

- [8] M. A. Casado, M. A. Ciriano, A. J. Edwards, F. J. Lahoz, L. A. Oro, J. J. Pérez-Torrente, *Organometallics* **1999**, *18*, 3025–3034.
- [9] a) A. A. Pasynskii, I. L. Eremenko, B. Orazsakhatov, V. T. Kalinnikov, G. G. Aleksandrov, Y. T. Struchkov, *J. Organomet. Chem.* **1981**, *216*, 211–221; b) S. Harris, *Polyhedron* **1989**, *8*, 2843–2882.
- [10] E. J. Houser, A. Venturelli, T. B. Rauchfuss, S. R. Wilson, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 6402–6408.
- [11] A. Venturelli, T. B. Rauchfuss, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4824–4831.
- [12] Wir haben durch eine Röntgenstrukturanalyse bestätigt, dass die Struktur des kationischen Teils von **6b**·0.5MeCN·0.5Et₂O im wesentlichen identisch mit der von **6a**·HCl·H₂O·MeCN ist: S. Kabashima, S. Kuwata, M. Hidai, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [13] a) K. D. Demadis, C. F. Campana, D. Coucounasis, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7832–7833; b) C. Goh, B. M. Segal, J. Huang, J. R. Long, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11844–11853; c) H. R. Hoveyda, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 4571–4578.
- [14] a) T. Saito, H. Imoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 2403–2417; b) R. D. Adams, *Polyhedron* **1985**, *4*, 2003–2025.
- [15] a) Y. Deng, Q. Liu, C. Chen, Y. Wang, Y. Cai, D. Wu, B. Kang, D. Liao, J. Cui, *Polyhedron* **1997**, *16*, 4121–4128; b) F. M. Hornung, K. W. Klinkhammer, W. Kaim, *Chem. Commun.* **1998**, 2055–2056.
- [16] a) T. Shibahara, *Coord. Chem. Rev.* **1993**, *123*, 73–147; b) R. H. Holm, *Adv. Inorg. Chem.* **1992**, *38*, 1–71; c) N. Miyake, H. Imoto, T. Saito, *Chem. Lett.* **1997**, 631–632.

Pseudoproline: Induktion einer biologisch relevanten *cis*-Peptidbindung in Mimetika der V3-Schleife des HIV-1-Proteins gp120**

Angela Wittelsberger, Michael Keller, Leo Scarpellino, Luc Patiny, Hans Acha-Orbea und Manfred Mutter*

Pseudoproline (Ψ Pro) sind synthetische Prolin-Analoga, die in einer direkten Cyclokondensationsreaktion aus den Aminosäuren Cystein, Threonin oder Serin mit Aldehyden oder Ketonen hergestellt werden können.^[1] Ihrer ersten Verwendung als sekundärstrukturbrechende, löslichkeitsvermittelnde Schutzgruppen in der Peptidsynthese^[2, 3] folgten Untersuchungen zur *cis/trans*-Isomerisierung Ψ Pro-haltiger Peptidbindungen.^[4, 5] Dabei zeigte sich, dass durch Einführung unterschiedlicher Substituenten am C2-Atom von Ψ Pro der in der *cis*-Konformation vorliegende Anteil der Xaa_{i-1}– Ψ Pro_i-Peptidbindung in weiten Grenzen variiert werden

[*] Prof. Dr. M. Mutter, Dipl.-Chem. A. Wittelsberger, Dr. M. Keller, Dr. L. Patiny Institute of Organic Chemistry, University of Lausanne, BCH-Dorigny, 1015 Lausanne (Schweiz)
Fax: (+41)21-692-39-55
E-mail: Manfred.Mutter@ico.unil.ch

L. Scarpellino, Prof. Dr. H. Acha-Orbea Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne Branch and Institute of Biochemistry, University of Lausanne ISREC Ch. des Boveresses 155, 1066 Epalinges (Schweiz)

