im Mikrotiterplattenleser vermessen.

#### **5.4.2 Janus Green Assay**

Der Janus-Green-Assay wurde von Franziska Schlund (AG Urban) durchgeführt. Dies ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Zellzahl und Zelldichte<sup>[192]</sup>.

Nach Durchführung des HDV-Infektionsinhibitionsassays (siehe Kapitel 5.4.1) wurde das Medium entfernt und die Zellen für 30 min in Ethanol (50 %) fixiert. Anschließend wurden diese mit einer Janus Green B-Lösung (0,2 %) in PBS (pH 7,1 - 7,2) für 3 min bei RT angefärbt. Nach Entfernung der Färbelösung wurde die 96-Well-Platte zwei Mal 30 s in Wasser gewaschen und anschließend vollständig entfernt. Durch Zugabe von 150 µL 0,5 N HCl wurde der Farbstoff von der Zellwand eluiert und die Extinktion bei 620 nm direkt in der gleichen 96-Well-Platte gemessen. Als Vergleichswert wurden die Zellen in vier Wells vollständig lysiert und die nicht behandelten Zellen dienen als Positivkontrolle (100 % Zellviabilität).

#### **5.4.3 CYP P450-Stabilität**

Für die Durchführung des Assays wurden die zu testenden Substanzen in einer Konzentration von 7,5 µmol/mL in Wasser/MeCN (1:1) gelöst.

Es wurden 183 µL 100 mM Phosphat-Lösung pH 7,4 mit 2 µL Stocklösung der jeweiligen Substanz und 5 µL S9-Mikrosomen (20 mg/mL) vermischt und 5 min bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Anschließend wurden 10 µL 20 mM NADPH-Lösung zugegeben und bei

37 °C und 600 rpm inkubiert. Nach 10 min und 60 min wurden jeweils 50 µL Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 50 µL MeCN gestoppt. Die Lösung wurde dann 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in einem neuen Mikrozentrifugenröhrchen lyophilisiert. Zur Analyse der Probe wurde diese in 25 µL H<sub>2</sub>O/MeCN (1:1) gelöst und mittels HPLC und HPLC-MS (siehe Kapitel 5.2.1.15) analysiert.

#### 5.4.4 Hämolyse

Zur Untersuchung der hämolytischen Aktivität wurde Blut von drei freiwilligen Spendern verwendet. Dieses wurde in Li-Heparin-Gel S-Monovetten<sup>®</sup> entnommen und im ersten Schritt, nach Spender getrennt, aufgereinigt. Es wurden jeweils ungefähr 7 mL Blut in ein 15 mL-Falcon gegeben und 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, mit PBS auf 7 mL aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dies wurde so lange wiederholt, bis der Überstand nach Zentrifugation annähernd farblos war. Anschließend wurden alle Blutproben eines Spenders vereint und mit PBS auf 35 mL aufgefüllt.

Die zu testenden Substanzen wurden als 500 µM-DMSO Stocks angesetzt und mit PBS auf eine Konzentration von 250 µM (1:1) verdünnt. Der Assay wurde in einer 96-Well-Platte mit V-Boden durchgeführt. In Well 1 wurde die Substanz mit einer Startkonzentration von 25 µM hinzugegeben. Anschließend wurde bis Well 10 seriell 1:1 mit PBS verdünnt, sodass das Endvolumen je Well 50 µL betrug. In Well 11 wurde ausschließlich PBS (50 µL) als Blank vorgelegt und in Well 12 als Referenzwert für vollständige Lyse 10 % Triton-X-100 in PBS (50 µL). Zusätzlich zu den mit Substanz befüllten Wells wurde ebenfalls eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Zu allen Wells wurde danach 50 µL des aufgereinigten Bluts zugeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden weitere 75 µL PBS zugegeben und die Platte 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. 50 µL des Überstandes wurden nun in eine neue Platte mit F-Boden überführt und die Absorption bei 554 nm im Tecan Infinite M200 gemessen. Die Messung wurde in Triplikaten je Spender durchgeführt.

Als Positivkontrolle wurde auf einer weiteren Platte eine Verdünnungsreihe mit NaCl und Wasser angefertigt, da bekannt ist, dass Blutzellen bei zu geringer Salzkonzentration zerstört werden. Der Startwert in Well 1 betrug 0,81 % NaCl.

#### 5.4.5 Serumstabilität

Zur Untersuchung der Serumstabilität wurde zunächst das Peptid mit <sup>125</sup>Iod, wie in Kapitel 5.5.1 beschrieben, markiert.

Anschließend wurden zu 250 µL Serum die Menge hinzugegeben, die 1 MBq entsprachen und auf dem Schüttler bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Nach 0 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und

24 h wurden jeweils 30  $\mu\text{L}$  der Probe entnommen und durch Zugabe von 30  $\mu\text{L}$  Acetonitril wurden die Serumproteine ausgefällt. Durch die darauffolgende Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min wurden diese abgetrennt. Der erhaltene Überstand wurde anschließend in ein HPLC-Vial überführt und durch Injektion von 10  $\mu\text{L}$  mittels Radio-HPLC (siehe Kapitel 5.2.1.15) analysiert.

## 5.5 *In vivo* Charakterisierung

### 5.5.1 Radioaktive Iodmarkierung

Die Radiomarkierung wurde unter Anleitung von Dr. Philipp Uhl durchgeführt. Es wurde nach der Chloramin-T-Methode<sup>[216]</sup> verfahren, wodurch eine Markierung an der Tyrosinseitenkette erreicht werden konnte.

Es wurden 30  $\mu\text{L}$  Peptidstock (500  $\mu\text{M}$ ) mit 70  $\mu\text{L}$  0,25 M Phosphatpuffer (pH 7,4) vermischt. Anschließend wurde die benötigte Menge einer  $^{125}\text{I}$ -Lösung und 10  $\mu\text{L}$  Chloramin-T-Lösung (10 mg/mL) zugegeben. Nach 1 min vortexen bei RT wurde die Reaktion, durch Zugabe von 30  $\mu\text{L}$  gesättigter Methionin-Lösung, abgestoppt. Die darauffolgende Aufreinigung erfolgte mittels präparativer Radio-HPLC mit einem Gradienten von 0 bis 100 % Acetonitril (+ 0,1 % TFA) in Wasser (+ 0,1 % TFA) bei einer Flussrate von 2 mL/min. Als stationäre Phase diente eine Chromolith® Performance RP-18e (100 $\times$ 3 mm) HPLC-Säule. Nach der Aufreinigung wurden zur gesammelten Fraktion 30  $\mu\text{L}$  DMSO hinzugefügt und diese anschließend am Rotationsverdampfer eingengt. Danach wurde diese mit 0,9 %-NaCl-Lösung in eine 1 mL Spritze aufgezogen. Die Markierungsausbeute und Reinheit wurde anschließend mittels HPLC bestimmt. Hier war neben dem UV-Detektor ein zusätzlicher  $\gamma$ -Detektor angeschlossen. Die Durchführung der Analytik entsprach abgesehen davon den in Kapitel 5.2.1.15 beschriebenen Bedingungen.

Für die Radiomarkierung der Gallensäure-Derivate wurde, aufgrund der geringen Löslichkeit bei pH 7,4 und der großen Ausbeuteverluste bei Aufreinigung mittels präparativer Radio-HPLC, ein abgeändertes Markierungsprotokoll verwendet.

Es wurde eine Lösung des Gallensäure-Peptid-Konjugats (1 mg/mL) in 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,5 angesetzt. Hiervon wurden 20  $\mu\text{L}$  in ein 0,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die benötigte Menge einer  $^{125}\text{I}$ -Lösung und 5  $\mu\text{L}$  Chloramin-T-Lösung (10 mg/mL) zugegeben. Nach 2 min vortexen bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 30  $\mu\text{L}$  gesättigter Methionin-Lösung abgestoppt. Zur Neutralisation wurden 20  $\mu\text{L}$  Phosphatpuffer pH-7,4 zugeben. Die Markierungslösung wurde bei ausreichender Reinheit und Markierungsausbeute ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt und in eine 1 mL Spritze aufgezogen und mit 0,9 %-NaCl-Lösung auf das gewünschte Volumen verdünnt.

## 5.5.2 Szintigraphische Aufnahmen

Die Mäuse wurden mittels Isofluran-Inhalation narkotisiert und 100 µL der zuvor mit Iod markierten Substanzen in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung in die Schwanzvene injiziert. Die szintigraphischen Aufnahmen mit einer  $\gamma$ -Kamera wurden kumulativ über 10 Minuten aufgenommen und nach 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet.

Zusätzlich wurde für MyrB-y, HBVpreS/2-21-yK-LCA und HBVpreS/2-21-yK-DCA verschiedene Applikationsformen untersucht. Hierzu wurden die iodmarkierten Substanzen zusätzlich subkutan und oral appliziert. Die szintigraphischen Aufnahmen wurden, ebenfalls mit einer  $\gamma$ -Kamera kumulativ über 10 Minuten, aufgenommen und nach 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6h und 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet.

## 5.5.3 Bioverteilungsstudien

Zur genaueren Analyse der Substanzen wurde für MyrB-y und HBVpreS/2-21-yK-LCA ebenfalls eine Organverteilung durchgeführt. Hierzu wurden die Substanzen mit <sup>125</sup>Iod radiomarkiert (siehe Kapitel 5.5.1) und ungefähr 0,5 bis 1 MBq pro Maus appliziert. Je Gruppe wurden drei Tiere (weibliche SWISS Mäuse) verwendet. Diese wurden zuvor gewogen und mit Isofluran narkotisiert. Zu einem festgelegten Zeitpunkt wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet und Teile der verschiedenen Organe entnommen und gewogen. Betrachtet wurden Blut, Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Magen, Dünndarm, Muskel und Schwanz. Die Analyse erfolgte anschließend mittels  $\gamma$ -Counter. Hierzu wurden zusätzlich drei Mal 1 µL der radiomarkierten Substanz vermessen, die als Standards für die Berechnung der injizierten Dosis pro Gramm Organ [%ID/g] verwendet werden.

## 5.5.4 *In vivo* Stabilität in der Leber

Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK-LCA und HBVpreS/2-21-yK-DCA wurden mit <sup>125</sup>Iod radiomarkiert (siehe Kapitel 5.5.1) und anschließend weiblichen SWISS Mäusen subkutan appliziert. Nach 4 h wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet und deren Leber entnommen. Pro Gramm Leber wurde 1 mL gekühltes Wasser hinzugegeben und das Gemisch mittels Ultra-Turrax auf Eis zerkleinert. Anschließend wurde die gleiche Menge Acetonitril zugegeben, gevortext und 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nun in ein 1,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Abtrennung aller festen Bestandteile wurde dieser Schritt wiederholt. Der klare Überstand wurde dann in ein HPLC-Vial überführt und mittels HPLC mit linearem Gradienten von 0 bis 100 % Acetonitril (+ 0,1 % TFA) in Wasser (+ 0,1 % TFA) bei einer Flussrate von

2 mL/min über 10 min aufgetrennt und fraktioniert gesammelt. Abschließend wurden die erhaltenen Fraktionen im  $\gamma$ -Counter vermessen.

## 6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen Bedanken, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuerst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Walter Mier, der mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit in diesem interessanten Themengebiet zu erstellen. Ich danke dir für die vielen ausführlichen Gespräche, die verschiedenen Möglichkeiten mich weiterzuentwickeln und für dein Vertrauen in mich und meine Arbeit.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Stephan Urban für die tolle Kooperation, die diese Arbeit in diesem Zusammenhang erst ermöglichte. Das enorme Wissen und die Freude an der wissenschaftlichen Arbeit haben mich begeistert und sehr motiviert. Hierbei möchte ich mich ebenso bei Franziska Schlund für die Durchführung der HDV-Infektionsinhibitionsassays in der Zellkultur herzlich bedanken. Zudem Danke ich in Eva Gnouamazi und Zhenfeng Zhang für die Zusammenarbeit und die Einblicke in ihre Projekte. Ein weiterer Dank gilt hier Talisa Richardt für ihre noch immer andauernde Zusammenarbeit im Rahmen verschiedener Bindungsversuche mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Als nächstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Gert Fricker für die Annahme der Position als Zweitgutachter bedanken und zusätzlich für die fachlichen Informationen zu den Gallensäuren.

