

**ANIONENREZEPTOREN AUS CYCLOPEPTIDEN
MIT 6-AMINOPICOLINSÄURE- UND SUBSTITUIERTEN
PROLINUNTEREINHEITEN**

DISSERTATION

GENEHMIGT VOM FACHBEREICH CHEMIE
DER UNIVERSITÄT KAISERSLAUTERN ZUR VERLEIHUNG
DES AKADEMISCHEN GRADES „DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“

D 386



VORGELEGT VON

SABINE STÜWE

GEBOREN IN KREFELD-HÜLS

BETREUER: PROF. DR. S. KUBIK

KAISERSLAUTERN, 2007

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Stefan Kubik im Zeitraum von Januar 2003 bis März 2005 im Institut für Organische und Makromolekulare Chemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und von April 2005 bis April 2007 im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern angefertigt.

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Ernst

1. Gutachter: Prof. Dr. S. Kubik

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Hartung

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2007

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Literaturzitate kenntlich gemacht habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfverfahren vorgelegen hat.

Kaiserslautern, den

Für Philipp

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1
B. THEORETISCHER TEIL	9
1. AUFGABENSTELLUNG	9
2. DARSTELLUNG POTENTIELLER ANIENREZEPTOREN UND CHARAKTERISIERUNG IHRER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN	13
2.1. <i>CYCLOPEPTIDSYNTHESEN</i>	13
2.2. <i>SUBSTRATSYNTHESEN</i>	25
2.3. <i>BINDUNGSSTUDIEN</i>	27
2.3.1. <i>METHODEN</i>	27
2.3.2. <i>SULFONATE</i>	34
2.3.2.1. <i>DMSO</i>	34
2.3.2.2. <i>WASSER/METHANOL</i>	39
2.3.2.3. <i>MOLECULAR MODELLING</i>	48
2.3.3. <i>ACETAT</i>	52
3. SYNTHESE VON CYCLOPEPTIDEN FÜR DIE DYNAMISCHE KOMBINATORISCHE CHEMIE ...	56
3.1. <i>THEORETISCHER HINTERGRUND</i>	56
3.2. <i>UNTERSUCHUNGEN ZUR SYNTHESE EINES TRITHIO-HALTIGEN CYCLOPEPTIDS</i>	58
3.3. <i>SYNTHESE EINES EINFACH VERBRÜCKTEN BIS(CYCLOPEPTID)DISULFIDS</i>	67
4. SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON OPTISCHEN SENSOREN.....	70
4.1. <i>THEORETISCHER HINTERGRUND</i>	70
4.2. <i>SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG EINES CYCLOPEPTIDS MIT DANSYL-</i> <i>SUBSTITUENTEN</i>	74
4.3. <i>VERSUCHE ZUR SYNTHESE EINES CYCLOPEPTIDS MIT FLUORESCHEIN-</i> <i>SUBSTITUENTEN</i>	79
C. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	83
D. EXPERIMENTELLER TEIL	88
1. ALLGEMEINES	88
1.1. <i>APPARATIVES</i>	88
1.2. <i>CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL</i>	90
2. WIRT-GAST-EXPERIMENTE	93
2.1. <i>NMR-EXPERIMENTE</i>	93

2.2.	<i>ISOTHERME TITRATIONS-KALORIMETRIE</i>	94
2.3.	<i>FLUORESZENZMESSUNGEN</i>	95
3.	<i>ALLGEMEINE ARBEITSWEISEN</i>	96
4.	<i>SYNTHESEN</i>	97
4.1.	<i>SYNTHESE VON 6-AMINOPICOLINSÄUREALLYLESTER</i>	97
4.2.	<i>SYNTHESE DER DIPEPTIDE BOC-[(Z-APRO)-APA]-OALL UND BOC-[(Z-ALA-APRO)-APA]-OALL</i>	100
4.3.	<i>SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS CYCLO{[(Z-APRO)-APA]₃}</i>	117
4.4.	<i>SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS CYCLO{[(Z-ALA-APRO)-APA]₃}</i>	121
4.5.	<i>SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS CYCLO{[(MEOCO-APRO)-APA]₃}</i>	125
4.6.	<i>SYNTHESE DER GÄSTE</i>	132
4.7.	<i>SYNTHESE DES DIPEPTIDS BOC-[(TB-PRO)-APA]-OALL</i>	134
4.8.	<i>SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS CYCLO{[(TB-PRO)-APA]₃}</i>	135
4.9.	<i>SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS CYCLO{[PRO-APA]₂-[(TB-PRO)-APA]}</i>	139
4.10.	<i>SYNTHESE DER BIS(CYCLOPEPTIDE) (CYCLO{[PRO-APA]₂-[(S-PRO)-APA]})₂ UND (CYCLO{[(S-PRO)-APA]₃})₂</i>	145
4.11.	<i>SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS CYCLO{[HYP-APA]₂-[(DANSYL-APRO)-APA]}</i>	148
4.12.	<i>VERSUCHE ZUR SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS CYCLO{[HYP-APA]₂-[(FLUORESCEIN-ALA-APRO)-APA]}</i>	158
4.13.	<i>VERSUCHE ZUR SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS CYCLO{[PRO-APA]₂-[(FLUORESCEIN-ALA-APRO)-APA]}</i>	162
E.	LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	166
F.	LITERATUR	168

A. EINLEITUNG

Antibiotika sind in der heutigen Medizin bei der Behandlung von Bakterien-induzierten Infektionen unverzichtbar. Resistenzen verschiedener Bakterienstämme gegen die gebräuchlichsten Antibiotika führten in den letzten Jahren immer wieder zu schwerwiegenden Problemen. Daher ist es wichtig, dass bei der Suche nach geeigneten Wirkstoffen eine ständige Neu- und Weiterentwicklung stattfindet.

Eine Klassifizierung der verschiedenen Antibiotika kann nach unterschiedlichen Kriterien wie Wirkungsspektrum, Wirkungsmechanismus, Produzentenstamm, biosynthetischer Ableitung und nach der chemischen Struktur vorgenommen werden.¹ Die Wirkung von Antibiotika erstreckt sich auf die reversible Hemmung des Bakterienwachstums oder die Abtötung derselben. Die verschiedenen Angriffspunkte sind der Zellwand- bzw. Zellmembranaufbau, die DNA-Replikation, die Transkription, die Proteinsynthese (Translation) oder der Eingriff in Stoffwechselvorgänge (Abbildung 1).