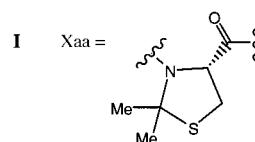
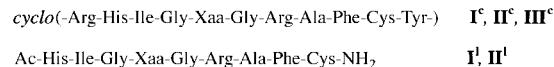
[**] Wir danken Dipl.-Biol. Raymond Jacquet für hilfreiche Diskussionen. Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

kann. Insbesondere die C2-dimethylierten Thiazolidin- und Oxazolidinderivate induzieren in Di- und Tripeptiden bis zu 100 % *cis*-Konformation.^[4, 5] Wir stellen hier das erste Beispiel dieser Pseudoprolin-Klasse als Mimetika biologisch relevanter *cis*-Prolyl-Konformationen vor.

Als Zielmolekül für die Einführung eines *cis*-induzierenden Pseudoprolin-Bausteins bietet sich die V3-Schleife aus dem gp120-Oberflächenprotein des Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) an. V3 war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, seitdem gezeigt wurde, dass die Schleife das bedeutendste HIV-1-neutralisierende Epitop enthält.^[6–8] Ihre auf die Erkennung zwischen gp120 und dem Zelloberflächenrezeptor CD4 folgende proteolytische Spaltung wurde als ein wichtiges Ereignis des Infektionsprozesses postuliert.^[9, 10] Im exponierten Teil der V3-Schleife befindet sich das allgemein vorkommende Tetrapeptidmotiv Gly-Pro-Gly-Arg, das einen β -Turn vom Typ II bildet.^[11] Als notwendiger Schritt für die Spaltung und die daraus hervorgehende Fusion wurde von Johnson et al. eine Isomerisierung zu einem β -Turn vom Typ VI mit einer *cis*-Prolin-Peptidbindung vorgeschlagen.^[12] Weitere Hinweise auf konformative Änderungen, die der Infektion vorangehen, wurden kürzlich veröffentlicht,^[13, 14] und eine β -Turn-Konformation vom Typ VI wurde in einem von der HIV-1_{III}-V3-Schleife abgeleiteten Peptid im Komplex mit einem Anti-gp120-Antikörper gefunden.^[15] Zur Untersuchung der vorgeschlagenen Infektions-aktiven *cis*-Konformation stellen wir hier die Synthese von Pseudoprolin enthaltenden V3-Analoga und deren Verwendung als Immunogene vor.

Als Basis für die Mimetika wurde das cyclische Undecamer *cyclo*(-Arg-His-Ile-Gly-Xaa-Gly-Arg-Ala-Phe-Cys-Tyr-) mit einer von der HIV-1_{MN}-V3-Variante abgeleiteten Sequenz gewählt, die das Tetrapeptidmotiv Gly-Pro-Gly-Arg enthält (Abbildung 1). Ein Cysteinrest dient als nützliche Kupplungs-



II Xaa = Pro

III Xaa = Aib (α -Aminoisobuttersäure)

Abbildung 1. Sequenzen der cyclischen (**I^c**, **II^c**, **III^c**) und linearen Peptide (**I^l**, **II^l**).

stelle für die immunologischen Studien. Es wurden drei cyclische V3-Peptide synthetisiert: ein konformativ eingeschränktes Pseudoprolin enthaltendes V3-Analogon (**I^c**, Xaa = Cys(Ψ ^{Me,Me}Pro)), ein die native Sequenz enthaltendes Peptid (**II^c**, Xaa = Pro) und ein α -Aminoisobuttersäure (Aib) enthaltendes Analogon (**III^c**, Xaa = Aib). Zur Ermittlung des Einflusses der cyclischen Struktur auf die immunologischen Eigenschaften der Peptide wurden weiterhin die entsprechenden linearen Peptide **I^l** und **II^l** synthetisiert (Abbildung 1). In Abbildung 2 sind die *cis*-Gly- Ψ Pro- und die