Bei Tobias Timmermann (IPMB) möchte ich mich ebenfalls für die vielen aufgenommenen NMR-Spektren bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein weiterer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen der AG Mier. Hierbei zuallererst den Kellerkindern Philip Storck, Florian Umstätter, Andreas Krause und Carlos dos Santos für die vielen schönen Stunden in und abseits des Kellers. Weiterhin Danke ich Philipp Uhl für die Erklärung der radioaktiven Markierung, Karin Leotta für die Unterstützung bei der Durchführung der szintigraphischen Experimente und Barbro Beijer für die Unterstützung bei der Synthese der Gallensäuredimere. Des Weiteren Danke ich Christian Kleist für sein Interesse an meiner Arbeit und die vielen Gespräche, die zu dem ein oder anderen Denkanstoß geführt haben. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Eric Mühlberg, der durch seinen besonderen Blick und seiner Hingabe zur graphischen Darstellung zur weiteren Optimierung verschiedener Abbildungen beigetragen hat. Außerdem Danke ich Giulia Pander für die vielen netten Gespräche gerade in den letzten Zügen dieser Arbeit. Mein weiterer Dank gilt Matthias Schwarz, Susanne Krämer, Sebastian Brings, Thomas Lindner, Julia Werner und Verena Böhmer für die gute Zusammenarbeit.

Zudem möchte ich mich bei allen Praktikanten, die ich im Rahmen meiner Arbeit betreut habe, bedanken. Lena Moews, Peter Bitsch, Teresa Debatin, Amelie Vogt, Jonas Hehn, Pauline Wizgall, Niklas van den Bergh, Florian Riethmüller, Tyra Christian, Sonja Sailer und Anastassia Fink: Danke für eure Unterstützung bei meiner Arbeit und meinen vielen verschiedenen Nebenprojekten. Durch euch habe ich nochmals eine andere Sicht auf die wissenschaftliche Welt bekommen.

Ein weiterer Dank gilt meinen Freunden und Kommilitonen für die schöne Zeit während des Studiums und auch danach. Danke für viele Aktivitäten und Abende fernab vom Laboralltag.

Mein besonderer Dank gilt Janis. Danke für deine bedingungslose Unterstützung und den ehrlichen und kritischen wissenschaftlichen Austausch zu jeder Tageszeit. Danke für deine Motivation, deinen Rückhalt und unsere gemeinsame Zeit.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie von Herzen bedanken. Nichts was ich hier schreiben könnte würde dem gerecht werden, was ihr mir an Unterstützung und Rückhalt gegeben habt und was ihr mir bedeutet. Ohne Euch wäre ich definitiv nicht so weit gekommen. Danke an meine Eltern Gudrun und Bernd, sowie meinem Bruder Tobias. Danke an Oma Erika und Onkel Manfred. Danke für eure bedingungslose Liebe, eure Rückendeckung und vor allem das Gefühl von Zuhause. Danke für alles!

## 7 Publikationen, Vorträge und Poster

### 7.1 Publikationen

A. Vogt, S. Wohlfart, S. Urban, W. Mier

*Medical Advances in Hepatitis D Therapy: Molecular Targets*, International Journal of Molecular Sciences **2022**; 23, (18), 10817.

S. Wohlfart, M. Kilian, P. Storck, T. Gutschmann, K. Brandenburg, W. Mier

*Mass Spectrometric Quantification of the Antimicrobial Peptide Pep19-2.5 with Stable Isotope Labeling and Acidic Hydrolysis*, Pharmaceutics **2021**, 13, (9), 1342.

P. Storck, F. Umstätter, S. Wohlfart, C. Domhan, C. Kleist, J. Werner, K. Brandenburg, S. Zimmermann, U. Haberkorn, W. Mier, P. Uhl

*Fatty Acid Conjugation Leads to Length-Dependent Antimicrobial Activity of a Synthetic Antibacterial Peptide (Pep19-4LF)*, Antibiotics **2020**, 9, (12), 844.

### 7.2 Poster

S. Wohlfart, A. Schieck, S. Urban, W. Mier

*Hepcludex – the first-in-class entry inhibitor for the treatment of Hepatitis D virus infection*, Festival of Biologics - European Antibody Congress, Basel (Schweiz), **02.-04.11.2022**.

S. Wohlfart, P. Wizgall, P. Uhl, U. Haberkorn, W. Mier

*Conjugation of cell penetrating peptides enhances the internalization and biodistribution of antibodies*, 36th European Peptide Symposium, Sitges (Spanien), **28.08.-02.09.2022**.

S. Wohlfart, M. Kilian, P. Storck, T. Gutschmann, K. Brandenburg, W. Mier

*A stable isotope-labeled marker amino acid enables quantification of the antimicrobial peptide Pep19-2.5*, DGI-DZIF Joint Annual Meeting, Stuttgart, **01.-03.06.2022**.

S. Wohlfart, P. Wizgall, P. Uhl, U. Haberkorn, W. Mier

*The pharmacokinetics of antibody-cell penetrating peptide conjugates - compounds with enhanced internalization rates*, Festival of Biologics - European Antibody Congress, Basel (Schweiz), **09.-11.11.2021**.

S. Wohlfart, M. Kilian, P. Storck, K. Brandenburg, U. Haberkorn, W. Mier

*Mass spectrometric quantification of the antimicrobial peptide Pep19-2.5 with total hydrolysis*, 21st GFPP Meeting, Amboise (Frankreich), **12.-16.05.2019**.

### 7.3 Vorträge

#### S. Wohlfart

*Mass spectrometric quantification of the antimicrobial peptide Pep19-2.5 with total hydrolysis*, Glycolipid Meeting, Hamburg (Deutschland), **21.06.2019**.

#### S. Wohlfart

The scientific basis for the preparation of a radiolabeled derivative of Aspidasept® to be used in a Phase 0 microdosing study, Glycolipid Meeting, Hamburg (Deutschland), **01.06.2018**.

### 7.4 Betreute Abschlussarbeiten

Sonja Sailer, *Bile acid-peptide conjugates in the treatment of hepatitis B and D*, August 2022 – Februar 2023, Masterarbeit.

Tyra Christian, *Preclinical Examinations Of Myrcludex B Derivatives*, Oktober 2022 – Januar 2023, Bachelorarbeit.

Pauline Wizgall, *Development of antibody-cell penetrating peptide conjugates: internalization enhancement*, Februar – August 2021, Masterarbeit.

Amelie Vogt, *Etablierung eines Farnesyltransferase-Assays zum Vergleich der Farnesylierung der verschiedenen Hepatitis D Virus-Genotypen*, Mai – August 2020, Bachelorarbeit.

Teresa Debatin, *Optimierung der Konjugation von zellpenetrierenden Peptiden an den Modellantikörper Matuzumab*, September – Dezember 2019, Bachelorarbeit.

Lena Moews, *Charakterisierung von Verunreinigungen, die bei der Festphasen Peptidsynthese des Anti-HBV/HDV-Therapeutikums Myrcludex B entstehen*, Mai – August 2019, Bachelorarbeit.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] *Global hepatitis report 2017*, World Health Organisation, **2017**.
- [2] World Health Organisation, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>, Abrufdatum: **07.03.2023**.
- [3] C. Szmaragd, F. Balloux, *The population genomics of hepatitis B virus*, *Molecular ecology* **2007**, *16*, 4747
- [4] J. H. MacLachlan, B. C. Cowie, *Hepatitis B virus epidemiology*, *Cold Spring Harb Perspect Med* **2015**, *5*, a021410
- [5] W. J. Edmunds, *et al.*, *The influence of age on the development of the hepatitis B carrier state*, *Proc Biol Sci* **1993**, *253*, 197
- [6] C. N. Shapiro, *Epidemiology of hepatitis B*, *Pediatr Infect Dis J* **1993**, *12*, 433
- [7] R. C. Hirsch, *et al.*, *Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription*, *Nature* **1990**, *344*, 552
- [8] T. J. Liang, *Hepatitis B: the virus and disease*, *Hepatology* **2009**, *49*, S13
- [9] J. Summers, A. O'Connell, I. Millman, *Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1975**, *72*, 4597
- [10] P. Tiollais, C. Pourcel, A. Dejean, *The hepatitis B virus*, *Nature* **1985**, *317*, 489
- [11] S. Urban, *et al.*, *Strategies to Inhibit Entry of HBV and HDV Into Hepatocytes*, *Gastroenterology* **2014**, *147*, 48
- [12] B. S. Blumberg, H. J. Alter, *A "New" Antigen in Leukemia Sera*, *JAMA* **1965**, *191*, 541
- [13] T. Muller, *et al.*, *Liver imaging with a novel hepatitis B surface protein derived SPECT-tracer*, *Mol Pharm* **2013**, *10*, 2230
- [14] A. Kramvis, *et al.*, *Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus*, *Journal of medical virology* **2008**, *80*, 27
- [15] M. Sunbul, *Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance*, *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 5427
- [16] A. Kramvis, *Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus*, *Intervirology* **2014**, *57*, 141
- [17] V. A. Arankalle, *et al.*, *A novel HBV recombinant (genotype I) similar to Vietnam/Laos in a primitive tribe in eastern India*, *Journal of Viral Hepatitis* **2010**, *17*, 501
- [18] A. L. McNaughton, *et al.*, *Analysis of genomic-length HBV sequences to determine genotype and subgenotype reference sequences*, *The Journal of general virology* **2020**, *101*, 271
- [19] N. M. H. Phan, *et al.*, *Low Genetic Diversity of Hepatitis B Virus Surface Gene amongst Australian Blood Donors*, *Viruses* **2021**, *13*, 1275
- [20] S. Velkov, *et al.*, *The Global Hepatitis B Virus Genotype Distribution Approximated from Available Genotyping Data*, *Genes* **2018**, *9*, 495
- [21] H. W. Zhang, *et al.*, *Risk factors for acute hepatitis B and its progression to chronic hepatitis in Shanghai, China*, *Gut* **2008**, *57*, 1713

- [22] V. Sozzi, et al., *In vitro studies identify a low replication phenotype for hepatitis B virus genotype H generally associated with occult HBV and less severe liver disease*, *Virology* **2018**, 519, 190
- [23] Y. Miyakawa, M. Mizokami, *Classifying hepatitis B virus genotypes*, *Intervirology* **2003**, 46, 329
- [24] K. Suwannakarn, et al., *A novel recombinant of Hepatitis B virus genotypes G and C isolated from a Thai patient with hepatocellular carcinoma*, *Journal of General Virology* **2005**, 86, 3027
- [25] S. E. Congly, et al., *Characterization of hepatitis B virus genotypes and quantitative hepatitis B surface antigen titres in North American tertiary referral liver centres*, *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **2013**, 33, 1363
- [26] S. Lin, et al., *HBV serum markers of 49164 patients and their relationships to HBV genotype in Fujian Province of China*, *J Clin Lab Anal* **2013**, 27, 130
- [27] Y. H. Shi, *Correlation between hepatitis B virus genotypes and clinical outcomes*, *Jpn J Infect Dis* **2012**, 65, 476
- [28] L. V. Sánchez, et al., *Genotypes and S-gene variability of Mexican hepatitis B virus strains*, *Journal of medical virology* **2002**, 68, 24
- [29] L. Stuyver, et al., *A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness*, *Journal of General Virology* **2000**, 81, 67
- [30] P. Arauz-Ruiz, et al., *Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America*, *Journal of General Virology* **2002**, 83, 2059
- [31] M. Engelke, et al., *Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site*, *Hepatology* **2006**, 43, 750
- [32] S. Urban, et al., *The replication cycle of hepatitis B virus*, *Journal of hepatology* **2010**, 52, 282
- [33] A. L. McNaughton, et al., *Insights From Deep Sequencing of the HBV Genome—Unique, Tiny, and Misunderstood*, *Gastroenterology* **2019**, 156, 384
- [34] S. Urban, *Liver capsule: Entry and entry inhibition of hepatitis B virus and hepatitis delta virus into hepatocytes*, *Hepatology* **2016**, 63, 633
- [35] H. Yan, et al., *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus*, *Elife* **2012**, 1, e00049
- [36] Y. Ni, et al., *Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes*, *Gastroenterology* **2014**, 146, 1070
- [37] A. Schulze, P. Gripon, S. Urban, *Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans*, *Hepatology* **2007**, 46, 1759
- [38] L. Wei, A. Ploss, *Hepatitis B virus cccDNA is formed through distinct repair processes of each strand*, *Nature Communications* **2021**, 12, 1591
- [39] M. Nassal, *HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B*, *Gut* **2015**, 64, 1972
- [40] R. Patient, C. Hourieux, P. Roingeard, *Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles*, *Cellular Microbiology* **2009**, 11, 1561
- [41] J. Beck, M. Nassal, *Hepatitis B virus replication*, *World journal of gastroenterology: WJG* **2007**, 13, 48

