

- [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**·0.5 MeCN·0.5 Et₂O 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. Coucouvanis, *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.

Pseudoprolin: 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*

Pseudoprolin (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

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_{IIIIB}-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-

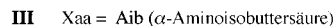
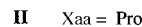
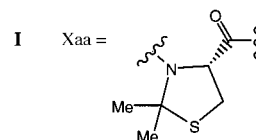
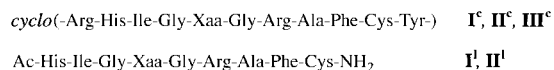


Abbildung 1. Sequenzen der cyclischen (**I^c**, **II^c**, **III^c**) und linearen Peptide (**I^t**, **II^t**).

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^t** und **II^t** synthetisiert (Abbildung 1). In Abbildung 2 sind die *cis*-Gly- Ψ Pro- und die

[*] 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.

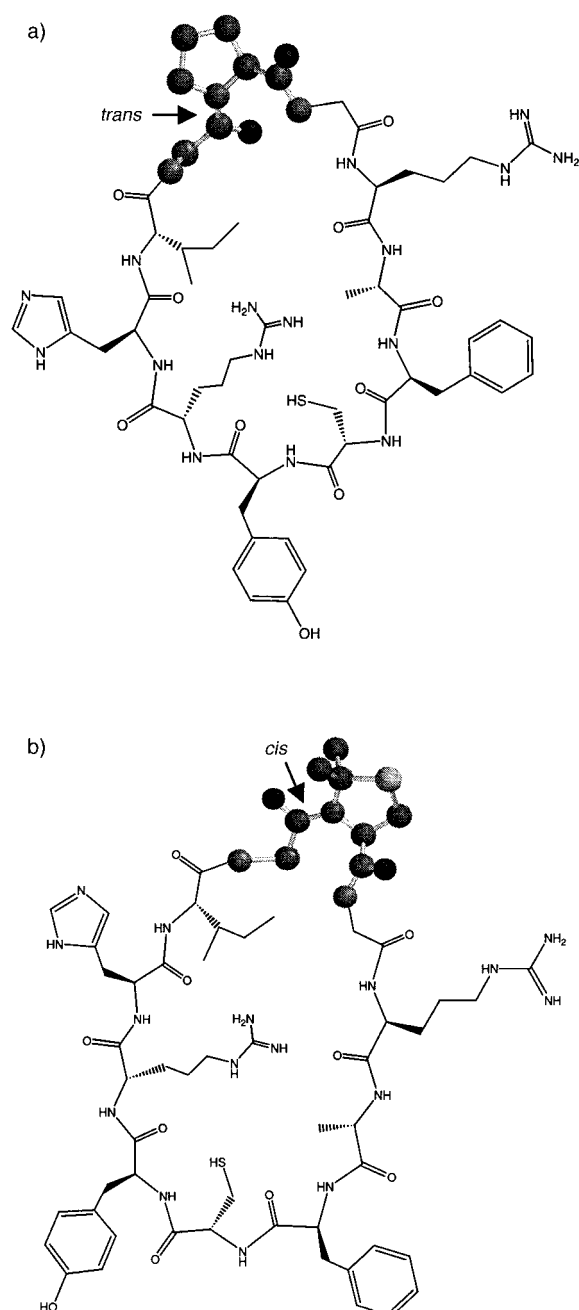


Abbildung 2. Modell der durch Einbau eines Pseudoprolins induzierten Konformationsänderung. a) Bereich Gly-Pro im Peptid **II^c** mit einer *trans*-Peptidbindung. b) Bereich Gly-Cys(Ψ^{Me,Me}pro) im Peptid **I** mit einer *cis*-Peptidbindung.

trans-Gly-Pro-Peptidbindungen der Peptide **I** 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 komplette Zuordnung der Protonensignale für die Peptide **I** und **II**. Für das cyclische ΨPro-enhaltende Peptid **I** 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*}(Ψ^{Me,Me}pro) auf, d. h. αH_{*i–1*}-αH_{*i*}- und αH'_{*i–1*}-αH_{*i*}-Kreuzsignale. Der entsprechende Spektrenbereich ist in Abbildung 3a dargestellt. Für eines der Nebenkongomere wurde die korrespondierende *trans*-Form mit einer *trans*-Peptidbindung zwischen Gly_{*i–1*} und Cys_{*i*}(Ψ^{Me,Me}pro) erwartet, jedoch