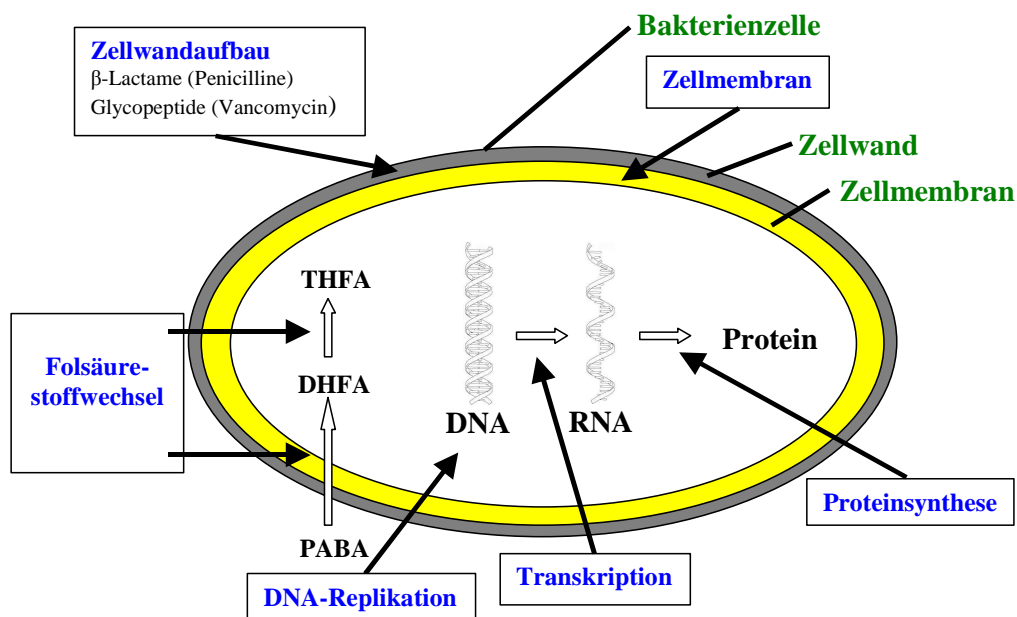


Abbildung 1. Angriffspunkte von Antibiotika in einer Bakterienzelle (THFA: Tetrahydrofolsäure; DHFA: Dihydrofolsäure; PABA: p-Aminobenzoesäure).²

Penicilline (Abbildung 2), welche strukturell zur Gruppe der β -Lactame gehören, und das Glycopeptid Vancomycin (Abbildung 3) greifen zum Beispiel beide in den Zellwandaufbau tödlich wirkender Gram-positiver Bakterien wie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) ein, besitzen dabei aber unterschiedliche Wirkungsweisen.¹⁻⁴ Bakterien wie *S. aureus* sind ein häufiger Grund für Lebensmittelvergiftungen und Infektionen im klinischen Bereich.⁵ Solche Gram-positiven Bakterien besitzen im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien eine Zellwand, die von einer sehr viel dickeren Peptidoglycanschicht (20-40 nm gegenüber 2-7 nm) umgeben ist. Diese Peptidoglycanschicht dient zur mechanischen Stabilisierung der Zellwand und besteht aus einem polymeren Netzwerk aus Polysacchariden und Peptidketten. Die Polysaccharide bestehen aus 1,4-glycosidisch verknüpftem *N*-Acetylglucosamin- und *N*-Acetylmuraminsäureeinheiten. Sie tragen Peptidketten der Sequenz L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Während der Peptidoglycansynthese werden diese Peptidketten quervernetzt, wobei die freie Aminogruppe des L-Lysins mit dem D-Alanin eines zweiten Peptidoglycans verbunden wird. Dieser Vorgang wird durch das Enzym Transpeptidase katalysiert, welches zunächst am Ende einer Peptidkette ein D-Alanin abspaltet, dann über einen Serinrest im aktiven Zentrum an die verkürzte Kette bindet und diese anschließend mit dem Lysin einer zweiten Peptidkette verknüpft.^{6,7} Die beiden Antibiotika Penicillin und Vancomycin verhindern diese Quervernetzung auf unterschiedliche Art und Weise.

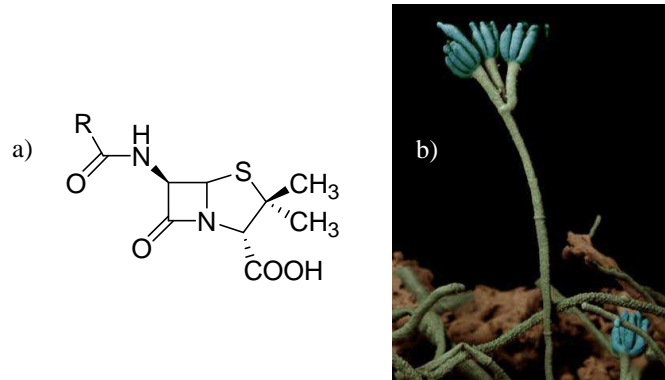


Abbildung 2. a) Allgemeine Penicillin-Struktur; b) Sporen eines Penicillin-Schimmelpilzes (1200-fache Vergrößerung).²

Das 1929 von Sir Alexander Fleming entdeckte und ursprünglich aus dem Schimmelpilz *penicillium chrysogenum* gewonnene Penicillin hemmt den Aufbau der Peptidoglycanschicht durch irreversible Hemmung der Transpeptidase.^{2,7} Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Penicillin mit der Konformation des während der Transpeptidierung im aktiven Zentrums der Transpeptidase gebundenen Dipeptidfragments D-Ala-D-Ala bindet das Antibiotikum mit hoher Affinität an das Enzym.⁸ Durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zu einem Serinrest des Enzyms kann das eigentliche Substrat nicht

mehr an das Enzym binden, wodurch der Aufbau der Peptidoglycanschicht unterbleibt. Die Zellwand bleibt instabil und das Bakterium stirbt.