- [42] D. Ganem, *Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles*, Curr Top Microbiol Immunol **1991**, 168, 61
- [43] K. Watashi, *et al.*, *NTCP and beyond: opening the door to unveil hepatitis B virus entry*, Int J Mol Sci **2014**, 15, 2892
- [44] A. J. Stockdale, *et al.*, *The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis*, Journal of hepatology **2020**, 73, 523
- [45] M. Rizzetto, S. Hamid, F. Negro, *The changing context of hepatitis D*, Journal of hepatology **2021**, 74, 1200
- [46] M. Rizzetto, *et al.*, *Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers*, Gut **1977**, 18, 997
- [47] M. V. Alvarado-Mora, *et al.*, *An update on HDV: virology, pathogenesis and treatment*, Antivir Ther **2013**, 18, 541
- [48] M. Rizzetto, *Hepatitis D: thirty years after*, Journal of hepatology **2009**, 50, 1043
- [49] C. H. Tseng, M. M. Lai, *Hepatitis delta virus RNA replication*, Viruses **2009**, 1, 818
- [50] T. Asselah, *et al.*, *Future treatments for hepatitis delta virus infection*, Liver International **2020**, 40, 54
- [51] A. O. Shakil, *et al.*, *Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I*, Virology **1997**, 234, 160
- [52] V. Ivaniushina, *et al.*, *Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia*, Journal of General Virology **2001**, 82, 2709
- [53] C. M. Lee, *et al.*, *Characterization of a new genotype II hepatitis delta virus from Taiwan*, Journal of medical virology **1996**, 49, 145
- [54] H. Sakugawa, *et al.*, *Hepatitis delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan*, Journal of medical virology **1999**, 58, 366
- [55] F. Le Gal, *et al.*, *Eighth major clade for hepatitis delta virus*, Emerging infectious diseases **2006**, 12, 1447
- [56] M. Makuwa, *et al.*, *Prevalence and genetic diversity of hepatitis B and delta viruses in pregnant women in Gabon: molecular evidence that hepatitis delta virus clade 8 originates from and is endemic in central Africa*, Journal of clinical microbiology **2008**, 46, 754
- [57] M. Makuwa, *et al.*, *Prevalence and molecular diversity of hepatitis B virus and hepatitis delta virus in urban and rural populations in northern Gabon in central Africa*, Journal of clinical microbiology **2009**, 47, 2265
- [58] N. Radjef, *et al.*, *Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades*, Journal of virology **2004**, 78, 2537
- [59] J. L. Casey, *Hepatitis delta virus: genetics and pathogenesis*, Clinics in laboratory medicine **1996**, 16, 451
- [60] J. L. Casey, *et al.*, *A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America*, Proceedings of the National Academy of Sciences **1993**, 90, 9016
- [61] M. S. Gomes-Gouvêa, *et al.*, *Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin*, Acta tropica **2008**, 106, 149
- [62] A. Quintero, *et al.*, *Hepatitis delta virus genotypes I and III circulate associated with hepatitis B virus genotype F in Venezuela*, Journal of medical virology **2001**, 64, 356

- [63] L. M. F. Barros, *et al.*, *Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: Inheritance from African slaves?*, *Virus Research* **2011**, 160, 333
- [64] M. Spaan, *et al.*, *Hepatitis delta genotype 5 is associated with favourable disease outcome and better response to treatment compared to genotype 1*, *Journal of hepatology* **2020**, 72, 1097
- [65] C. Sureau, F. Negro, *The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis*, *Journal of hepatology* **2016**, 64, S102
- [66] W.-H. Huang, Y.-S. Chen, P.-J. J. J. o. v. Chen, *Nucleolar targeting of hepatitis delta antigen abolishes its ability to initiate viral antigenomic RNA replication*, **2008**, 82, 692
- [67] G. Luo, *et al.*, *A specific base transition occurs on replicating hepatitis delta virus RNA*, **1990**, 64, 1021
- [68] E. Shirvani Dastgerdi, U. Herbers, F. Tacke, *Molecular and clinical aspects of hepatitis D virus infections*, *World journal of virology* **2012**, 1, 71
- [69] F.-L. Chang, *et al.*, *The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus*, **1991**, 88, 8490
- [70] M. Chao, S.-Y. Hsieh, J. J. J. o. v. Taylor, *Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication*, **1990**, 64, 5066
- [71] A. Vogt, *et al.*, *Medical Advances in Hepatitis D Therapy: Molecular Targets*, **2022**, 23, 10817
- [72] C.-Z. Lee, *et al.*, *Isoprenylation of large hepatitis delta antigen is necessary but not sufficient for hepatitis delta virus assembly*, *Virology* **1994**, 199, 169
- [73] P. J. Casey, M. C. Seabra, *Protein prenyltransferases*, *The Journal of biological chemistry* **1996**, 271, 5289
- [74] S. B. Long, P. J. Casey, L. S. Beese, *Reaction path of protein farnesyltransferase at atomic resolution*, *Nature* **2002**, 419, 645
- [75] W. J. McAleer, *et al.*, *Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast*, *Nature* **1984**, 307, 178
- [76] G. M. Keating, S. Noble, *Recombinant hepatitis B vaccine (Engerix-B): a review of its immunogenicity and protective efficacy against hepatitis B*, *Drugs* **2003**, 63, 1021
- [77] W. H. Gerlich, *Prophylactic vaccination against hepatitis B: achievements, challenges and perspectives*, *Med Microbiol Immunol* **2015**, 204, 39
- [78] K. A. A. T. Lowjaga, *et al.*, *Long-term trans-inhibition of the hepatitis B and D virus receptor NTCP by tauroithocholic acid*, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2021**, 320, G66
- [79] C. f. M. P. f. H. U. (CHMP), *European Medicines Agency (EMA)*, **2020**.
- [80] F. A. Lempp, S. Urban, *Inhibitors of hepatitis B virus attachment and entry*, *Intervirology* **2014**, 57, 151
- [81] J. Petersen, *et al.*, *Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein*, *Nature Biotechnology* **2008**, 26, 335
- [82] T. Hosaka, *et al.*, *Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection*, *Hepatology* **2013**, 58, 98

- [83] P. Marcellin, *et al.*, *Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study*, *Lancet* **2013**, 381, 468
- [84] G. A. Kim, *et al.*, *Incidence of hepatocellular carcinoma after HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients: a need for surveillance*, *Journal of hepatology* **2015**, 62, 1092
- [85] H. Kumada, *et al.*, *Efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate rescue therapy for chronic hepatitis B patients who failed other nucleos(t)ide analogs*, *Hepatol Res* **2017**, 47, 1032
- [86] K. L. Kuhen, C. E. Samuel, *Mechanism of interferon action: functional characterization of positive and negative regulatory domains that modulate transcriptional activation of the human RNA-dependent protein kinase Pkr promoter*, *Virology* **1999**, 254, 182
- [87] R. Bartenschlager, S. Urban, U. Protzer, *Towards curative therapy of chronic viral hepatitis*, *Zeitschrift für Gastroenterologie* **2019**, 57, 61
- [88] C. L. Lin, H. C. Yang, J. H. Kao, *Hepatitis B virus: new therapeutic perspectives*, *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **2016**, 36 Suppl 1, 85
- [89] D. Slijepcevic, *et al.*, *Impaired uptake of conjugated bile acids and hepatitis b virus preS1-binding in na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide knockout mice*, *Hepatology* **2015**, 62, 207
- [90] A. Meier, *et al.*, *Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes*, *Hepatology* **2013**, 58, 31
- [91] A. Schulze, *et al.*, *Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction*, *J Virol* **2010**, 84, 1989
- [92] D. Glebe, *et al.*, *Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes*, *Gastroenterology* **2005**, 129, 234
- [93] A. Schieck, *et al.*, *Solid-phase synthesis of the lipopeptide Myr-HBVpreS/2-78, a hepatitis B virus entry inhibitor*, *Molecules (Basel, Switzerland)* **2010**, 15, 4773
- [94] P. Gripon, I. Cannie, S. Urban, *Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein*, *J Virol* **2005**, 79, 1613
- [95] T. Volz, *et al.*, *The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus*, *Journal of hepatology* **2013**, 58, 861
- [96] A. Schieck, *et al.*, *Hepatitis B virus hepatotropism is mediated by specific receptor recognition in the liver and not restricted to susceptible hosts*, *Hepatology* **2013**, 58, 43
- [97] A. Blank, *et al.*, *First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B*, *Journal of hepatology* **2016**, 65, 483
- [98] P. Bogomolov, *et al.*, *Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase Ib/IIa study*, *Journal of hepatology* **2016**, 65, 490
- [99] A. Blank, *et al.*, *The NTCP-inhibitor Myrcludex B: Effects on Bile Acid Disposition and Tenofovir Pharmacokinetics*, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2018**, 103, 341

- [100] T. Tu, S. Urban, *Virus entry and its inhibition to prevent and treat hepatitis B and hepatitis D virus infections*, Current Opinion in Virology **2018**, 30, 68
- [101] M. Krepstakies, et al., *A New Class of Synthetic Peptide Inhibitors Blocks Attachment and Entry of Human Pathogenic Viruses*, The Journal of infectious diseases **2012**, 205, 1654
- [102] M. Rizzetto, A. Ciancio, *The prenylation inhibitor, lonafarnib: a new therapeutic strategy against hepatitis delta*, The Lancet Infectious Diseases **2015**, 15, 1119
- [103] C. Koh, et al., *Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial*, The Lancet Infectious Diseases **2015**, 15, 1167
- [104] C. Yurdaydin, et al., *Optimizing lonafarnib treatment for the management of chronic delta hepatitis: The LOWR HDV-1 study*, **2018**, 67, 1224
- [105] C. Yurdaydin, et al., *A phase 2 dose-finding study of lonafarnib and ritonavir with or without interferon alpha for chronic delta hepatitis*, **2022**, 75, 1551
- [106] S. Dhillon, *Lonafarnib: First Approval*, Drugs **2021**, 81, 283
- [107] B. Doring, et al., *The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure*, Current topics in membranes **2012**, 70, 105
- [108] B. Hagenbuch, P. J. Meier, *Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter*, The Journal of clinical investigation **1994**, 93, 1326
- [109] J. J. Eloranta, D. Jung, G. A. Kullak-Ublick, *The human Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide gene is activated by glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, and suppressed by bile acids via a small heterodimer partner-dependent mechanism*, Molecular endocrinology (Baltimore, Md.) **2006**, 20, 65
- [110] W. Kramer, et al., *Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na<sup>(+)</sup>/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters*, J Lipid Res **1999**, 40, 1604
- [111] W. E. Visser, et al., *Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family*, Molecular and Cellular Endocrinology **2010**, 315, 138
- [112] R. B. Kim, et al., *Modulation by drugs of human hepatic sodium-dependent bile acid transporter (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) activity*, The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **1999**, 291, 1204
- [113] H. Yan, et al., *Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide*, J Virol **2014**, 88, 3273
- [114] M. J. Ruggiero, et al., *A clinically relevant polymorphism in the Na<sup>(+)</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) occurs at a rheostat position*, J Biol Chem **2021**, 296, 100047
- [115] G. Grosser, et al., *Substrate Specificities and Inhibition Pattern of the Solute Carrier Family 10 Members NTCP, ASBT and SOAT*, Frontiers in Molecular Biosciences **2021**, 8
- [116] D. Zakrzewicz, J. Geyer, *Multitasking Na<sup>+</sup>/Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) as a Drug Target for HBV Infection: From Protein Engineering to Drug Discovery*, **2022**, 10, 196
- [117] K. Goutam, et al., *Structural basis of sodium-dependent bile salt uptake into the liver*, Nature **2022**