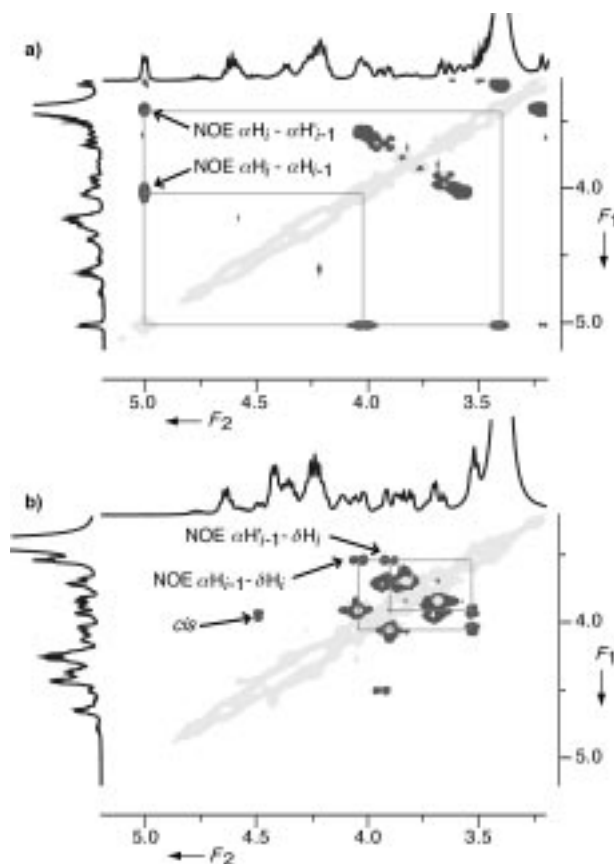


Abbildung 3. Ausschnitt aus den 2D-¹H-NMR-ROESY-Spektren der V3-Schleifen-Analoga in [D₆]DMSO bei 305 K (400 MHz, τ_m = 200 ms). a) ΨPro-Peptid **I** mit NOE-Kreuzsignalen αH_{*r*}-αH_{*r–1*} und αH_{*r*}-αH_{*r–1*} zwischen Gly_{*i–1*} und Cys_{*i*}(Ψ^{Me,Me}pro). b) Pro-enhaltendes Peptid **II^c** mit NOE-Kreuzsignalen αH_{*r–1*}-δH_{*i*} und αH'_{*r–1*}-δH_{*i*} zwischen Gly_{*i–1*} und Pro_{*i*}.

konnten die charakteristischen NOE-Konnektivitäten αH_{*i–1*}-δH_{*i*} und αH'_{*i–1*}-δH_{*i*} wegen der geminalen Methylgruppen in der δ-Position nicht beobachtet werden. Die Spektren des cyclischen Pro-enhaltenden 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 αH_{*i–1*}-δH_{*i*} und αH'_{*i–1*}-δH_{*i*} zwischen Gly_{*i–1*} und Pro_{*i*} als *trans*-konfiguriert identifiziert werden (Abbildung 3b). Außerdem wurde ein Satz von Nebensignalen dem entsprechenden *cis*-Konformer zugeordnet, das die Kreuzsignale αH_{*i–1*}-αH_{*i*} und αH'_{*i–1*}-αH_{*i*} zwischen Gly_{*i–1*} und Pro_{*i*} lieferte (ebenfalls in Abbildung 3b zu erkennen), ein Hinweis auf die erhöhte Neigung von Prolin zum Eingehen von Xaa_{*i–1*}-Pro_{*i*}-*cis*-Peptidbindungen. Im Falle des Aib-enhaltenden Peptids **III^c** war die komplette 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** zeigten interes-

santerweise eine einzige Konformation mit einer dem Pseudoprolin vorangehenden *cis*-Imidbindung, während für das lineare Peptid **II** 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 gekuppelten Haptene mit einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) getestet. In Abbildung 4 ist die Wirkung beider Antisera in verschiedenen Verdünnungen gegen

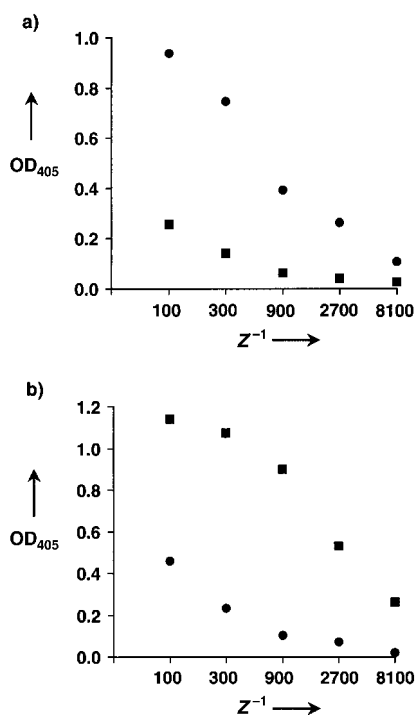


Abbildung 4. Ergebnisse der ELISAs mit den Sera von Mäusen, die mit dem ψ Pro-enhaltendem Peptid **I** (●) oder mit dem Pro-enhaltendem Peptid **II** (■) immunisiert wurden. a) Oberflächenantigen **I**^c ($c = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$). b) Oberflächenantigen **II**^c ($c = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Z = 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.