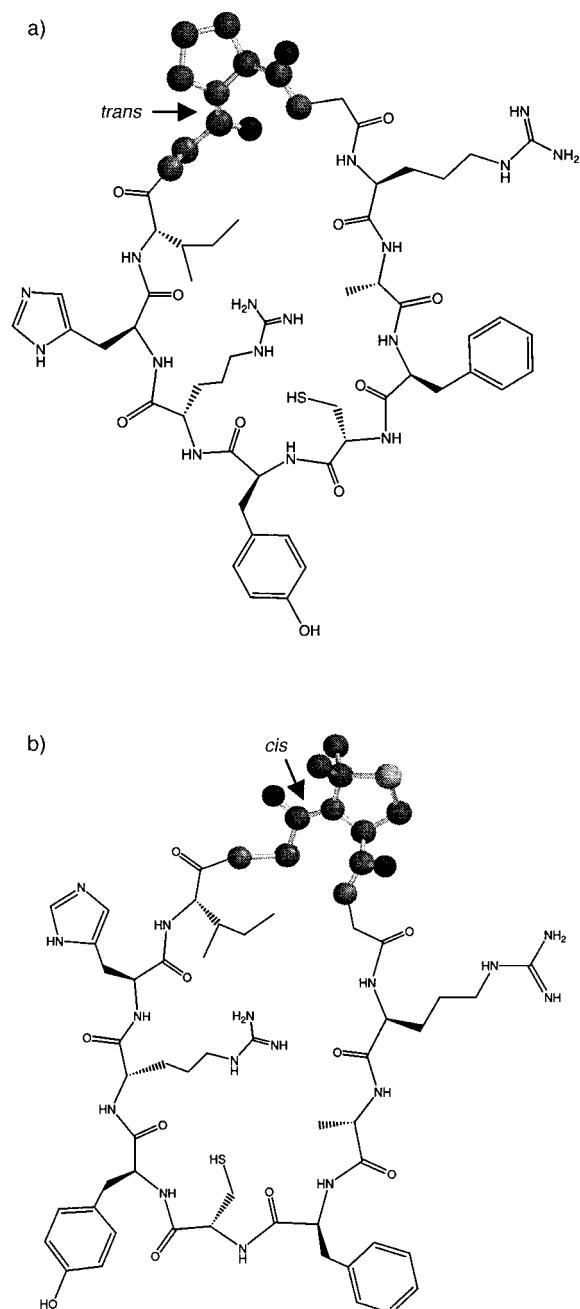


Abbildung 2. Modell der durch Einbau eines Pseudoprolins induzierten Konformationsänderung. a) Bereich Gly-Pro im Peptid II^c mit einer *trans*-Peptidbindung. b) Bereich Gly-Cys($\Psi^{Me,Me}$ pro) im Peptid I^c mit einer *cis*-Peptidbindung.

trans-Gly-Pro-Peptidbindungen der Peptide I^c bzw. II^c dargestellt.

Die Peptide I–III wurden durch Festphasensynthese erhalten^[16] und massenspektrometrisch sowie NMR-spektroskopisch charakterisiert. 2D-¹H-NMR-TOCSY-, -COSY-DQF- und -ROESY-Daten ermöglichten eine komplete Zuordnung der Protonensignale für die Peptide I und II. Für das cyclische Ψ Pro-enthaltende Peptid I^c wurden drei Konformere nachgewiesen, deren Verhältnis durch Integration des β -Methylsignals von Ile zu 80:10:10 bestimmt wurde. Das Hauptkonformer weist im ROESY-Spektrum das typische Muster einer *cis*-Imidbindung zwischen Gly_{i-1} und

Cys_i($\Psi^{Me,Me}$ pro) auf, d.h. α H_{i-1}- α H_i- und α H'_{i-1}- α H_i-Kreuzsignale. Der entsprechende Spektrenbereich ist in Abbildung 3 a dargestellt. Für eines der Nebenkonforme wurde die korrespondierende *trans*-Form mit einer *trans*-Peptidbindung zwischen Gly_{i-1} und Cys_i($\Psi^{Me,Me}$ pro) erwartet, jedoch