- [118] N.-J. Hu, *et al.*, *Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT*, *Nature* **2011**, 478, 408
- [119] D. Zakrzewicz, J. Geyer, *Multitasking Na<sup>+</sup>/Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) as a Drug Target for HBV Infection: From Protein Engineering to Drug Discovery*, *Biomedicines* **2022**, 10, 196
- [120] J. Asami, *et al.*, *Structure of the bile acid transporter and HBV receptor NTCP*, *Nature* **2022**, 606, 1021
- [121] R. Greupink, *et al.*, *In silico identification of potential cholestasis-inducing agents via modeling of Na(+)-dependent taurocholate cotransporting polypeptide substrate specificity*, *Toxicol Sci* **2012**, 129, 35
- [122] Z. Dong, S. Ekins, J. E. Polli, *Structure–Activity Relationship for FDA Approved Drugs As Inhibitors of the Human Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP)*, *Molecular Pharmaceutics* **2013**, 10, 1008
- [123] Z. Dong, S. Ekins, J. E. Polli, *Quantitative NTCP pharmacophore and lack of association between DILI and NTCP Inhibition*, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2015**, 66, 1
- [124] J. M. Donkers, *et al.*, *Reduced hepatitis B and D viral entry using clinically applied drugs as novel inhibitors of the bile acid transporter NTCP*, *Sci Rep* **2017**, 7, 15307
- [125] Y. Liu, *et al.*, *Design of Dimeric Bile Acid Derivatives as Potent and Selective Human NTCP Inhibitors*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 64, 5973
- [126] T. Li, J. Y. Chiang, *Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy*, *Pharmacol Rev* **2014**, 66, 948
- [127] J. Y. Chiang, *Bile acid metabolism and signaling*, *Compr Physiol* **2013**, 3, 1191
- [128] A. Enhsen, W. Kramer, G. Wess, *Bile acids in drug discovery*, *Drug discovery today* **1998**, 3, 409
- [129] E. Moghimipour, A. Ameri, S. Handali, *Absorption-Enhancing Effects of Bile Salts*, *Molecules (Basel, Switzerland)* **2015**, 20, 14451
- [130] A. Wahlström, *et al.*, *Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism*, *Cell Metabolism* **2016**, 24, 41
- [131] A. Di Ciaula, *et al.*, *Bile Acid Physiology*, *Annals of hepatology* **2017**, 16, s4
- [132] A. M. Gressner, O. A. Gressner, *Gallensäuren*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (Eds.: A. M. Gressner, T. Arndt), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2019**, pp. 924.
- [133] K. Lei, *et al.*, *Research progress in the application of bile acid-drug conjugates: A "trojan horse" strategy*, *Steroids* **2021**, 173, 108879
- [134] J. Y. L. Chiang, *Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms*, *Journal of hepatology* **2004**, 40, 539
- [135] N. B. Myant, K. A. Mitropoulos, *Cholesterol 7 alpha-hydroxylase*, *J Lipid Res* **1977**, 18, 135
- [136] S. Kevresan, *et al.*, *Biosynthesis of bile acids in mammalian liver*, *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* **2006**, 31, 145
- [137] J. Y. L. Chiang, J. M. Ferrell, *Bile Acid Metabolism in Liver Pathobiology*, *Gene Expr* **2018**, 18, 71
- [138] W. C. Duane, N. B. Javitt, *27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects*, *J Lipid Res* **1999**, 40, 1194

- [139] V. Urdaneta, J. Casadesús, *Interactions between Bacteria and Bile Salts in the Gastrointestinal and Hepatobiliary Tracts*, *Frontiers in medicine* **2017**, 4, 163
- [140] R. M. B. Carrilho, *et al.*, *A new facile synthesis of steroid dimers containing 17,17'-dicarboxamide spacers*, *Tetrahedron Letters* **2013**, 54, 2763
- [141] L. Nahar, S. D. Sarker, A. B. Turner, *Synthesis of 17 beta-hydroxy steroidal oxalate dimers from naturally occurring steroids*, *Acta Chimica Slovenica* **2007**, 54, 903
- [142] R. Joachimiak, M. Piasecka, Z. Paryzek, *Synthesis of novel amide-linked dimers of lithocholic acid*, *Journal of Chemical Research* **2008**, 2008, 260
- [143] A. Kreutzberger, *et al.*, *Antivirale Wirkstoffe, 17. Mitt. Oligocyclisch N-substituierte Lithocholsäureamide*, *Archiv der Pharmazie* **1981**, 314, 41
- [144] A. Kreutzberger, H. Schimmelpfennig, *Antivirale Wirkstoffe, 18. Mitt. 2-Aminothiazole durch Spaltung der S-S-Bindung des Disulfidodicarbamidins*, *Archiv der Pharmazie* **1981**, 314, 385
- [145] B. Hazra, *et al.*, *Bile acid amides derived from chiral amino alcohols: novel antimicrobials and antifungals*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, 14, 773
- [146] J. P. Guthrie, J. Cossar, B. A. Dawson, *A water soluble dimeric steroid with catalytic properties. Rate enhancements from hydrophobic binding*, *Canadian Journal of Chemistry* **1986**, 64, 2456
- [147] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie, Vol. 7*, Springer Spektrum, Heidelberg-Berlin, **2013**.
- [148] R. B. Merrifield, *Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture)*, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1985**, 24, 799
- [149] R. B. Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, 2149
- [150] L. A. Carpino, G. Y. Han, *9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group*, *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, 37, 3404
- [151] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - a practical approach*, OXFORD University Press, Oxford, **2000**.
- [152] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Amide bond formation and peptide coupling*, *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827
- [153] J. L. Lauer, C. G. Fields, G. B. Fields, *Sequence dependence of aspartimide formation during 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis*, *Letters in Peptide Science* **1995**, 1, 197
- [154] R. Dölling, *et al.*, *Piperidine-mediated side product formation for Asp(OBut)-containing peptides*, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 853
- [155] T. Michels, *et al.*, *Acid-mediated prevention of aspartimide formation in solid phase peptide synthesis*, *Organic letters* **2012**, 14, 5218
- [156] J. D. Wade, *et al.*, *Base-induced side reactions in Fmoc-solid phase peptide synthesis: Minimization by use of piperazine as Na-deprotection reagent*, *Letters in Peptide Science* **2000**, 7, 107
- [157] R. Behrendt, *et al.*, *New t-butyl based aspartate protecting groups preventing aspartimide formation in Fmoc SPPS*, *Journal of Peptide Science* **2015**, 21, 680

- [158] A. Karlström, A. Undén, *A new protecting group for aspartic acid that minimizes piperidine-catalyzed aspartimide formation in Fmoc solid phase peptide synthesis*, Tetrahedron Letters **1996**, 37, 4243
- [159] M. Quibell, *et al.*, *Suppression of piperidine-mediated side product formation for Asp(OBut)-containing peptides by the use of N-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)(Hmb) backbone amide protection*, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications **1994**, 2343
- [160] A. B. Abdel-Aal, *et al.*, *A backbone amide protecting group for overcoming difficult sequences and suppressing aspartimide formation*, J Pept Sci **2016**, 22, 360
- [161] R. Behrendt, P. White, J. Offer, *Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis*, Journal of Peptide Science **2016**, 22, 4
- [162] K. Neumann, *et al.*, *Prevention of aspartimide formation during peptide synthesis using cyanosulfurylides as carboxylic acid-protecting groups*, Nature Communications **2020**, 11, 982
- [163] D. H. Persing, H. Varmus, D. J. J. o. v. Ganem, *The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid*, **1987**, 61, 1672
- [164] X. Qiao, *et al.*, *A tandem mass spectrometric study of bile acids: Interpretation of fragmentation pathways and differentiation of steroid isomers*, Steroids **2012**, 77, 204
- [165] G. Wess, *et al.*, *Specific Inhibitors of Ileal Bile Acid Transport*, Journal of Medicinal Chemistry **1994**, 37, 873
- [166] V. V. Sureshbabu, T. M. Vishwanatha, B. Vasantha, *A Simple Synthesis of N $\beta$ -Fmoc/Z-Amino Alkyl Thiols and their use in the Synthesis of N $\beta$ -Fmoc/Z-Amino Alkyl Sulfonic Acids*, Synlett **2010**, 2010, 1037
- [167] C. Gennari, *et al.*, *Synthesis of Sulfonamido-Pseudopeptides: New Chiral Unnatural Oligomers*, Angewandte Chemie International Edition in English **1994**, 33, 2067
- [168] S. Caddick, J. D. Wilden, D. B. Judd, *Direct Synthesis of Sulfonamides and Activated Sulfonate Esters from Sulfonic Acids*, Journal of the American Chemical Society **2004**, 126, 1024
- [169] H. Masuno, *et al.*, *Development of novel lithocholic acid derivatives as vitamin D receptor agonists*, Bioorganic & medicinal chemistry **2019**, 27, 3674
- [170] L. Nahar, A. B. Turner, *Synthesis of ester-linked lithocholic acid dimers*, Steroids **2003**, 68, 1157
- [171] F. S. Di Leva, *et al.*, *Structure-based drug design targeting the cell membrane receptor GPBAR1: exploiting the bile acid scaffold towards selective agonism*, Scientific Reports **2015**, 5, 16605
- [172] K. Suthagar, A. J. Fairbanks, *A new way to do an old reaction: highly efficient reduction of organic azides by sodium iodide in the presence of acidic ion exchange resin*, Chemical Communications **2017**, 53, 713
- [173] A. Kamal, *et al.*, *Mild and efficient reduction of azides to amines: synthesis of fused [2,1-b]quinazolinones*, Tetrahedron Letters **2002**, 43, 6861
- [174] K. J. Wallace, *et al.*, *Preparation of 1,3,5-Tris(aminomethyl)-2,4,6-triethylbenzene from Two Versatile 1,3,5-Tri(halosubstituted) 2,4,6-Triethylbenzene Derivatives*, Synthesis **2005**, 2005, 2080
- [175] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organische Chemie, Vol. 2*, Springer Spektrum, Berlin-Heidelberg, **2013**.

- [176] D. A. Hartman, *Determination of the Stability of Drugs in Plasma*, Current Protocols in Pharmacology **2002**, 19, 7.6.1
- [177] P. I. Dosa, et al., *Synthesis and Evaluation of Water-Soluble Prodrugs of Ursodeoxycholic Acid (UDCA), an Anti-apoptotic Bile Acid*, ChemMedChem **2013**, 8, 1002
- [178] D. Kritchevsky, et al., *Novel derivatives of 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-OIC acid (chenodeoxycholic acid) and 3 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-OIC acid (ursodeoxycholic acid)*, **1986**, 47, 41
- [179] V. Del Amo, et al., *Differentially-protected steroidal triamines; scaffolds with potential for medicinal, supramolecular, and combinatorial chemistry*, **2004**, 2, 3320
- [180] K. Mitamura, et al., *Analysis of bile acid glutathione thioesters by liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry*, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **2007**, 855, 88
- [181] N. G. Aher, V. S. Pore, *Synthesis of Bile Acid Dimers Linked with 1,2,3-Triazole Ring at C-3, C-11, and C-24 Positions*, Synlett **2005**, 2005, 2155
- [182] N. G. Aher, V. S. Pore, S. P. Patil, *Design, synthesis, and micellar properties of bile acid dimers and oligomers linked with a 1,2,3-triazole ring*, Tetrahedron **2007**, 63, 12927
- [183] J. Totobenazara, A. J. Burke, *New click-chemistry methods for 1,2,3-triazoles synthesis: recent advances and applications*, Tetrahedron Letters **2015**, 56, 2853
- [184] W. Kramer, et al., *Topological Photoaffinity Labeling of the Rabbit Ileal Na<sup>+</sup>/Bile-Salt-Cotransport System*, European journal of biochemistry **1997**, 249, 456
- [185] H. Gao, J. R. Dias, *SELECTIVE PROTECTION OF THE VARIOUS HYDROXY GROUPS OF CHOLIC ACID AND DERIVATIVES. A REVIEW*, Organic Preparations and Procedures International **1999**, 31, 145
- [186] M. C. Wenlock, et al., *A comparison of physicochemical property profiles of development and marketed oral drugs*, Journal of medicinal chemistry **2003**, 46, 1250
- [187] OECD, *Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, **1995**, 1
- [188] L. Di, E. Kerns, *Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization*, Academic press, **2015**.
- [189] J. E. A. Comer, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [190] T. L. Hill, *General Theory of the Isoelectric Point*, The Journal of Physical Chemistry **1942**, 46, 417
- [191] P. G. Righetti, *Isoelectric focusing: theory, methodology and application*, Elsevier, **2000**.
- [192] G. Raspotnig, et al., *Colorimetric determination of cell numbers by Janus green staining*, Analytical biochemistry **1999**, 275, 74
- [193] A. K. Parpart, et al., *The osmotic resistance (fragility) of human red cells*, The Journal of clinical investigation **1947**, 26, 636
- [194] L. Mrówczyńska, J. Bielawski, *The mechanism of bile salt-induced hemolysis*, Cellular & Molecular Biology Letters **2001**, 6, 881