Penicillin wirkt bei diesem Prozess als Inhibitor bei der Peptidoglycansynthese, indem es die Struktur des Substrats imitiert. Im Gegensatz dazu stellt Vancomycin, welches von dem Mikroorganismus *Amycolatopsis orientalis* gebildet wird, ein Antibiotikum dar, dessen Bindungstasche die Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms imitiert. Es verhindert die Stabilisierung der Peptidoglycanschicht, indem es durch reversible Bindung an das endständige Tripeptidsegment L-Lys-D-Ala-D-Ala des unvernetzten Vorläufers bindet (Abbildung 3) und dadurch die enzymatische Vernetzung unmöglich macht. Dies führt letztendlich ebenfalls zur Zellzerstörung und zum Tod des Bakteriums.

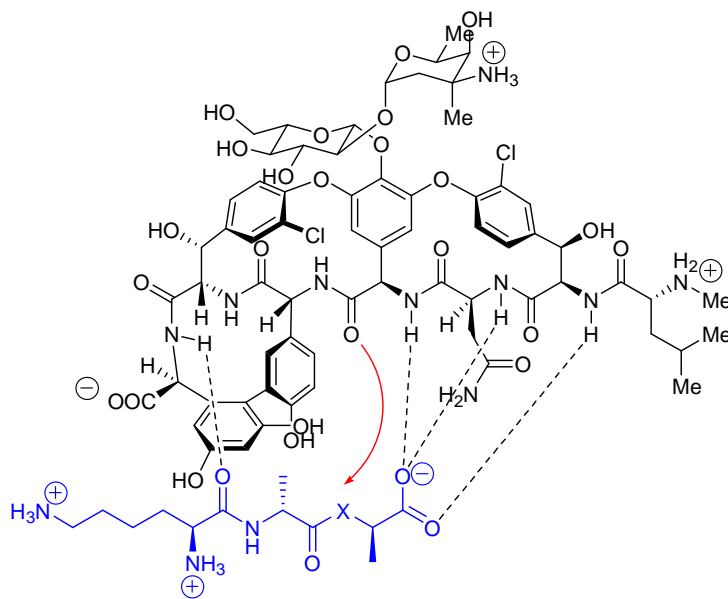


Abbildung 3. Wechselwirkungen von Vancomycin mit dem Tripeptid L-Lys-D-Ala-D-Ala ($X = N-H$) bzw. L-Lys-D-Ala-D-Ala-D-Lac ($X = O$), die rot gekennzeichnete Wasserstoffbrückenbindung tritt nur im Falle des Alanins ein.

Untersuchungen mit dem Tripeptid Ac-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala haben gezeigt, dass das Carboxylatende dieses Substrats durch drei Wasserstoffbrücken in einer Tasche des Antibiotikums gebunden wird.⁹ Es konnten darüber hinaus zwei Amid-Amid-Wasserstoffbrücken sowie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Alaninmethylgruppen und dem Kohlenwasserstoffgerüst des Vancomycins beobachtet werden. Die hohe Komplexstabilität ist aber überwiegend auf die Bindung der Carboxylatgruppe zurückzuführen. Diese steuert eine hohe negative Bindungsenthalpie (-20 bis $-30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) zur Komplexierung bei.^{4,10} Die Bindungskonstante des Komplexes von Vancomycin mit Ac-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala liegt in wässriger Lösung bei etwa 10^6 M^{-1} und

die des Komplexes mit dem Dipeptid Ac-D-Ala-D-Ala bei etwa 10^5 - 10^6 M⁻¹.¹¹ Systematische NMR-Studien zur Wechselwirkung des Antibiotikums mit Acetat, Ac-D-Ala, Ac-D-Ala-D-Ala und Ac-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala ergaben, dass hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken die Komplexstabilität erhöhen.⁴ Die Kooperativität der Wechselwirkungen kommt sowohl durch den entropischen Vorteil mehrerer Wechselwirkung in einem Molekül (Chelat-Effekt) als auch durch enthalpische Effekte bei der Komplexierung zustande.

In jüngster Zeit sind vermehrt Vancomycin-resistente Bakterienstämme beobachtet worden. Bei Vancomycin-resistenten Enterokokken ist z.B. die terminale Aminosäure der Peptidkette im unvernetzten Peptidoglycan gegen D-Milchsäure ausgetauscht. Die Effizienz der Wechselwirkung mit Vancomycin ist dadurch um das 1000-fache geschwächt, der Aufbau der Zellwand wird nicht verhindert und das Bakterium überlebt.^{12,13} Die reduzierte Komplexstabilität kann dem Verlust einer Wasserstoffbrücke und einer destabilisierenden *lone pair-lone pair* Abstoßung zugeschrieben werden.¹⁴ Studien der Gruppe um Dale Boger belegen, dass gerade diese *lone pair-lone pair* Abstoßung den größten Anteil des Aktivitätsverlusts ausmacht. So bindet ein Substrat mit einer Methylengruppe anstelle des Stickstoffs bzw. Sauerstoffs im Amid bzw. Ester an Vancomycin mit einer nur um etwa zehnfach niedrigeren Bindungskonstante als Ac-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala, aber um zwei Größenordnungen besser als Ac-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Lac. Diese Ergebnisse werden durch eine Reihe weiterer Bindungsstudien, die sich mit dem Einfluss der Substratstruktur auf die Komplexstabilität beschäftigen, unterstützt.¹⁴⁻¹⁹ Auf Basis der so gewonnenen Erkenntnisse lassen sich neue Vancomycin-analoge Rezeptoren erhalten. So gelang es, semisynthetische Glycopeptid-Antibiotika wie z.B. das Fluorbalhimycin zu entwickeln,²⁰ oder es wurden strukturelle Änderungen in der Peripherie der Bindungstasche des Vancomycins vorgenommen.²¹⁻²³ Die Gruppe um Dale Boger hat sich auch mit der Modifikation der Bindungstasche selber beschäftigt.²⁴ Durch Ersetzen einer Amidcarbonylgruppe gegen eine Methylengruppe im Inneren der Vancomycin-Bindungstasche wird die destabilisierenden *lone pair-lone pair* Abstoßung zum Sauerstoffs des Ac-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Lac vermieden. Die Bindung an dieses Substrat ist dadurch um das 100fache höher als die des natürlichen Vancomycins.⁵