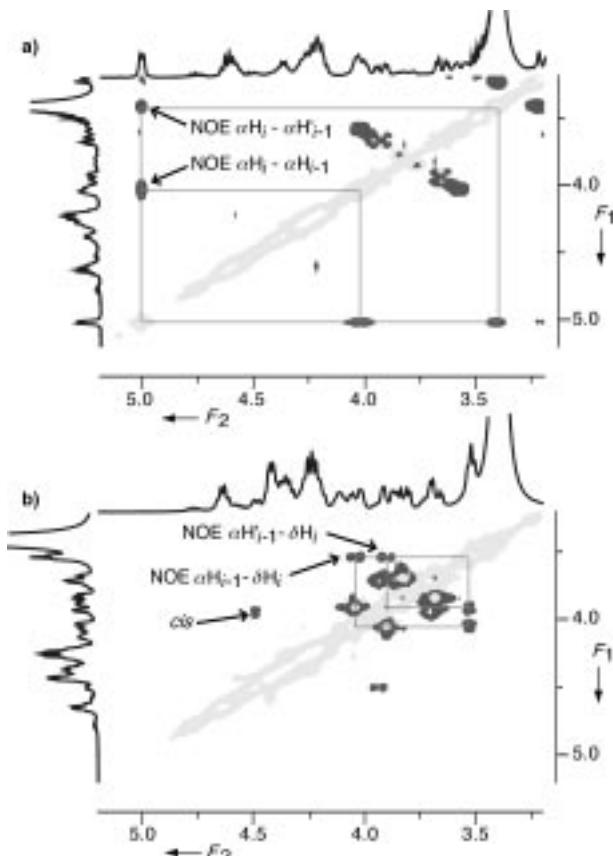


Abbildung 3. Ausschnitt aus den 2D-¹H-NMR-ROESY-Spektren der V3-Schleifen-Analoga in $[D_6]DMSO$ bei 305 K (400 MHz, $\tau_m = 200$ ms). a) Ψ Pro-Peptid I^c mit NOE-Kreuzsignalen α H_i- α H_{i-1} und α H_i'- α H_{i-1}' zwischen Gly_{i-1} und Cys($\Psi^{Me,Me}$ pro). b) Pro-enthaltendes Peptid II^c mit NOE-Kreuzsignalen α H_{i-1}- δ H_i und α H_{i-1}'- δ H_i zwischen Gly_{i-1} und Pro_i.

könnten die charakteristischen NOE-Konnektivitäten α H_{i-1}- δ H_i und α H_{i-1}'- δ H_i wegen der geminalen Methylgruppen in der δ -Position nicht beobachtet werden. Die Spektren des cyclischen Pro-enthaltenden Peptids II^c zeigten das Vorhandensein von drei Konformeren im Verhältnis 80:15:5. In diesem Fall konnte im Hauptkonformer die Gly-Pro-Peptidbindung durch die charakteristischen NOE-Konnektivitäten α H_{i-1}- δ H_i und α H_{i-1}'- δ H_i zwischen Gly_{i-1} und Pro_i als *trans*-konfiguriert identifiziert werden (Abbildung 3 b). Außerdem wurde ein Satz von Nebensignalen dem entsprechenden *cis*-Konformer zugeordnet, das die Kreuzsignale α H_{i-1}- α H_i und α H_{i-1}'- α H_i zwischen Gly_{i-1} und Pro_i lieferte (ebenfalls in Abbildung 3 b zu erkennen), ein Hinweis auf die erhöhte Neigung von Prolin zum Eingehen von Xaa_{i-1}-Pro_i-*cis*-Peptidbindungen. Im Falle des Aib-enthaltenden Peptids III^c war die komplete Zuordnung der Protonensignale wegen der großen konformativen Beweglichkeit des Peptids und der daraus resultierenden undefinierten Spektren nicht möglich. Die NMR-Spektren des linearen Peptids I^l zeigten interes-

santerweise eine einzige Konformation mit einer dem Pseudoprolin vorangehenden *cis*-Imidbindung, während für das lineare Peptid **II^c** zwei Gly-Pro-Konformationen im Verhältnis 30:70 (*cis:trans*) beobachtet wurden.