- [195] H. Sagawa, S. Tazuma, G. Kajiyama, *Protection against hydrophobic bile salt-induced cell membrane damage by liposomes and hydrophilic bile salts*, American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **1993**, 264, G835
- [196] W. Kramer, *et al.*, *Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids*, Journal of Biological Chemistry **1992**, 267, 18598
- [197] G. Wess, *et al.*, *Synthesis of bile acid - drug conjugates: Potential drug - shuttles for liver specific targeting*, Tetrahedron Letters **1993**, 34, 819
- [198] W. Kramer, *et al.*, *Intestinal absorption of peptides by coupling to bile acids*, The Journal of biological chemistry **1994**, 269, 10621
- [199] P. Uhl, *et al.*, *A liposomal formulation for the oral application of the investigational hepatitis B drug Myrcludex B*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **2016**, 103, 159
- [200] K. Goutam, *et al.*, *Structural basis of sodium-dependent bile salt uptake into the liver*, **2022**, 1
- [201] L. Nahar, S. D. Sarker, A. B. Turner, *A Review on Synthetic and Natural Steroid Dimers: 1997-2006*, Current Medicinal Chemistry **2007**, 14, 1349
- [202] L. Nahar, S. D. Sarker, *A review on steroid dimers: 2011–2019*, Steroids **2020**, 164, 108736
- [203] J. Harmatha, M. Budesínský, K. Vokác, *Photochemical transformation of 20-hydroxyecdysone: production of monomeric and dimeric ecdysteroid analogues*, Steroids **2002**, 67, 127
- [204] R. P. Bonar-Law, A. P. Davis, J. K. J. J. o. t. C. S. Sanders, *Perkin Transactions 1, New procedures for selectively protected cholic acid derivatives. Regioselective protection of the 12 $\alpha$ -OH group, and t-butyl esterification of the carboxyl group*, **1990**, 2245
- [205] D. S. Youngblood, *et al.*, *Stability of Cell-Penetrating Peptide–Morpholino Oligomer Conjugates in Human Serum and in Cells*, Bioconjugate Chemistry **2007**, 18, 50
- [206] P. E. Thorpe, *et al.*, *New Coupling Agents for the Synthesis of Immunotoxins Containing a Hindered Disulfide Bond with Improved Stability in Vivo*, Cancer Research **1987**, 47, 5924
- [207] D. B. A. de Bont, *et al.*, *Solid-phase synthesis of peptidosulfonamide containing peptides derived from Leu-enkephalin*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **1996**, 6, 3035
- [208] N. S. Vatmurge, *et al.*, *Synthesis and biological evaluation of bile acid dimers linked with 1,2,3-triazole and bis- $\beta$ -lactam*, Organic & Biomolecular Chemistry **2008**, 6, 3823
- [209] W. Kramer, *et al.*, Vol. 5250524, Hoechst Aktiengesellschaft, Germany, **1993**.
- [210] A. Paquet, *Introduction of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, trichloroethoxycarbonyl, and benzyloxycarbonyl amine protecting groups into O-unprotected hydroxyamino acids using succinimidyl carbonates*, Canadian Journal of Chemistry **1982**, 60, 976
- [211] J. Huang, T. S. Widlanski, *Facile synthesis of sulfonyl chlorides*, Tetrahedron Letters **1992**, 33, 2657
- [212] E. M. AG, *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie*, E. Merck AG, **1965**.
- [213] Y. Kobayashi, K. Saiki, F. Watanabe, *Characteristics of mass fragmentation of steroids by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry*, Biological & pharmaceutical bulletin **1993**, 16, 1175

- [214] D.-H. Kang, *et al.*, *Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, J Bulletin of the Korean Chemical Society **2002**, 23, 1511
- [215] F. A. Lempp, S. Urban, *Hepatitis Delta Virus: Replication Strategy and Upcoming Therapeutic Options for a Neglected Human Pathogen*, Viruses **2017**, 9
- [216] M. Eisenhut, W. Mier, *Radioiodination Chemistry and Radioiodinated Compounds*, in *Handbook of Nuclear Chemistry* (Eds.: A. Vértes, S. Nagy, Z. Klencsár, R. G. Lovas, F. Rösch), Springer US, Boston, MA, **2011**, pp. 2121.

## 9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Schematische Übersicht des Hepatitis B-Viruspartikels. Der 42 nm große-Viruspartikel beinhaltet die Oberflächenproteine (S-, M-, L-HBsAg), die Kapsidproteine (HBcAg), sowie die teilweise doppelsträngige DNA mit kovalent-gebundener Polymerase. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[13]</sup>. 2
- Abbildung 1.2: Sequenzalignement der verschiedenen HBV-Genotypen. Die für die Bindung an Hepatozyten essentiellen Aminosäuren sind fett hervorgehoben. Positionen, an denen Sequenzunterschiede vorkommen, sind orange hinterlegt. 4
- Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung des Replikationszyklus von HBV. (A) Bindung des Viruspartikels an HSPG und NTCP und Eintritt in die Zelle. (B) Freisetzung des Nukleocapsids im Cytoplasma. (C) Transport des Nukleocapsids zum Nukleus, dort Freisetzung der rcDNA in den Nukleus. (D) Bildung der cccDNA aus der rcDNA durch Reparaturmechanismen. (E) Transkription der viralen RNA. (F) Freisetzung der pgRNA ins Cytosol. (G) Komplexbildung von pgRNA und viraler Polymerase zu RNA-beinhaltetem-Nukleocapsid. (H) Reifung des RNA-Nukleocapsids durch reverse Transkription. (I1) Reimport des Nukleocapsids in den Nukleus. (I2) Import in ER und Umhüllung des Nukleocapsids durch co-translational eingeführte Hüllproteine. Hierbei werden aufgrund des Überschusses an Hüllproteinen ebenfalls SVPs gebildet, die kein Virusgenom beinhalten. (J) Sekretion der Viruspartikel und SVPs durch Exozytose. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[32-33, 39, 43]</sup>. 6
- Abbildung 1.4: Aufbau eines HDV-Partikels. Das große und das kleine HDAg binden an da RNA-Genom von Hepatitis D und bilden so ein Ribonukleoprotein. Dieses wird in die virale Hülle des HBV verpackt, welche die HBsAg trägt. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[13]</sup>. 7
- Abbildung 1.5: Vereinfachte Darstellung des Replikationszyklus von HDV. (A) Bindung des Viruspartikels an HSPG und NTCP und Eintritt in die Zelle. (B) Freisetzung des RNP im Cytoplasma. (C) Transport des RNP zum Nukleus und Freisetzung des Genoms (D) Migration des Genoms in Nukleolus aufgrund eines Kernlokalisierungssignals. (E) Bildung des Antigenoms, ein Replikationsintermediat mit negativer Polarität. (F) Vervielfältigung des Antigenoms durch *Rolling-Circle*-Mechanismus um Nukleus. (G). Vervielfältigung des Genoms durch *Rolling-Circle*-Mechanismus aus dem Antigenom. (H) Editierung des Stopcodons zu einem Tryptophancodon durch die humane Adenosid-Desaminase I und Verlängerung des offenen Leserahmens um 19 Aminosäuren. (I.1) Transport des Genoms aus dem Nukleus ins Cytoplasma. (I.2) Codierung des kleinen HDAg aus dem Antigenom. (I.3) Codierung des großen HDAg aus dem editierten Antigenom. (J) Prenylierung des großen HDAg durch Farnesylierung. (K) Bildung des RNP aus Genom, kleinem und farnesyliertem großen HDAg. (L) Import in ER und Umhüllung des RNP durch die Hüllproteine des HBV. (M) Sekretion der Viruspartikel und SVPs durch Exozytose analog zu HBV. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[68, 71]</sup>. 8

- Abbildung 1.6: Struktur der HBsAg Domäne und der Peptidsequenz des Eintrittsinhibitors Myrcludex B. In der S-Domäne (AS 164-389) befinden sich die vier Transmembrandomänen I-IV. Die zwischen den Transmembrandomänen II und III vorhandene Disulfidbrücke bildet die sogenannte antigene *loop*-Region, welche auf der extrazellulären Membranoberfläche lokalisiert ist. Die AS 108-164 bilden die preS2-Domäne. An die preS1-Domäne (AS 2-108) ist N-Terminal Myristinsäure konjugiert. Myrcludex B besteht aus den AS 2-48 der preS1-Domäne. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[11, 93]</sup>. 10
- Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Membrantopologie des NTCP. Die Panel-Domäne bestehend aus TM1, TM5 und TM6 ist in orange dargestellt, die beiden Helixbündel der Kerndomäne mit pseudo-zweidimensionaler Symmetrie in dunkelblau (TM2-TM4) und hellblau (TM7-TM9). Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[117]</sup>. 13
- Abbildung 1.8: Darstellung der von Donkers *et al.* über funktionelles Screening identifizierten NTCP-Inhibitoren aus 1280 von FDA und EMA für andere Indikationen zugelassenen Medikamenten<sup>[124]</sup>. 14
- Abbildung 1.9: Standardnummerierung der Kohlenstoffatome in Gallensäuren am Beispiel von Cholestan, dem Grundkörper der Gallensäuren und Steroide<sup>[131]</sup>. 15
- Abbildung 1.10: Darstellung der verschiedenen Gallensäuren in Sesselkonfiguration. Aufgrund der 5 $\beta$ -Verknüpfung der Ringe A und B kommt es bei allen Gallensäuren zur räumlichen Trennung der hydrophilen und hydrophoben Bestandteile. Dies resultiert in ihren amphiphilen Eigenschaften. Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[131, 133]</sup>. 16
- Abbildung 1.11: Allgemeine Darstellung der unterschiedlichen Reaktionswege der Gallensäurebiosynthese. An der Gallensäurebiosynthese sind verschiedene CYP P450-Enzyme beteiligt. Innerhalb der Leber werden direkt aus Cholesterin die primären Gallensäuren CA und CDCA gebildet. Durch weitere Umwandlungen im Darm werden die sekundären Gallensäuren DCA und LCA, sowie die tertiäre Gallensäure UDCA gebildet. An diesem Prozess sind Reaktionsschritte wie Dehydroxylierung, Dehydrogenierung und Epimerisierung beteiligt. Anschließend werden die Gallensäuren ausgeschieden oder in die Leber zurückgeführt (enterohepatischer Kreislauf). Die Abbildung ist angelehnt an<sup>[130-132, 137]</sup>. 18
- Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese: SG<sub>t</sub>: temporäre Schutzgruppe, SG<sub>p</sub>: permanente Schutzgruppe. 20
- Abbildung 1.13: Aspartimidbildung bei der SPPS und die daraus resultierenden Nebenprodukte. 21
- Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Gallensäure-Peptidderivate mit den verschiedenen innerhalb dieser Arbeit variierten Parametern. 24
- Abbildung 3.1: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der verschiedenen Genotypen im Bereich HBVpreS/2-21-yK und der von Myrcludex B abgeleiteten gekürzten consensus-Sequenz. Verwendung von Myrcludex B als Referenzsubstanz. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM beziehungsweise 3000 - 0,156 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 27