Das Wirt-Gast-System zwischen Vancomycin und Ac-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala ist ein Vorbild für die Entwicklung von Antibiotika einer Reihe von Arbeitsgruppen. Eine Möglichkeit zur Herstellung synthetischer Vancomycinanaloga ist die Reduktion des Vancomycins auf

wesentliche strukturelle Elemente der Bindungstasche.^{25,26} Eine andere Möglichkeit ist die Herstellung synthetischer Rezeptoren zur Erkennung von Ac-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala.²⁷ Die letzte Strategie wurde z.B. in den Gruppen von R. Ungaro²⁸, J. D. Kilburn²⁹ und C. Schmuck^{30,31} verfolgt, wobei sich die beschriebenen Vancomycinmimetika allerdings strukturell vom eigentlichen Antibiotikum erheblich unterscheiden. Bei dem von Ungaro beschriebenen System handelt es sich um ein am *upper rim* überbrücktes Calix[4]aren (Abbildung 4a).^{28,32} Dieses Calix[4]aren nimmt die *cone* Konformation ein und spannt dabei einen konkaven Hohlraum auf, in den die hydrophoben Substituenten der Substrate D-Alanin bzw. D-Ala-D-Ala eingelagert werden können. Zusätzlich wird die Substratbindung durch Wasserstoffbrücken zu den funktionellen Gruppen in der Brücke verstärkt. Die antibakterielle Aktivität dieser Verbindung ist als moderat bis gut einzustufen, wenngleich sie deutlich geringer als die des Vancomycins ist. Durch andere Modifikationen des *upper rim* eines solchen Calix[4]arens können auch Wirte für verschiedene andere Gäste, z.B. Aminosäuren, erhalten werden.³³

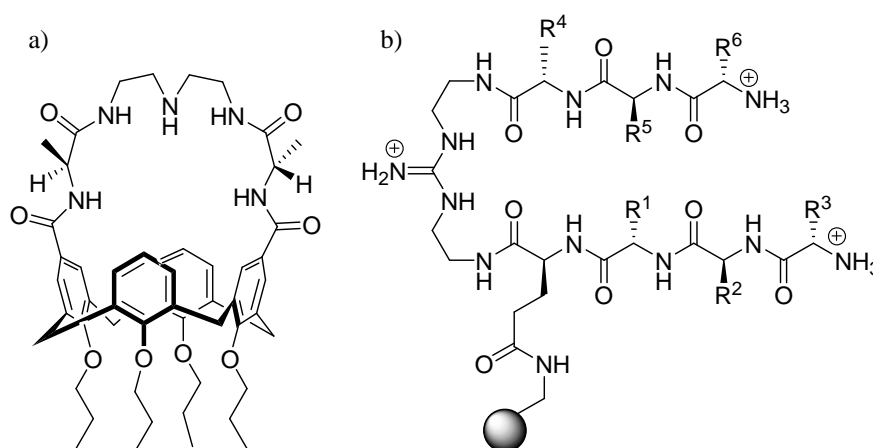


Abbildung 4. Vancomycinmimetika nach a) Ungaro et al.²⁸ und b) Kilburn et al.²⁹

Im Gegensatz zum Calix[4]aren von Ungaro basiert das an Polymerbeads gebundene Vancomycinmimetikum der Arbeitsgruppe um J.D. Kilburn auf einer Pinzetten-ähnlichen Struktur mit einer Guanidiniumgruppe als zentralem Bindungselement (Abbildung 4b).²⁹ Die Guanidiniumeinheit wird gerne als Bindungsstelle für Carboxylate verwendet, da die Anionenbindung auf einem Zusammenspiel von Wasserstoffbrücken und elektrostatischen Wechselwirkungen beruht (Abbildung 5).³⁴⁻³⁷ Die beiden Arme des Rezeptors bestehen aus Peptidsegmenten, deren Aminosäuresequenz die Bindungselektivität beeinflusst. Zur Optimierung der Selektivität wurde die kombinatorische Chemie eingesetzt. Dabei wurde mit Hilfe der *split and mix* Strategie eine Rezeptorbibliothek generiert, bei der die Sequenz der

Aminosäureeinheiten in den Seitenarmen des Rezeptors variiert wurde. Durch Screening dieser Bibliothek mit dem am Lysinrest Farbstoff-markierten Tripeptid *N*-Ac-L-Lys(Dispersionsrot 1)-*D*-Ala-*D*-Ala wurden verschiedene potentielle Rezeptorverbindungen identifiziert. Während die Festphasen-gebundenen Rezeptoren allerdings eine hohe Substrataffinität zeigten, besaßen die entsprechenden freien Rezeptoren in Lösung keine Aktivität, was auf einen signifikanten Einfluss der Polymermatrix auf das Bindungsverhalten hinweist.

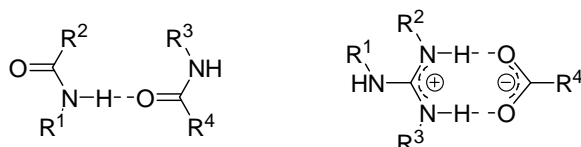


Abbildung 5. Links: Wasserstoffbrückenbindung; rechts: Guanidinium/Carboxylat Salzbrücke.

Einen analogen Ansatz zur Erkennung von Peptidstrukturen verfolgt die Arbeitsgruppe um C. Schmuck. Als zentrale Bindungseinheit für das Carboxylatende des Substrats wird jedoch ein Guanidinium-substituiertes Pyrrol eingesetzt, welches mit Carboxylaten sowohl durch elektrostatische Wechselwirkungen als auch durch Wasserstoffbrücken wechselwirken kann.^{38,39} Weitere Bindungsstellen zur Erkennung eines kurzkettigen Peptids werden von Aminosäure-haltigen Substituenten am Pyrrol zur Verfügung gestellt. Zur Optimierung dieser Rezeptoren wurde ebenfalls die kombinatorische Chemie verwendet. Der Rezeptor befindet sich dabei wahlweise entweder an der festen Phase und das Substrat ist mit einem Farbstoff für das Screening markiert^{30,40} oder umgekehrt.³¹ Der Polymer-gebundene Rezeptor in Abbildung 6 ist z.B. in der Lage, in wässrigen Pufferlösungen das Tetrapeptid Ac-*D*-Glu-L-Lys-*D*-Ala-*D*-Ala sehr effizient zu binden ($K_a \approx 17000 \text{ M}^{-1}$).³⁰ Dieser Rezeptor unterscheidet zwischen Peptid und Depsipeptid und besitzt im Gegensatz zu den Verbindungen von J.D. Kilburn auch in freier Form in Lösung eine hohe Aktivität.³¹