Die Peptide **I^c** und **II^c** wurden als Haptene zur Herstellung von Antikörpern verwendet und dazu über 3-(*N*-Maleimido)-propionsäurehydroxysuccinimidester an das Trägerprotein BSA (bovine serum albumin) gekuppelt. Anschließend wurden Balb/c-Mäuse gemäß Standardvorschriften^[17] mit den Biokonjugaten immunisiert und die erhaltenen Antisera gegen die kovalent an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gekoppelten Haptene mit einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) getestet. In Abbildung 4 ist die Wirkung beider Antisera in verschiedenen Verdünnungen gegen

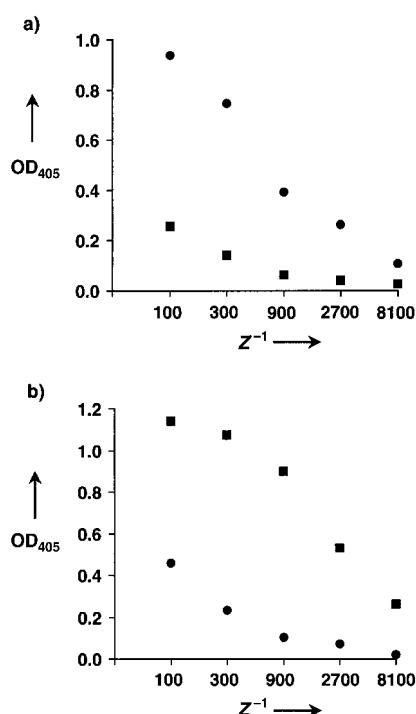


Abbildung 4. Ergebnisse der ELISAs mit den Sera von Mäusen, die mit dem γ Pro-enthaltendem Peptid **I^c** (●) oder mit dem Pro-enthaltendem Peptid **II^c** (■) immunisiert wurden. a) Oberflächenantigen **I^c** ($c = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$). b) Oberflächenantigen **II^c** ($c = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Z = Verdünnungsfaktor des Serums; OD_{405} = optische Dichte bei 405 nm.

jedes Hapten dargestellt. In beiden Fällen zeigen die polyclonalen Antikörper eine hohe Erkennung gegenüber dem homologen immobilisierten Hapten, dagegen nicht gegenüber dem fremden V3-Peptid. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden kompetitive Tests ausgeführt, in denen die Sera mit den Peptiden **I^c** oder **II^c** 30 Minuten präinkubiert und anschließend mit dem auf der Oberfläche immobilisierten Hapten in Kontakt gebracht wurden. Die Ergebnisse mit Oberflächenantigen **I^c** sind in Abbildung 5 dargestellt. Sie zeigen eine Inhibition der antigenen Reaktion mit steigender Konzentration des kompetitiven Peptids **I^c** im Vergleich zu einem wesentlich geringeren Einfluss von **II^c** und bestätigen damit die hohe Selektivität der Antikörper bei der Unterscheidung zwischen dem konformativ eingeschränkten *cis*-Peptid und dem natürlichen Peptid.