- Abbildung 3.2: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit unterschiedlicher Länge der am C-Terminus konjugierten Fettsäure. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM bei C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> beziehungsweise 3000 - 0,156 nM bei C<sub>10</sub> und C<sub>12</sub>. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 31
- Abbildung 3.3: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen von MyrB-yK-UDCA. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK (consensus) als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM beziehungsweise 3000 - 0,156 nM bei HBVpreS/2-21-yK (consensus). Die Probe wurde in Triplikaten untersucht. 33
- Abbildung 3.4: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit den verschiedenen, an Lysin konjugierten, Gallensäuremonomeren. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 36
- Abbildung 3.5: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der monomeren Gallensäure UDCA und CA. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 3000000 – 155,6 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 38
- Abbildung 3.6: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der Peptide mit verschiedenen Kombinationen der Konjugationsstelle von Myristinsäure und LCA. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 41
- Abbildung 3.7: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der Peptide mit unterschiedlicher stereochemischer Konfiguration des Lysins an der Gallensäure-Konjugationsstelle. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 43
- Abbildung 3.8: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit verschiedenen Linkern zwischen Peptid und der Gallensäure LCA. Verwendung von Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 47
- Abbildung 3.9: Vergleichende Darstellung von Lysin und den drei nicht natürlichen basischen Aminosäuren Ornithin, Diaminobuttersäure und Diaminopropionsäure. 49
- Abbildung 3.10: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen von cyclo-HBVpreS/2-21-yK und cyclo-HBVpreS/2-21-yK-UDCA. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK (consensus) als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM beziehungsweise 3000 - 0,156 nM bei HBVpreS/2-21-yK (consensus). Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 50

- Abbildung 3.11: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der verschiedenen cyclischen HBVpreS/2-21-Peptide mit Variation der Konjugationsstelle von UDCA. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK (consensus) als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM beziehungsweise 3000 - 0,156 nM bei HBVpreS/2-21-yK (consensus). Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 53
- Abbildung 3.12: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit Konjugation verschiedener direkt Kopf-Schwanz verknüpfter Gallensäuredimere an Lysin. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 57
- Abbildung 3.13: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit Konjugation verschiedener Gallensäuredimere mit Verknüpfung über unterschiedliche Linker. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 62
- Abbildung 3.14: Ergebnisse des HDV-Infektionsinhibitionsassays in HuH7-Zellen der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit Konjugation verschiedener direkt Kopf-Schwanz verknüpfter gemischter Gallensäuredimere mit DCA als festen Baustein und Variation der zweiten Gallensäure. Verwendung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK als Referenzsubstanzen. Der Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM. Die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 67
- Abbildung 3.15: Isoelektrische Fokussierung von Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA. A) Darstellung des ersten verwendeten IEF-Gradientengels pH 3-9 mit Myrcludex B (D), HBVpreS/2-21-yK (C) und HBVpreS/2-21-yK-LCA (B). Zusätzlich wurde der IEF-Marker (A) aufgetragen, der die folgenden Substanzen enthält: I: Amyloglucosidase (pI 3,5), II: Glucoseoxidase (pI 4,2), III: Trypsininhibitor (Sojabohne; pI 4,5), IV:  $\beta$ -Lactoglobulin (IVa: pI 5,15; IVa: pI 5,3), V: Carboanhydrase (pI 6,0), VI: Myoglobin (Pferdeherz; VIa: pI 6,9; VIb: pI 7,35), VII: Linsenlektin (VIIa: pI 7,75; VIIb: pI 8,0; VIIc: pI 8,3). B) Darstellung der zu Gel 1 gehörenden Kalibriergeraden aus dem IEF-Marker zur Berechnung des pI der verschiedenen Substanzen. 71
- Abbildung 3.16: Ergebnisse des Janus Green Assays beispielhaft für sechs synthetisierte und auf HDV-Infektionsinhibition untersuchte Gallensäure-Peptid-Konjugate. A) Myrcludex B, B) HBVpreS/2-21-yK (Genotyp J), C) HBVpreS/2-21-yK-G-LCA, D) HBVpreS/2-21 (T3K)-yK-LCA E) HBVpreS/2-21-yK-LCA-Triazol-LCA, F) HBVpreS/2-21-yK-CDCA-CDCA. Der betrachtete Konzentrationsbereich beträgt 300 - 0,015 nM, die Substanzen wurden in Triplikaten untersucht. 73
- Abbildung 3.17: Hämolytische Aktivität der Gallensäure-Peptid-Konjugate im Vergleich mit unkonjugiertem Peptid und Myrcludex B. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente mit drei verschiedenen freiwilligen Spendern in Triplikaten durchgeführt. 75

- Abbildung 3.18: Serumstabilitätsmessung von A) Myrcludex B, B) HBVpreS/2-21-yK und C) HBVpreS/2-21-yK-LCA in humanen AB-Serum. Es wurde jeweils ungefähr 1 MBq des  $^{125}\text{I}$ -markierten Peptids verwendet und Proben nach 0 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h entnommen. Bei HBVpreS/2-21-yK wurden zusätzlich Proben nach 10 min und 30 min entnommen. Nach Fällung der Serumproteine mit Acetonitril wurden die Überstände mittels Radio-HPLC analysiert. 79
- Abbildung 3.19: Szintigraphische Aufnahmen verschiedener Gallensäure-Peptid-Konjugate nach 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min und 24 h. Die Peptide wurden mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und in die Schwanzvene weiblicher SWISS-Mäuse appliziert. A) MyrB-y als Vergleichssubstanz, B) HBVpreS/2-21-yK, C) HBVpreS/2-21-yK-CA, D) HBVpreS/2-21-yK-UDCA, E) HBVpreS/2-21-yK-C<sub>12</sub>EtNH-LCA, F) HBVpreS/2-21-yK-LCA-LCA, G) HBVpreS/2-21-yK-LCA-NH-LCA. 81
- Abbildung 3.20: Szintigraphische Aufnahmen des cyclischen HBVpreS/2-21-yK-Peptids mit und ohne Konjugation einer Gallensäure nach 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min und 24 h. Die Peptide wurden mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und in die Schwanzvene weiblicher SWISS-Mäuse appliziert. A) cyclo-HBVpreS/2-21-yK, B) cyclo-HBVpreS/2-21-yK-UDCA. 83
- Abbildung 3.21: Vergleichende Darstellung szintigraphischer Aufnahmen nach intravenöser Applikation nach 10 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min und 24 h. Die Peptide wurden mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und in die Schwanzvene weiblicher SWISS-Mäuse appliziert. A) Myrcludex B als Vergleichssubstanz B) HBVpreS/2-21-yK-LCA, C) HBVpreS/2-21-yK-DCA und D) HBVpreS/2-21(T3K)-yK-LCA. 85
- Abbildung 3.22: Organverteilung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA bei intravenöser Applikation nach 2 h.  $^{125}\text{I}$ -markiertes Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA wurde jeweils drei SWISS-Mäusen intravenös in die Schwanzvene appliziert. Nach 2 h wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet, die Organe entnommen, gewogen und mit dem  $\gamma$ -Counter vermessen. 86
- Abbildung 3.23: Vergleichende Darstellung szintigraphischer Aufnahmen nach subkutaner Applikation nach 10 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min und 24 h. Die Peptide wurden mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und in die Nackenfalte weiblicher SWISS-Mäuse appliziert. A) Myrcludex B als Vergleichssubstanz, B) HBVpreS/2-21-yK-LCA und C) HBVpreS/2-21-yK-DCA. 87
- Abbildung 3.24: Organverteilung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA bei subkutaner Applikation nach 4 h.  $^{125}\text{I}$ -markiertes Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA wurde jeweils drei Mäusen subkutan in die Nackenfalte appliziert. Nach 4 h wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet, die Organe entnommen, gewogen und mit dem  $\gamma$ -Counter vermessen. 88
- Abbildung 3.25: Vergleichende Darstellung szintigraphischer Aufnahmen nach oraler Applikation nach 10 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min und 24 h. Die Peptide wurden mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und mittels Schlundsonde weiblichen SWISS-Mäusen oral verabreicht. A) Myrcludex B als Vergleichssubstanz, B) HBVpreS/2-21-yK-LCA und C) HBVpreS/2-21-yK-DCA. 89

- Abbildung 3.26: Organverteilung von Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA bei oraler Applikation nach 4 h. <sup>125</sup>I-markiertes Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK-LCA wurde jeweils drei Mäusen oral mittels Schlundsonde appliziert. Nach 4 h wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet, die Organe entnommen, gewogen und mit dem γ-Counter vermessen. 90
- Abbildung 3.27: Chromatogramme der Leberextrakte nach subkutaner Applikation der <sup>125</sup>I-markierten Substanzen 4 h nach Injektion im Vergleich mit der Ursprungssubstanz. A) <sup>125</sup>I-Myrcludex B, B) Leberextrakt <sup>125</sup>I-Myrcludex B, C) <sup>125</sup>I-HBVpreS/2-21-yK-LCA, D) Leberextrakt <sup>125</sup>I-HBVpreS/2-21-yK-LCA, E) <sup>125</sup>I-HBVpreS/2-21-yK-DCA, F) <sup>125</sup>I-Leberextrakt HBVpreS/2-21-yK-DCA. 91
- Abbildung 11.1: Isoelektrische Fokussierung von Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA. A) Darstellung IEF-Gradientengel 2 pH 3-9 mit Myrcludex B (D), HBVpreS/2-21-yK (C) und HBVpreS/2-21-yK-LCA (B). Zusätzlich wurde der IEF-Marker (A) aufgetragen. B) Darstellung der zu Gel 2 gehörenden Kalibriergeraden aus dem IEF-Marker zur Berechnung des pI der verschiedenen Substanzen. C) Darstellung IEF-Gradientengel 3 pH 3-9 mit Myrcludex B (D), HBVpreS/2-21-yK (C) und HBVpreS/2-21-yK-LCA (B). Zusätzlich wurde der IEF-Marker (A) aufgetragen. D) Darstellung der zu Gel 3 gehörenden Kalibriergeraden aus dem IEF-Marker zur Berechnung des pI der verschiedenen Substanzen. I
- Abbildung 11.2: Chromatogramm von <sup>125</sup>I-HBVpreS/2-21-yK als Vergleichssubstanz. II

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Übersicht der prozentualen Anteile viraler HBV Infektionen im Zusammenhang mit den verschiedenen Genotypen. Die zugrundeliegenden Daten wurden entnommen aus <sup>[20]</sup> .	3
Tabelle 1.2:	Zugelassene Therapeutika gegen HBV und HDV. Aufgelistet ist der jeweilige Wirkstoff mit Wirkstoffklasse und Wirkort, sowie die Angabe der Zulassung gegen HBV oder HDV.	10
Tabelle 3.1:	Liste der synthetisierten Peptide der verschiedenen Genotypen. Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide. Alle Positionen, an denen Sequenzunterschiede vorliegen sind in orange hervorgehoben. Die Fehlsequenz, mit Austausch von zwei Aminosäuren, ist rot hinterlegt.	25
Tabelle 3.2:	Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der verschiedenen Genotypen.	28
Tabelle 3.3:	Liste der synthetisierten Peptide mit verschiedenen Fettsäurelängen. Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide.	30
Tabelle 3.4:	Auflistung der IC <sub>50</sub> -Werte der HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit unterschiedlicher Länge der am C-Terminus konjugierten Fettsäure.	31
Tabelle 3.5:	Daten der Konjugation von UDCA an MyrB. Gezeigt wird das Molekulargewicht, das erwartete und gemessene Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz des Peptid-Konjugats.	33
Tabelle 3.6:	IC <sub>50</sub> -Wert von Myrcludex B und dem Myrcludex B Gallensäure-Konjugat MyrB-yK-UDCA.	33
Tabelle 3.7:	Liste der synthetisierten Peptide mit Gallensäuremonomeren. Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.	34
Tabelle 3.8:	Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der HBVpreS/2-21-yK-Peptide (consensus) mit unterschiedlicher monomerer Gallensäuremodifikation.	36
Tabelle 3.9:	Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der monomeren Gallensäuren UDCA und CA im Vergleich zu Myrcludex B und HBVpreS/2-21-yK.	38
Tabelle 3.10:	Liste der synthetisierten Peptide zur Betrachtung des Einflusses der Position von Myristinsäure und Gallensäure. Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.	40
Tabelle 3.11:	Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der Peptide mit verschiedenen Kombinationen der Konjugationsstelle von Myristinsäure und LCA.	41
Tabelle 3.12:	Liste der synthetisierten Peptide zur Untersuchung des Einflusses der Lysin-Konstitution an der Konjugationsstelle. Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.	42
Tabelle 3.13:	IC <sub>50</sub> -Werte der Peptide mit unterschiedlicher stereochemischer Konfiguration des Lysins zur Konjugation der Gallensäure.	44
Tabelle 3.14:	Liste der synthetisierten Gallensäurekonjugate mit verschiedenen Linkerbausteinen zwischen Peptid und Gallensäure. Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptid-Konjugate.	45