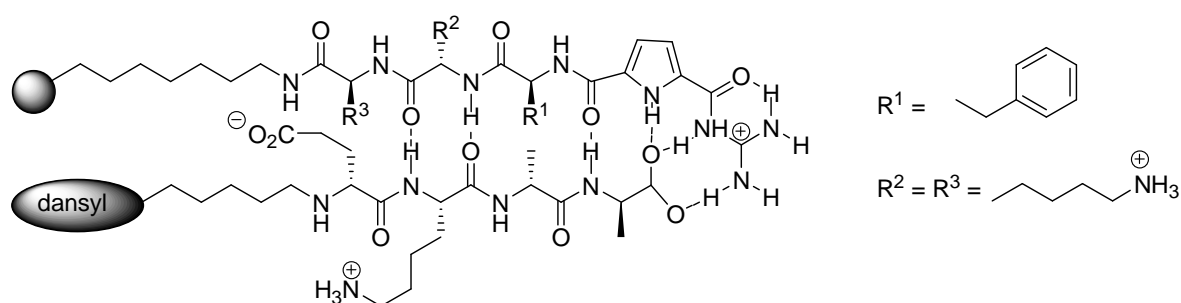


Abbildung 6. Vancomycinmimetikum nach Schmuck et al.³⁰

Weitere Ansätze zur Entwicklung von Rezeptoren mit Vancomycin-ähnlichen Eigenschaften wurden in den Gruppen um Liskamp und Wennemers realisiert. Im ersten Fall wurde ein Triazacyclophan mit drei Tripeptidarmen verwendet⁴¹⁻⁴⁴ und im zweiten ein Pinzetten-ähnlicher Rezeptor auf Diketopiperazinbasis mit zwei Tripeptidarmen.⁴⁵⁻⁴⁸

Vergleicht man die hier vorgestellten synthetischen Peptidrezeptoren miteinander, erkennt man deutlich eine Gemeinsamkeit. Alle Rezeptoren besitzen einen speziellen Bereich für die Anionenbindung. Für zusätzliche stabilisierende Wechselwirkungen mit den Substituenten des Substrats und für die Substratselektivität sind andere Bereiche des Moleküls zuständig, welche meist Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen beisteuern.⁴⁹

Die Arbeitsgruppe um Stefan Kubik arbeitet seit einigen Jahren mit ungeladenen Anionenrezeptoren auf Basis von Cyclopeptiden aus Prolin- und 6-Aminopicolinsäureuntereinheiten, die in der Lage sind, anorganische Gäste wie z.B. Sulfat und Iodid mit hoher Affinität in wässriger Lösung zu binden (Abbildung 7a).⁵⁰⁻⁵⁴ U.a. ist hierfür die optimale Vororganisation dieser Peptide für die Anionenkomplexierung verantwortlich, welche auf die konvergierende Anordnung der drei NH-Gruppen zurückzuführen ist. In wässriger Umgebung bilden sich mit anorganischen Anionen allerdings bevorzugt 2:1 Komplexe, in denen das Anion von sechs Wasserstoffbrücken zwischen zwei Cyclopeptidringen, die wie Zahnräder ineinander greifen, gebunden wird (Abbildung 7b).⁵⁰ Die Komplexbildung ist ein exothermer Vorgang und wird allerdings zusätzlich durch das Freisetzen von Lösungsmittelmolekülen aus der Solvathülle des Anions und des Cyclopeptids entropisch favorisiert.

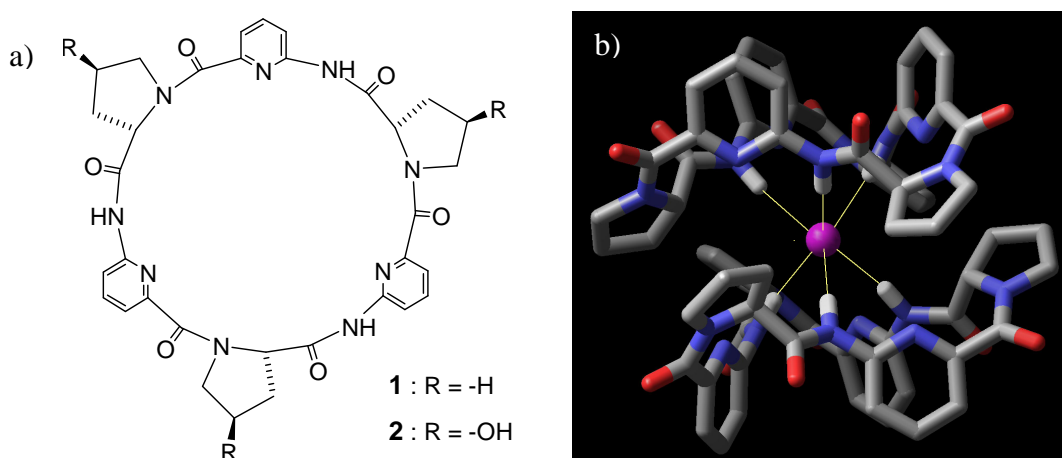


Abbildung 7. a) Struktur des Cyclohexapeptids aus 6-Aminopicolinsäure und L-Prolin **1** bzw. L-Hydroxyprolin **2**; b) Zwei Cyclohexapeptide **1** bilden einen 2:1 Komplex mit Iodid.⁵⁰

Anders als das Cyclohexapeptid **1** mit L-Prolineinheiten bildet Derivat **2** mit 4*R*-Hydroxy-L-prolinuntereinheiten in wässriger Lösung mit Anionen nur 1:1 Komplexe. Dies ist auf sterische Effekte und die bessere Hydratation der polarerer Hydroxyprolinuntereinheiten zurückzuführen. Diese Cyclopeptide stellen ideale Ausgangspunkte für die Entwicklung neuer Anionenrezeptoren dar, die in wässriger Lösung strukturell komplexere organische Anionen wie Sulfonate, Carboxylate, Aminosäuren und kurze Peptidsequenzen erkennen können.

B. THEORETISCHER TEIL

1. AUFGABENSTELLUNG

Bisher wurde in der Arbeitsgruppe um S. Kubik im Wesentlichen die Wechselwirkung der anionenbindenden Cyclopeptide mit anorganischen Anionen studiert. Durchaus reizvoll ist die Idee, das Substratspektrum zu vergrößern und auch organische Anionen und kurzkettige Peptide in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Bei der Erkennung solcher Gäste soll das cyclische Hexapeptid aus 6-Aminopicolinsäure- und L-Prolinuntereinheiten **1** zur Komplexierung der anionischen Gruppe im Substrat dienen. Geeignete, um den Hohlraum des Cyclopeptids angeordnete Substituenten sorgen durch zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Substrat für die gewünschte Bindungselektivität. Dieses Prinzip der Komplexbildung ist schematisch in Abbildung 8 gezeigt.