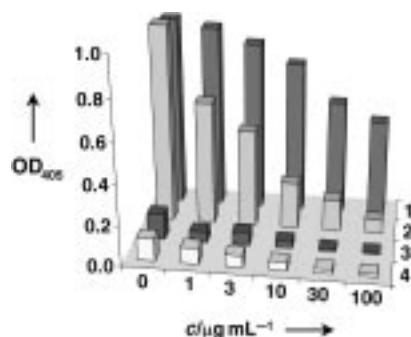


Abbildung 5. Die Ergebnisse der kompetitiven ELISAs demonstrieren eine Inhibition der antigenen Reaktion mit zunehmender Konzentration an Peptid **I^c**. Das kompetitive Peptid **II^c** inhibiert die antigenen Reaktion deutlich weniger. Das Oberflächenantigen **I^c** wurde bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ immobilisiert. 1: Anti-**I^c**-Serum + Peptid **II^c**; 2: Anti-**I^c**-Serum + Peptid **I^c**; 3: Anti-**II^c**-Serum + Peptid **II^c**; 4: Anti-**II^c**-Serum + Peptid **I^c**; c = Konzentration des kompetitiven Peptids.

Zur Produktion von monoklonalen Antikörpern (mAbs) wurden Milzellen der immunisierten Tiere mit Myelomzellen einer Ag8-Linie fusioniert,^[17, 18] die entstehenden Hybridomzellen gewünschter Antikörperaktivität propagierte, kloniert und die monoklonalen Antikörper gereinigt. Monoklonale Antikörper gegen **I^c** und **II^c** wurden auf ihre Erkennung der cyclischen und linearen Peptide getestet. Die Ergebnisse bestätigen in beiden Fällen die mit den polyklonalen Sera erhaltenen Resultate, d.h., beide Antikörper erkennen spezifisch ihr homologes Antigen. Wie in Abbildung 6 gezeigt ist, erkennt mAb γ Pro238.13, der gegen das cyclische γ Pro-enthaltende Peptid **I^c** selektiviert wurde, das Pro-enthaltende Peptid **II^c** zu 15 %, in Übereinstimmung mit dem durch

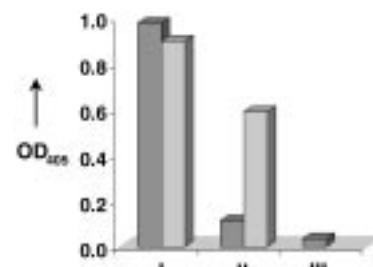


Abbildung 6. Bindung des gegen **I^c** produzierten monoklonalen Antikörpers mAb γ Pro238.13 an die cyclischen (c, dunkle Balken) und die linearen Peptide (l, helle Balken). I: γ Pro-enthaltende Peptid **I^c** und **I'**; II: Pro-enthaltende Peptid **II^c** und **II'**; III: Aib-enthaltendes Peptid **III^c**.

NMR-Studien bestimmten *cis*-Gehalt in **II^c**. Als weiterer Hinweis auf einen *cis*-gerichteten Antikörper wird das Aib-enthaltende Referenzpeptid **III^c**, das wie das C2-dimethyl-substituierte γ Pro zwei geminale Methylgruppen enthält, nicht erkannt (Abbildung 6). Weiterhin bindet der gegen das cyclische *cis*-enthaltende Peptid **I^c** produzierte Antikörper ebenso stark das entsprechende lineare Peptid **I**. In Anbetracht der substantiellen Unterschiede zwischen cyclischen und linearen Peptiden hinsichtlich konformativer Beweglichkeit und Gesamtform deutet die Erkennung beider Spezies durch mAb γ Pro238.13 deutlich auf die gemeinsame *cis*-Imidbindung als antigene Determinante hin. Diese Beobach-

tung wird außerdem durch eine partielle Erkennung des linearen Pro-enthaltenden Peptids **II^f** untermauert, was nur durch eine durch den *cis*-gerichteten Antikörper induzierte *trans*→*cis*-Isomerisierung der Gly-Pro-Bindung im flexiblen Peptid **II^e** erklärt werden kann. Dagegen tritt in dem konformativ eingeschränkten cyclischen Peptid **I^e** diese *trans*→*cis*-Isomerisierung nur zu einem wesentlich geringeren Ausmaß auf, was in einer entsprechend reduzierten Erkennung durch den *cis*-gerichteten Antikörper resultiert. Diese Unterschiede in der Bindung des monoklonalen Antikörpers anti-**I^e** an das cyclische und das lineare Pro-enthaltende Peptid (**II^f** bzw. **II^e**), die beide die gleiche chemische Gly-Pro-Einheit enthalten, sprechen eindeutig für eine konformative Spezifität des Antikörpers.