Tabelle 3.15:	Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der Peptide mit unterschiedlichen Linkern zwischen Peptid und Gallensäure.	47
Tabelle 3.16:	Liste der cyclischen HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit und ohne Gallensäuremodifikation. Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.	50
Tabelle 3.17:	Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der cyclischen HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit und ohne Gallensäuremodifikation.	51
Tabelle 3.18:	Liste der cyclischen HBVpreS/2-21-yK (consensus)-Peptide mit Variation der Konjugationsstelle der Gallensäure UDCA. Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.	51
Tabelle 3.19:	Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der verschiedenen cyclischen HBVpreS/2-21-Peptide mit Variation der Konjugationsstelle von UDCA.	53
Tabelle 3.20:	Liste der synthetisierten Peptide mit Modifikation durch verschiedene direkt Kopf-Schwanz verknüpfte Gallensäuredimere. Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.	55
Tabelle 3.21:	Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der HBVpreS/2-21-yK-Peptide (consensus) mit Konjugation verschiedener direkt Kopf-Schwanz verknüpfter Gallensäuredimere.	58
Tabelle 3.22:	Liste der synthetisierten Peptide mit Modifikation durch verschiedene über Linker verknüpfte Gallensäuredimere. Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.	60
Tabelle 3.23:	Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der HBVpreS/2-21-yK-Peptide (consensus) mit Modifikation durch verschiedene über Linker verknüpfte Gallensäuredimere.	63
Tabelle 3.24:	Liste der synthetisierten Peptide mit Modifikation durch verschiedene direkt verknüpfte gemischte Gallensäuredimere mit DCA als festen Baustein und Variation der zweiten Gallensäure. Gezeigt wird das Molekulargewicht, erwartetes und gemessenes Masse-zu-Ladung-Verhältnis und Sequenz der verschiedenen Peptide und Konjugate.	66
Tabelle 3.25:	Übersicht der IC <sub>50</sub> -Werte der HBVpreS/2-21-yK-Peptide (consensus) mit Konjugation verschiedener direkt Kopf-Schwanz verknüpfter gemischter Gallensäuredimere mit DCA als festen Baustein und Variation der zweiten Gallensäure.	67
Tabelle 3.26:	Nach OECD-Richtlinie experimentell bestimmte LogD-Werte bei pH 7,4 für Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA <sup>[187]</sup> . Das Experiment wurde sechsfach für Myrcludex B und jeweils vierfach für HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA durchgeführt. Der berechnete Fehler entspricht der Standardabweichung.	69
Tabelle 3.27:	Übersicht der Ergebnisse der CYP P450-Stabilität der linearen und cyclischen Peptide und Gallensäure-Peptid-Konjugate nach 1 h. Die untersuchten Substanzen wurden in 100 mM Natriumphosphat-Puffer mit gepoolten S9-Mikrosomen nach Herstellerangaben behandelt und anschließend mittels HPLC-MS auf Abbauprodukte untersucht.	77
Tabelle 5.1:	Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe.	98
Tabelle 5.2:	Übersicht der verwendeten Chemikalien mit Herstellerangabe.	99

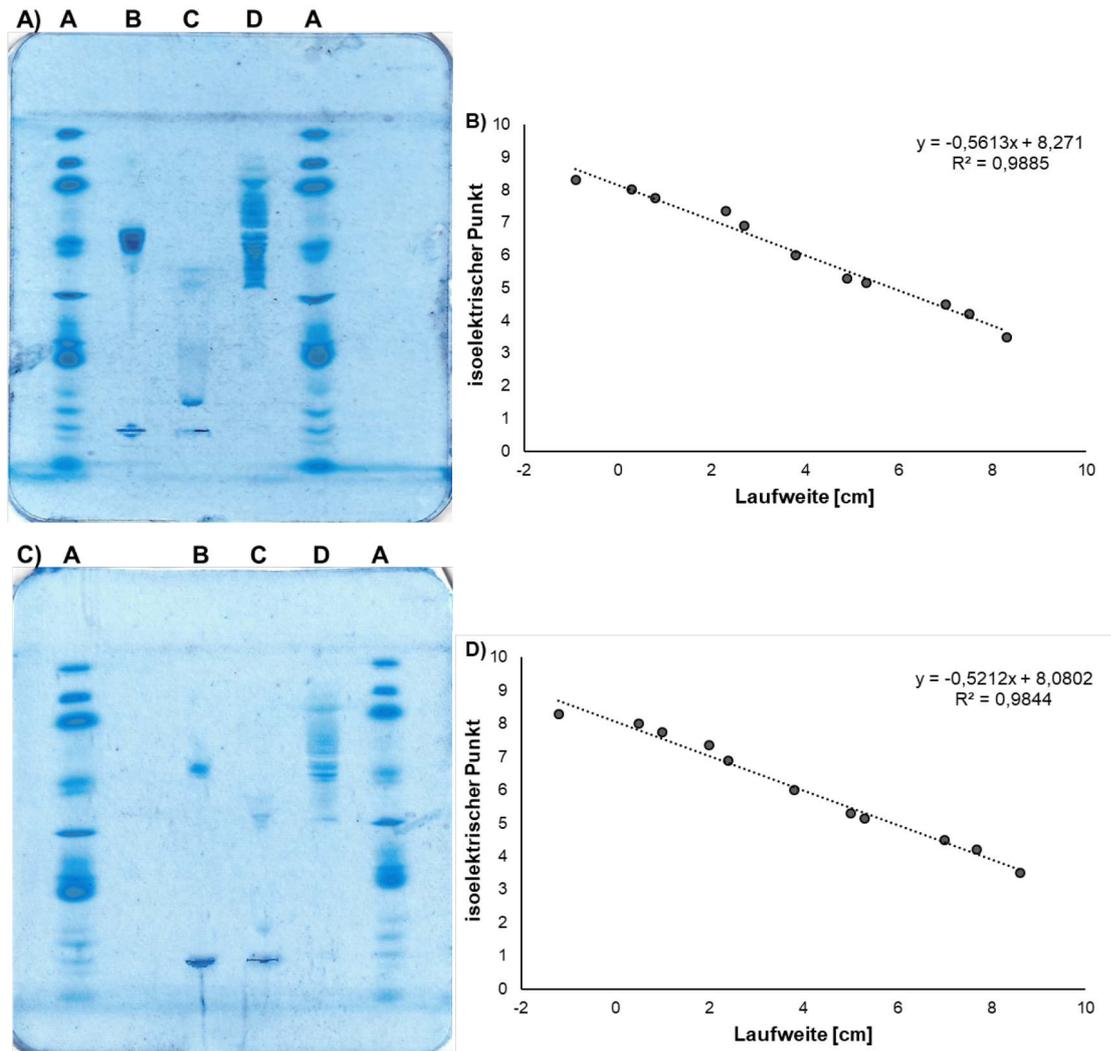
---

Tabelle 5.3:	Übersicht der verwendeten Geräte mit Modell und Hersteller.	102
Tabelle 5.4:	Übersicht der für Tierversuche verwendeten Tiere mit Herstellerangabe.	104
Tabelle 5.5:	Übersicht der verwendeten Software mit Anwendungsgebiet und Herstellerangabe.	104
Tabelle 5.6:	Zusammensetzung der Färbelösung "Blue Silver" nach Kang <i>et al.</i> .	123



## 11 Anhang

## 11.1 Isoelektrische Fokussierung



**Abbildung 11.1: Isoelektrische Fokussierung von Myrcludex B, HBVpreS/2-21-yK und HBVpreS/2-21-yK-LCA. A)** Darstellung IEF-Gradientengel 2 pH 3-9 mit Myrcludex B (D), HBVpreS/2-21-yK (C) und HBVpreS/2-21-yK-LCA (B). Zusätzlich wurde der IEF-Marker (A) aufgetragen. **B)** Darstellung der zu Gel 2 gehörenden Kalibriergeraden aus dem IEF-Marker zur Berechnung des pI der verschiedenen Substanzen. **C)** Darstellung IEF-Gradientengel 3 pH 3-9 mit Myrcludex B (D), HBVpreS/2-21-yK (C) und HBVpreS/2-21-yK-LCA (B). Zusätzlich wurde der IEF-Marker (A) aufgetragen. **D)** Darstellung der zu Gel 3 gehörenden Kalibriergeraden aus dem IEF-Marker zur Berechnung des pI der verschiedenen Substanzen.

## 11.2 *In vivo* Stabilität in der Leber

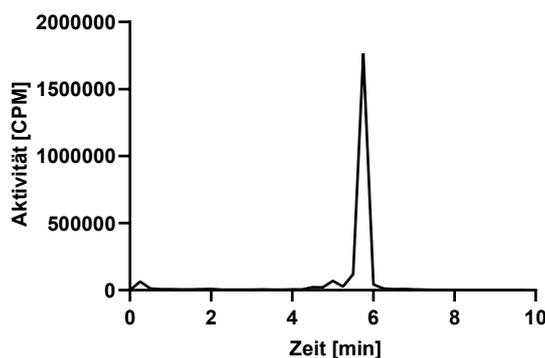


Abbildung 11.2: Chromatogramm von  $^{125}\text{I}$ -HBVpreS/2-21-yK als Vergleichssubstanz.

### 11.3 $3\alpha,7\beta$ -Dihydroxy- $5\beta$ -cholan-24-säurebenzylester

$$m/z_{\text{calc}} = 465,3363 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 465,3222 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$$

$^1\text{H-NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.36 - 7.33$  (m, 5H), 5.11 - 5.10 (d, 2H), 3.60 - 3.55 (m, 2H), 2.44 - 2.24 (m, 1H), 1.83 - 1.01 (m, 25H), 0.94 (s, 3H), 0.92 - 0.90 (d, 3H), 0.65 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 174.17, 136.23, 128.67, 128.37, 128.31, 71.58, 71.50, 66.25, 55.84, 55.04, 43.91, 43.89, 42.57, 40.26, 39.31, 37.44, 36.97, 35.34, 35.07, 34.21, 31.43, 31.13, 30.48, 28.72, 27.02, 23.52, 21.30, 18.50, 12.25$  ppm.

### 11.4 $3\alpha,12\alpha$ -Dihydroxy- $5\beta$ -cholan-24-säurebenzylester

$$m/z_{\text{calc}} = 505,3288 [\text{M}+\text{Na}]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 505,3247 [\text{M}+\text{Na}]^+$$

$^1\text{H-NMR}$ : (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.38 - 7.33$  (m, 5H), 5.15 - 5.09 (m, 2H), 3.98 - 3.97 (t, 1H), 3.64 - 3.60 (m, 1H), 2.46 - 2.27 (m, 2H), 1.89 - 1.01 (m, 24H), 0.98 - 0.96 (d, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.66 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 174.16, 136.25, 128.67, 128.37, 128.31, 73.28, 71.96, 66.25, 48.41, 47.49, 46.64, 42.22, 36.59, 36.18, 35.35, 35.18, 34.26, 33.81, 31.46, 31.02, 30.65, 28.81, 27.57, 27.26, 26.26, 23.77, 23.30, 17.44, 12.87$  ppm.

### 11.5 $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- $5\beta$ -cholan-24-säurebenzylester

$$m/z_{\text{calc}} = 505,3288 [\text{M}+\text{Na}]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 505,3253 [\text{M}+\text{Na}]^+$$

$^1\text{H-NMR}$ : (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.37 - 7.32$  (m, 5H), 5.11 - 5.10 (d, 2H), 3.85 - 3.83 (m, 1H), 3.49 - 3.43 (m, 1H), 2.43 - 0.94 (m, 26H), 0.92 - 0.91 (d, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.63 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 174.21, 136.25, 128.67, 128.36, 128.30, 72.15, 68.67, 66.24, 55.92, 50.59, 42.83, 41.61, 40.03, 39.75, 39.56, 35.46, 35.45, 35.18, 34.73, 32.96, 31.38, 31.09, 30.81, 28.28, 23.85, 22.92, 20.71, 18.39, 11.90$  ppm.