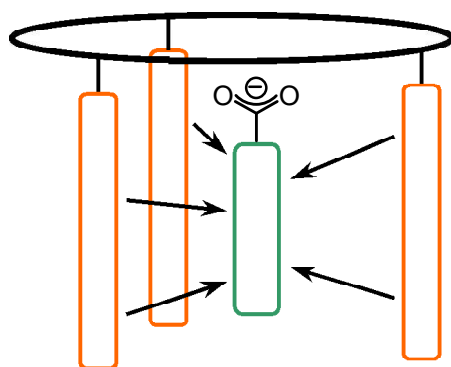


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Erkennung eines Anions durch ein substituiertes Cyclopeptid.

Die in Abbildung 9 dargestellte Kristallstruktur von **1** verdeutlicht, dass nur Substituenten an den Prolinuntereinheiten mit einem gebundenen anionischen Substrat wechselwirken können. Dabei stellen die C(γ)-Atome der Prolinuntereinheiten eine besonders günstige Position für die Substituenten dar, vor allem da man als Baustein zur Synthese eines entsprechend substituierten Cyclopeptids Hydroxyprolin oder ein Derivat dieser natürlichen Aminosäure verwenden kann. Um eine konvergierende Anordnung der Substituenten zu gewährleisten, müssen die C(γ)-Atome der substituierten Prolinuntereinheiten im Cyclopeptid wie im natürlichen Hydroxyprolin *R*-konfiguriert sein.

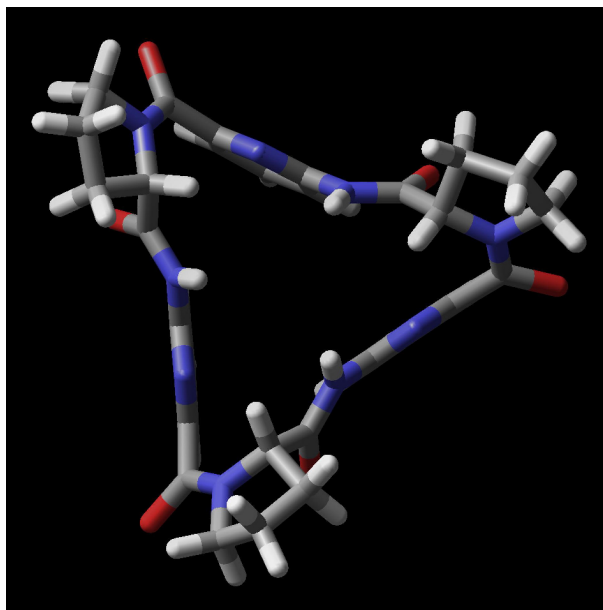
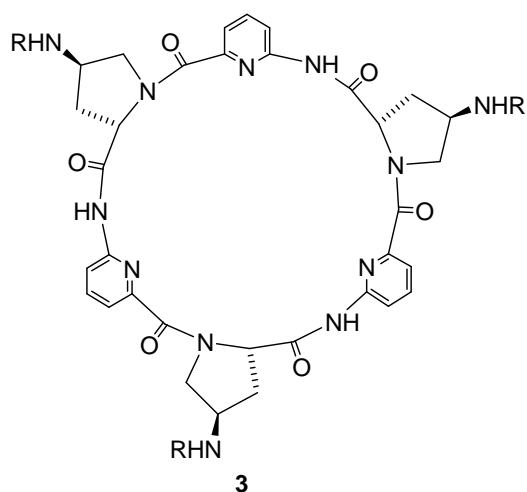


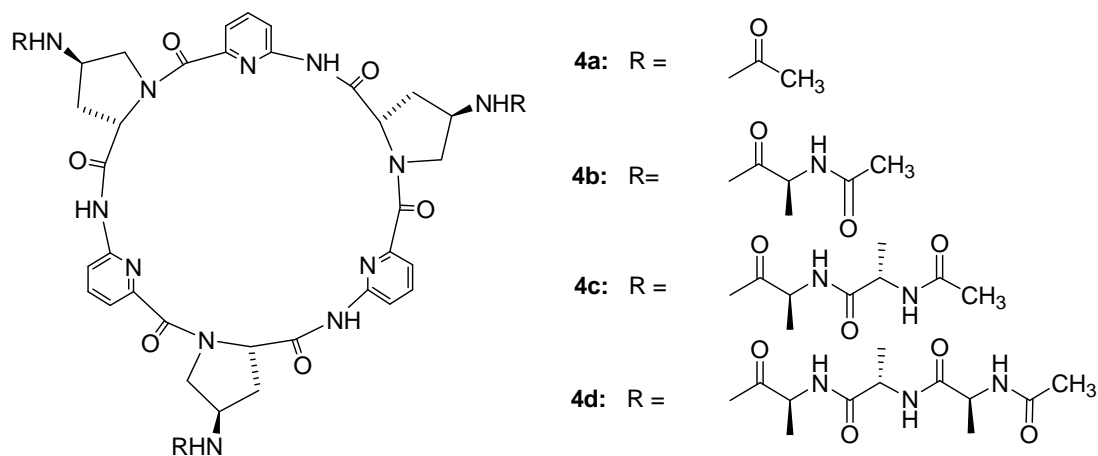
Abbildung 9. Kristallstruktur von **1**; Ansicht auf den Bindungshohlraum.⁵⁰

Aufgrund der geringen Reaktivität der Hydroxygruppen von Hydroxyprolin können diese allerdings nicht direkt zur Anknüpfung von Substituenten verwendet werden. Erfahrungen in der Gruppe zeigen, dass es günstiger ist, als Ausgangspunkt zur Synthese der gewünschten Rezeptoren Cyclopeptide mit 4*R*-Aminoprolinuntereinheiten zu verwenden. Hieraus können substituierte Derivate der allgemeinen Struktur **3** generiert werden.