Zusammenfassend lässt sich folgendes schließen: Durch Einbau von 2,2-Dimethyl-1,3-thiazolidin-4-carbonsäure (Ψ Pro) in eine biologisch relevante, von der V3-Schleife von HIV-1 abgeleitete cyclische Peptidsequenz wurde eine *cis*-Peptidbindung induziert, die einer für den Infektionsprozess diskutierten Konformation entspricht. Weiterhin zeigen die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen, dass Antikörper produziert wurden, die selektiv zwischen der *cis*- und *trans*-Konformation von Xaa-Pro-Imidbindungen in linearen und cyclischen Peptiden unterscheiden können. Damit werden interessante Perspektiven für eine Anwendung des Pseudoprolin-Konzepts als diagnostisches Werkzeug zur Untersuchung von Konformationsänderungen bei biologischen Prozessen eröffnet.

Experimentelles

Die Peptidsynthesen wurden gemäß Standardvorschriften der Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Strategie^[16] entweder am supersäurelabilen SASRIN-Harz^[19] oder am Sieber-Amidharz^[20] durchgeführt. 2,2-Dimethyl-1,3-thiazolidin-4-carbonsäure (Pseudoprolin) wurde während der Festphasensynthese als vorgefertigtes Dipeptid eingebaut.^[3] Genauere Angaben zur Synthese sind in den Hintergrundinformationen zu finden. Die peptidischen Produkte wurden durch Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) und 1D- und 2D-¹H-NMR-TOCSY, -COSY-DQF- und -ROESY-Spektroskopie charakterisiert. NMR-Spektren wurden bei 400 MHz ($\tau_m = 200$ ms) in [D₆]DMSO bei 305 K aufgenommen (siehe Hintergrundinformationen).

Zur Herstellung der Biokonjugate wurde zunächst der Linker 3-(*N*-Maleimid)*o*propionsäurehydroxysuccinimidester an das Trägerprotein BSA in 0.1M Phosphatpuffer (pH 7.0)/Dioxan (5:1; v/v) gekuppelt. Nach Entfernen des Überschusses am Linkermolekül durch Dialyse gegen 0.1M Phosphatpuffer (pH 7.0) (Molekulargewichtsausschlussgrenze 2000 Da) wurden die Peptide **I^e** oder **II^e** hinzugegeben und die Lösung 1 h inkubiert. Anschließend wurde gegen Wasser dialysiert und die Produkte lyophilisiert. Durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde ermittelt, dass die Zahl der pro BSA-Molekül gekoppelten V3-Peptide zwischen 10 und 30 liegt.

Zur Herstellung von Antikörpern wurde eine Mischung aus Antigen (15 µg in 25 µL Phosphatpuffer (PBS, phosphate-buffered saline) und Titer-Max-Adjuvans (25 µL) intrakutan in die Schwanzbasis von acht Wochen alten Balb/c-Mäusen injiziert. Bei mit **I^e** immunisierten Mäusen wurde nach fünf Wochen eine Booster-Injektion vorgenommen, und allen Mäusen wurde nach neun Wochen Blut zur Gewinnung von Antiserum abgenommen. Im ELISA wurden AquaBind-Mikrotiterplatten (BioConcept) verwendet, die eine kovalente Bindung zwischen der Thiolgruppe der Peptide und der Oberfläche ermöglichen. Zur Immobilisierung der Peptide wurden diese in einer Konzentration von 10 µg mL⁻¹ in 0.2 mM Carbonatpuffer (pH 9.5) inkubiert (4 °C, 12 h), die Platten mit PBS/0.05% Tween 20 gewaschen und unbesetzte Stellen der Oberfläche durch Inkubation mit einer 5-proz.