**11.6 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester**

$$m/z_{\text{calc}} = 499,3418 [M+H]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 499,3268 [M+H]^+$$

$^1\text{H-NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.36 - 7.33 (m, 5H), 5.11 - 5.10 (d, (2H), 3.95 (s, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.48 - 3.40 (m, 1H), 2.47 - 1.24 (m, 24H), 0.98 - 0.96 (d, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.65 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 174.24, 136.24, 128.66, 128.35, 128.29, 73.16, 72.04, 68.58, 66.24, 47.21, 46.59, 41.88, 41.59, 39.71, 39.65, 35.39, 35.31, 34.87, 34.77, 31.45, 31.02, 30.57, 28.34, 27.60, 26.59, 23.34, 22.62, 17.44, 12.62 ppm.

**11.7 3 $\alpha$ -(2-Mesyloxy)-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester**

$$m/z_{\text{calc}} = 611,3377 [M+Na]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 611,3497 [M+Na]^+$$

**11.8 Propargyl-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oat**

$$m/z_{\text{calc}} = 430,3316 [M+H]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 430,3196[M+H]^+$$

**11.9 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(7 $\beta$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester**

$$m/z_{\text{calc}} = 857,6289 [M+H]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 857,6028 [M+H]^+$$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.36 - 7.35 (m, 5H), 5.13 - 5.08 (d, 2H), 4.69 - 4.65 (m, 1H), 3.59 - 3.56 (m, 3H), 2.43 - 1.01 (m, 52H), 0.95 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.93 - 0.92 (d, 3H), 0.92 - 0.91 (d, 3H), 0.67 (s, 3H), 0.65 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 174.17, 173.87, 136.23, 128.67, 128.36, 128.31, 73.68, 71.58, 71.52, 71.50, 71.40, 66.25, 55.90, 55.84, 55.09, 55.05, 55.01, 43.92, 43.91, 43.89, 43.88, 42.58, 42.42, 40.26, 39.31, 37.45, 36.98, 35.33, 35.08, 34.79, 34.25, 34.22, 34.10, 33.38, 31.74, 31.43, 31.20, 31.13, 30.48, 28.75, 28.72, 27.02, 26.68, 25.76, 25.08, 23.52, 23.49, 21.34, 21.31, 18.55, 18.50, 12.30, 12.25 ppm.

**11.10 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester**

$$m/z_{\text{calc}} = 857,6289 [M+H]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 857,2893 [M+H]^+$$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.36 - 7.31 (m, 5H), 5.11 - 5.10 (d, 2H), 4.61 - 4.54 (m, 1H), 3.51 - 3.43 (m, 2H), 3.21 - 3.16 (m, 1H), 2.40 - 1.07 (m, 52 H), 0.92 (s, 3H), 0.91 (s, 6H), 0.90 (s, 3H), 0.65 (s, 3H), 0.63 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 174.20, 174.08, 136.23, 128.66, 128.34, 128.29, 72.13, 68.64, 66.23, 55.90, 50.58, 50.57, 49.24, 42.83, 42.82, 41.60, 41.35, 39.74, 39.57, 39.54, 39.50, 35.48, 35.45, 35.21, 35.17, 35.15, 34.72, 34.10, 32.95, 32.92, 31.39, 31.37, 31.16, 31.08, 30.81, 30.80, 28.29, 28.27, 25.76, 25.58, 25.09, 24.83, 23.84, 22.91, 22.88, 20.70, 18.44, 18.38, 11.90, 11.89 ppm.

**11.11 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(7 $\beta$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester** $m/z_{\text{calc}} = 911,6007 [M+Na]^+$  $m/z_{\text{obs}} = 911,5734 [M+Na]^+$ **11.12 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester** $m/z_{\text{calc}} = 857,6289 [M+H]^+$  $m/z_{\text{obs}} = 857,6220 [M+H]^+$ 

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.36 - 7.26$  (m, 5H), 5.11 - 5.10 (d, 2H), 4.73 - 4.67 (m, 1H), 3.97 (m, 3OH), 3.62 - 3.58 (m, 2H), 3.50 - 3.45 (m, 1H), 2.46 - 1.30 (m, 52H), 1.27 - 1.24 (t, 6H), 0.91 - 0.90 (d, 6H), 0.67 (s, 3H), 0.64 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 174.15, 173.93, 136.22, 128.66, 128.36, 128.30, 74.12, 73.26, 71.92, 66.23, 60.53, 48.42, 48.38, 47.52, 47.45, 46.65, 46.01, 42.20, 41.97, 36.56, 36.33, 36.18, 36.15, 36.09, 35.20, 35.17, 34.25, 34.09, 33.78, 31.44, 31.00, 30.62, 32.34, 31.90, 28.79, 28.76, 27.59, 27.55, 27.27, 27.25, 26.27, 26.25, 25.76, 25.08, 23.78, 23.76, 23.29, 23.26, 17.42, 14.33, 12.91, 12.86$  ppm.

**11.13 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester** $m/z_{\text{calc}} = 841,6340 [M+H]^+$  $m/z_{\text{obs}} = 841,6253 [M+H]^+$ 

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.36 - 7.34$  (m, 5H), 5.14 - 5.08 (m, 2H), 2.45 - 0.96 (m, 59H), 0.91 (s, 9H), 0.65-0.64 (d, 6H), 0.07 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 174.14, 174.04, 136.24, 128.68, 128.37, 128.32, 74.09, 73.29, 72.04, 66.26, 56.64, 56.12, 48.45, 47.56, 46.65, 42.90, 42.25, 42.01, 40.58, 40.31, 36.61, 36.13, 36.02, 35.50, 35.48, 35.17, 35.04, 34.72, 34.28, 33.81, 32.38, 31.88, 31.47, 31.21, 31.03, 30.70, 28.87, 27.56, 27.36, 27.11, 26.71, 26.58, 26.15, 24.37, 23.74, 23.52, 23.28, 20.97, 18.45, 17.47, 12.88, 12.22$  ppm.

**11.14 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester** $m/z_{\text{calc}} = 857,6289 [M+H]^+$  $m/z_{\text{obs}} = 857,6216 [M+H]^+$ 

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.36 - 7.32$  (m, 5H), 5.11 - 5.10 (d, 2H), 4.73 - 4.65 (m, 1H), 3.61 - 3.58 (m, 1H), 2.44 - 1.02 (m, 57H), 0.96 - 0.94 (m, 6H), 0.93 - 0.90 (m, 6H), 0.68 (s, 3H), 0.64 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 174.15, 173.91, 136.24, 128.66, 128.35, 128.30, 73.26, 71.94, 71.52, 66.23, 56.86, 56.06, 48.39, 47.47, 46.63, 43.92, 42.59, 42.21, 42.00, 40.25, 39.30, 37.46, 36.99, 36.57, 36.17, 35.35, 35.08, 34.29, 34.25, 34.08, 33.80, 31.45, 31.01, 30.63, 28.80, 28.73, 27.55, 27.26, 26.25, 25.75, 25.07, 23.76, 23.52, 23.29, 21.32, 18.57, 17.43, 12.86, 12.36, 12.29$  ppm.

**11.15 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester**

$m/z_{\text{calc}} = 857,6289$  [M+H]<sup>+</sup>

$m/z_{\text{obs}} = 857,2897$  [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.36 - 7.34$  (m, 5H), 5.11 - 5.10 (d, 2H), 4.73 - 4.67 (m, 1H), 4.14 - 4.09 (dd, 2H), 3.97 - 3.96 (m, 1OH), 3.84 (m, 1OH), 3.63 - 3.58 (m, 1H), 3.48 - 3.43 (m, 1OH), 2.44 - 1.30 (m, 52H), 1.27 - 1.24 (t, 6H), 0.91 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.65 - 0.64 (t, 6H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 174.16, 173.98, 136.22, 128.66, 128.35, 128.30, 73.25, 72.15, 71.94, 68.65, 66.23, 56.93, 50.58, 48.38, 47.45, 46.61, 42.82, 42.19, 41.97, 36.54, 36.15, 35.33, 35.16, 34.25, 34.24, 33.78, 32.95, 31.43, 30.99, 30.61, 28.85, 28.79, 28.30, 27.55, 27.25, 27.08, 26.25, 26.09, 25.62, 23.76, 23.72, 23.29, 22.91, 18.42, 17.44, 17.42, 14.33, 12.86, 11.94$  ppm.

**11.16 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(cholan-24-säurebenzylester)-3-yl-1h-1,2,3-triazol**

$m/z_{\text{calc}} = 1148,6682$  [M+H+2TFA]<sup>+</sup>

$m/z_{\text{obs}} = 1147,7349$  [M+H+2TFA]<sup>+</sup>

**11.17 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(12 $\alpha$ -hydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3-ylester**

$m/z_{\text{calc}} = 873,6239$  [M+H]<sup>+</sup>

$m/z_{\text{obs}} = 873,6156$  [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.36 - 7.32$  (m, 5H), 5.11 - 5.10 (d, 2H), 4.74 - 4.67 (m, 1H), 3.50 - 3.42 (m, 1H), 2.44 - 1.09 (m, 57H), 0.98 - 0.95 (t, 6H), 0.91 (s, 3H), 0.89 - 0.88 (t, 3H), 0.68 (s, 3H), 0.65 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 174.17, 174.01, 136.23, 128.68, 128.37, 128.32, 74.17, 73.26, 73.12, 72.11, 68.56, 66.20, 49.34, 48.44, 47.53, 47.25, 46.64, 42.00, 41.62, 39.37, 36.11, 35.40, 35.29, 35.18, 35.03, 34.84, 34.27, 34.07, 33.79, 32.35, 31.86, 31.47, 31.10, 31.03, 30.65, 29.84, 28.85, 28.39, 27.57, 27.10, 26.69, 26.15, 25.75, 25.07, 23.74, 23.35, 23.27, 22.66, 17.52, 17.46, 12.87, 12.70$  ppm.

**11.18 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säure(cholan-24-säure)-3-ylamid**

$m/z_{\text{calc}} = 856,6449$  [M+H]<sup>+</sup>

$m/z_{\text{obs}} = 857,6031$  [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 3.15 - 3.06$  (m, 1H), 2.40 - 1.00 (m, 55H), 0.93 - 0.92 (d, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.67 - 0.65 (d, 3H), 0.63 (s, 3H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 179.16, 178.69, 73.29, 72.06, 68.64, 56.73, 56.12, 54.53, 46.53, 46.50, 45.66, 43.86, 42.89, 42.71, 41.77, 41.59, 40.96, 40.64, 40.40, 40.10, 37.92, 37.72, 37.16, 36.01, 35.73, 35.50, 35.49, 34.86, 34.13, 33.64, 33.42, 31.29, 31.07, 28.33, 27.64, 27.38, 27.16, 26.68, 24.36, 22.54, 21.47, 20.95, 18.41, 18.40, 17.40, 12.54, 12.19, 12.13$  ppm.

**11.19 Bis(7 $\beta$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-säurebenzylester)-3 $\alpha$ -yloxalat**

$$m/z_{\text{calc}} = 1019,6606 [M+H]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 1019,6273 [M+H]^+$$

**11.20 Bis(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-cholan-24-säurebenzylester)-3 $\alpha$ -yloxalat**

$$m/z_{\text{calc}} = 997,6188 [M+H-3H_2O]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 997,4820 [M+H-3H_2O]^+$$

**11.21 Bis(7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -Cholan-24-säurebenzylester)-3 $\alpha$ -ylsuccinat**

$$m/z_{\text{calc}} = 1080,6818 [M+H]^+$$

$$m/z_{\text{obs}} = 1081,6608 [M+H]^+$$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.36 - 7.31 (m, 10H), 5.11 - 5.10 (d, 4H), 4.61 - 4.53 (m, 2H), 2.95 (s, 2H), 2.88 (s, 2H), 2.42 - 2.17 (m, 6H), 1.99 (s, 4H), 1.95 - 1.32 (m, 46H), 0.98 - 0.96 (d, 6H), 0.90 (s, 6H), 0.66 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 174.15, 174.11, 136.21, 128.66, 128.35, 128.30, 74.44, 73.02, 68.39, 66.25, 47.36, 46.66, 42.11, 41.30, 39.66, 35.31, 35.23, 34.81, 34.49, 31.43, 30.98, 29.83, 28.46, 27.54, 26.76, 23.28, 22.65, 21.60, 17.46, 12.66 ppm.