Zur Entwicklung eines Rezeptors mit Vancomycin-ähnlichen Eigenschaften bietet es sich an, Aminosäuren oder Peptide um den Hohlraum anzuordnen, deren Fähigkeit, die Bindungselektivität von Peptidrezeptoren zu beeinflussen, bereits von anderen Gruppen demonstriert werden konnte.^{29,30,43,47} Im Rahmen meiner Dissertation sollten dementsprechend zunächst Synthesen für substituierte Cyclopeptide der allgemeinen Struktur

3 erarbeitet werden. Anschließend sollte überprüft werden, ob diese Rezeptoren organische Anionen binden und ob die peripheren Substituenten die Substrataffinität und –selektivität beeinflussen. Erste Zielverbindungen waren die Cyclopeptide **4a** bis **d**, die sich in der Anzahl der Alanin-Einheiten in den Substituenten entlang des Rings unterscheiden. Diese Rezeptoren erlauben es, systematisch den Einfluss der Länge der Substituenten auf die Substratbindung zu untersuchen. In einem späteren Stadium der Arbeit wäre auch eine strukturelle Modifikation der Aminosäuren in den Substituenten möglich. Gegebenenfalls kann zur Optimierung der Substituentenstruktur auch die dynamische kombinatorische Chemie eingesetzt werden. Eine Synthese für das hierfür notwendige Cyclopeptid muss im Rahmen meiner Dissertation ebenfalls entwickelt werden.



Zur Untersuchung der Komplexbildung sollen verschiedene Techniken verwendet werden. So kann die Komplexstabilität mittels NMR-Titrationsen oder durch Isotherme Titrationskalorimetrie bestimmt werden.

Das Fernziel dieser Arbeiten ist die Entwicklung synthetischer Rezeptoren für biologisch relevante Substrate wie Peptide, Zuckerphosphate oder Nucleinsäuren. Im Hinblick auf die Synthese von antibiotisch wirksamen Verbindungen ist insbesondere die Erkennung des Tripeptidfragments L-Lys-D-Ala-D-Ala bzw. des Depsipeptids L-Lys-D-Ala-D-Lac von Interesse. Im Vordergrund der Dissertation stehen aber systematische Untersuchungen zum Einfluss peripherer Substituenten auf die Substrataffinität bzw. –selektivität geeigneter Cyclopeptide.

Ein zweiter Teilaspekt der Dissertation beschäftigt sich mit der Entwicklung von Fluoreszenzrezeptoren auf Basis von substituierten Cyclopeptiden, welche einen quantitativen und qualitativen Nachweis von Anionen in Lösung gestatten. Hierfür muss das Cyclopeptid so

modifiziert werden, dass der Vorgang der Komplexbildung mit der Veränderung einer Eigenschaft, in diesem Falle der Fluoreszenz, verbunden ist. Die mögliche Wirkungsweise eines solchen Sensors ist in Abbildung 10 dargestellt. Ein kovalent an ein anionenbindendes Cyclopeptid gebundener Fluoreszenzfarbstoff bildet in Abwesenheit von Anionen einen intramolekularen Komplex mit dem Cyclopeptid. Bei Substratbindung wird der Farbstoff aus dem Hohlraum verdrängt, wodurch sich seine Fluoreszenz verändern sollte.

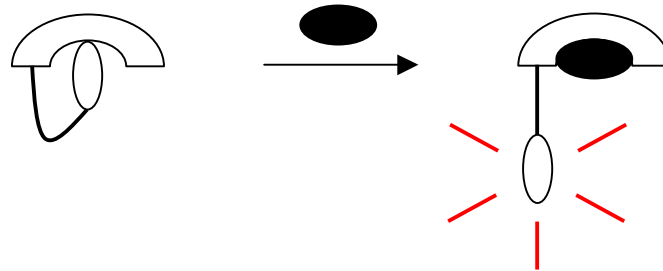


Abbildung 10. Wirkungsweise eines Anionensensors: Ein Substituent (weiß) wird bei der Komplexbildung eines Substrats (schwarz) aus dem Hohlraum verdrängt und verändert seine Fluoreszenz.

Fluoreszenzfarbstoffe, die zur Synthese solcher Sensoren eingesetzt werden können, wären z.B. Fluorescein und viele Farbstoffe, die als Label in der Biochemie Verwendung finden. Zur Realisierung dieses Konzepts sollten zunächst die entsprechenden einfach substituierten Cyclopeptide synthetisiert und anschließend auf ihre Eigenschaften untersucht werden.

2. DARSTELLUNG POTENTIELLER ANIONENREZEPTOREN UND CHARAKTERISIERUNG IHRER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN

2.1. CYCLOPEPTIDSYNTHESEN

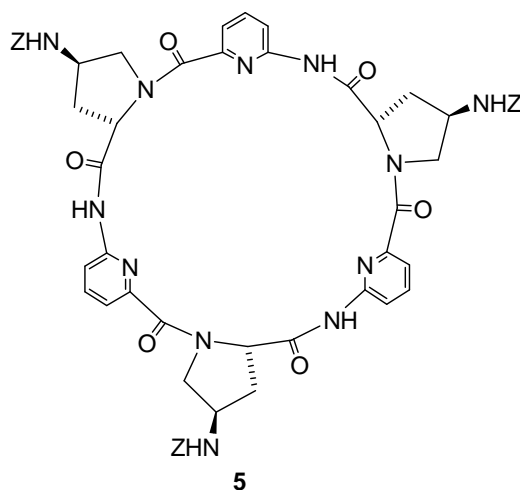
Für die Darstellung der Cyclopeptide **4a** bis **d** musste zunächst eine geeignete Synthesestrategie entwickelt werden. Dabei sind zwei prinzipiell unterschiedliche Wege denkbar. So könnten die Substituenten vor dem Aufbau des Cyclopeptids in die einzelnen Untereinheiten eingeführt oder erst im letzten Schritt mit dem fertigen Cyclopeptid verknüpft werden. Der Vorteil des zweiten, modularen Wegs ist der vergleichsweise geringere synthetische Aufwand, da alle Verbindungen **4a** bis **d** ausgehend von einer einzigen Cyclopeptidvorstufe zugänglich sind. Voraussetzung ist aber, dass die Kupplungsreaktionen im letzten Schritt mit guten Ausbeuten und stereochemisch einheitlich ablaufen müssen. Der Vorteil des sequentiellen Weges ist, dass auf der Stufe des Cyclopeptids keine weiteren Umsetzungen notwendig sind. Dieser Weg ist aber synthetisch erheblich aufwendiger, da für jedes Cyclopeptid eine neue Synthese notwendig ist. Daher wurde zunächst der modulare Weg favorisiert.