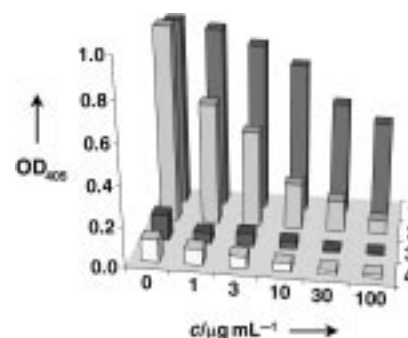


Abbildung 5. Die Ergebnisse der kompetitiven ELISAs demonstrieren eine Inhibition der antigenen Reaktion mit zunehmender Konzentration an Peptid **I**^c. Das kompetitive Peptid **II**^c inhibiert die antigenen Reaktion deutlich weniger. Das Oberflächenantigen **I**^c wurde bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 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 Milzzellen der immunisierten Tiere mit Myelomzellen einer Ag8-Linie fusioniert,^[17, 18] die entstehenden Hybridomzellen gewünschter Antikörperaktivität propagiert, 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 polyclonalen Sera erhaltenen Resultate, d. h., beide Antikörper erkennen spezifisch ihr homologes Antigen. Wie in Abbildung 6 gezeigt ist, erkennt mAb ψ Pro238.13, der gegen das cyclische ψ Pro-enhaltende Peptid **I**^c selektioniert wurde, das Pro-enhaltende Peptid **II**^c zu 15 %, in Übereinstimmung mit dem durch

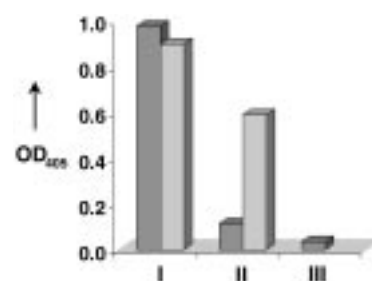


Abbildung 6. Bindung des gegen **I**^c produzierten monoklonalen Antikörpers mAb ψ Pro238.13 an die cyclischen (c, dunkle Balken) und die linearen Peptide (l, helle Balken). I: ψ Pro-enhaltende Peptide **I**^c und **I**^l; II: Pro-enhaltende Peptide **II**^c und **II**^l; III: Aib-enhaltendes Peptid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

NMR-Studien bestimmten *cis*-Gehalt in **II**^c. Als weiterer Hinweis auf einen *cis*-gerichteten Antikörper wird das Aib-enhaltende Referenzpeptid **III**^c, das wie das C2-dimethylsubstituierte ψ Pro zwei geminale Methylgruppen enthält, nicht erkannt (Abbildung 6). Weiterhin bindet der gegen das cyclische *cis*-enhaltende Peptid **I**^c produzierte Antikörper ebenso stark das entsprechende lineare Peptid **I**^l. In Anbetracht der substantiellen Unterschiede zwischen cyclischen und linearen Peptiden hinsichtlich konformativer Beweglichkeit und Gesamtform deutet die Erkennung beider Spezies durch mAb ψ 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'** untermauert, was nur durch eine durch den *cis*-gerichteten Antikörper induzierte *trans* → *cis*-Isomerisierung der Gly-Pro-Bindung im flexiblen Peptid **II'** erklärt werden kann. Dagegen tritt in dem konformativ eingeschränkten cyclischen Peptid **I'** 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'** an das cyclische und das lineare Pro-enthaltende Peptid (**II'** bzw. **II'**), 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*-Maleimido)propionsäurehydroxysuccinimidester an das Trägerprotein BSA in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0)/Dioxan (5:1; v/v) gekuppelt. Nach Entfernen des Überschusses an Linkermolekül durch Dialyse gegen 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0) (Molekulargewichtsausschlussgrenze 2000 Da) wurden die Peptide **I'** oder **II'** 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 gekuppelten V3-Peptide zwischen 10 und 30 liegt.

Zur Herstellung von Antikörpern wurde eine Mischung aus Antigen (15 μ g in 25 μ L Phosphatpuffer (PBS, phosphate-buffered saline) und Titer-Max-Adjuvans (25 μ L) intrakutan in die Schwanzbasis von acht Wochen alten Balb/c-Mäusen injiziert. Bei mit **I'** 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 μ g mL⁻¹ in 0.2 M 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 Waschschriff (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 Waschschriff 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 [Z13955]

- [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. Grimaila, 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. Palker, 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. Shaddock, 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.