Milchpulverlösung in PBS blockiert. Verdünnte Lösungen der Sera und der monoklonalen Antikörper in PBS/0.05% Tween 20 wurden 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, dann folgten ein Waschschritt (PBS/0.05% Tween 20) und die Inkubation mit einem Konjugat aus Anti-Maus-Antikörpern und Alkalischer Phosphatase in PBS/0.05% Tween 20 (1:1000, 1.5 h). Nach einem weiteren Waschschritt wurde eine vorbereitete Substratlösung (*p*-Nitrophenylphosphat) zugegeben und die Absorption bei 405 nm nach 30 min gemessen.

Zur Fusion wurden Myelomzellen der Zelllinie x63Ag8.653^[18] verwendet. Fusion, Propagierung von Hybridomzellen, Klonierung und Reinigung der monoklonalen Antikörper wurden gemäß Standardvorschriften durchgeführt.^[17]

Eingegangen am 2. September 1999,
veränderte Fassung am 22. November 1999 [Z 13955]

- [1] T. Haack, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 1589.
- [2] M. Mutter, A. Nefzi, T. Sato, X. Sun, F. Wahl, T. Wöhr, *Pept. Res.* **1995**, 8, 145.
- [3] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9218.
- [4] M. Keller, C. Sager, P. Dumy, M. Schutkowski, G. S. Fischer, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2714.
- [5] P. Dumy, M. Keller, D. E. Ryan, B. Rohwedder, T. Wöhr, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 918.
- [6] J. R. Rusche, K. Javaherian, C. McDanal, J. Petro, D. L. Lynn, R. Grimalia, A. Langlois, R. C. Gallo, L. O. Arthur, P. J. Fischinger, D. P. Bolognesi, S. D. Putney, T. J. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 3198.
- [7] K. Javaherian, A. J. Langlois, C. McDanal, K. L. Ross, L. I. Eckler, C. L. Jellis, A. T. Profy, J. R. Rusche, D. P. Bolognesi, S. D. Putney, T. J. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 6768.
- [8] T. J. Parker, M. E. Clark, A. J. Langlois, T. J. Matthews, K. J. Weinhold, R. R. Randall, D. P. Bolognesi, B. F. Haynes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 1932.
- [9] T. Hattori, A. Koito, K. Takatsuki, H. Kido, N. Katunuma, *FEBS Lett.* **1989**, 248, 48.
- [10] P. E. Stephens, G. Clements, G. T. Yarranton, J. Moore, *Nature* **1990**, 343, 219.
- [11] G. J. LaRosa, J. P. Davide, K. Weinhold, J. A. Waterbury, A. T. Profy, J. A. Lewis, A. J. Langlois, G. R. Dreesman, R. N. Boswell, P. Shadduck, L. H. Hooley, M. Karplus, D. P. Bolognesi, T. J. Matthews, E. A. Emini, S. D. Putney, *Science* **1990**, 249, 932.
- [12] M. E. Johnson, Z. Lin, K. Padmanabhan, A. Tulinsky, M. Kahn, *FEBS Lett.* **1994**, 337, 4.
- [13] R. A. LaCasse, K. E. Follis, M. Trahey, J. D. Scarborough, D. R. Littman, J. H. Nunberg, *Science* **1999**, 283, 357.
- [14] R. L. Stanfield, E. Cabezas, A. C. Satterthwait, E. A. Stura, A. T. Profy, I. A. Wilson, *Structure* **1999**, 7, 131.
- [15] V. Tugarinov, A. Zvi, R. Levy, J. Anglister, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 331.
- [16] J. M. Stewart, J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2. Aufl., Pierce Chemical, Rockford, IL, **1984**.
- [17] E. Harlow, D. Lane, *Antibodies – a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1988**.
- [18] J. F. Kearney, M. D. Cooper, A. R. Lawton, *J. Immunol.* **1976**, 116, 1664.
- [19] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4005.
- [20] P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2107.