Eine zentrale Schlüsselstelle der Synthese ist die Generierung von 4-Aminoprolinderivaten mit der *R*-Konfiguration am C(γ)-Atom. Geht man bei der Synthese vom natürlichen *L*-Hydroxyprolin aus, muss die Substitution der OH-Gruppe durch die Aminogruppe also unter Retention (bzw. doppelter Inversion) des Stereozentrums am C(γ) verlaufen.

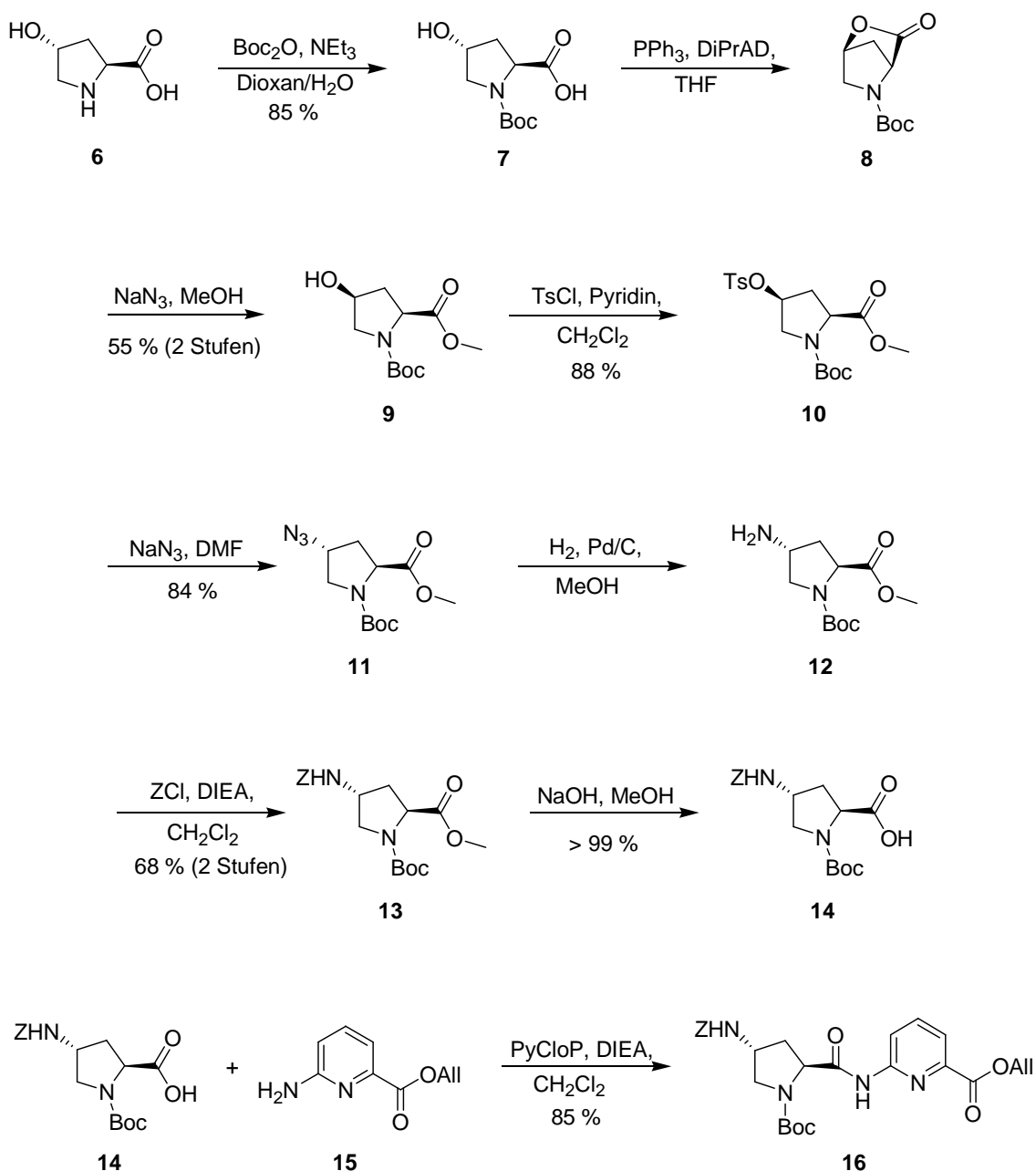
Erste Untersuchungen zur Synthese einer geeigneten Cyclopeptidgrundstruktur für den modularen Aufbau der Verbindungen **4a** bis **d** führte ich bereits während meiner Diplomarbeit durch. Es war mir möglich, eine Synthese für ein 4*R*-Amioprolin-haltiges Cyclopeptid zu entwickeln. Darauf aufbauend sollte der weitere modulare Aufbau der Cyclopeptide **4a** bis **d** erfolgen.

Cyclopeptid **5** sollte als Ausgangsverbindung für den modularen Aufbau der Cyclopeptide **4a** bis **d** dienen, wobei die Einführung der Substituenten nach dem Entfernen der *Z*-Schutzgruppen erfolgte. Die Synthese für **5** ist in Schema 1 und Schema 2 dargestellt.⁵⁵ Ausgehend von (4*R*)-4-Hydroxy-*L*-prolin **6** erfolgte nach der Boc-Schützung der Aminofunktion eine intramolekulare Mitsunobu-Reaktion zum Lacton **8**. Die Umsetzung des Lactons mit Methanol in Gegenwart von Natriumazid lieferte den Methylesters **9**. Nach der Tosylierung der Hydroxygruppe erhielt ich nach erneuter Inversion des Stereozentrums durch

nucleophile Substitution mit Natriumazid das Prolinderivat **11** mit identischer Konfiguration am C(γ) wie das ursprüngliche Hydroxyprolin. Anschließende Hydrierung führt zum (4*R*)-1-Boc-4-Amino-L-prolinmethylester **12**. Nach Z-Schützung des Amins zum Derivat **13**, Verseifung des Methylesters und Kupplung der dadurch erhaltenen freien Säure **14** mit 6-Aminopicolinsäureallylester **15** wurde das für den Aufbau von **5** notwendige Dipeptid **16** erhalten.



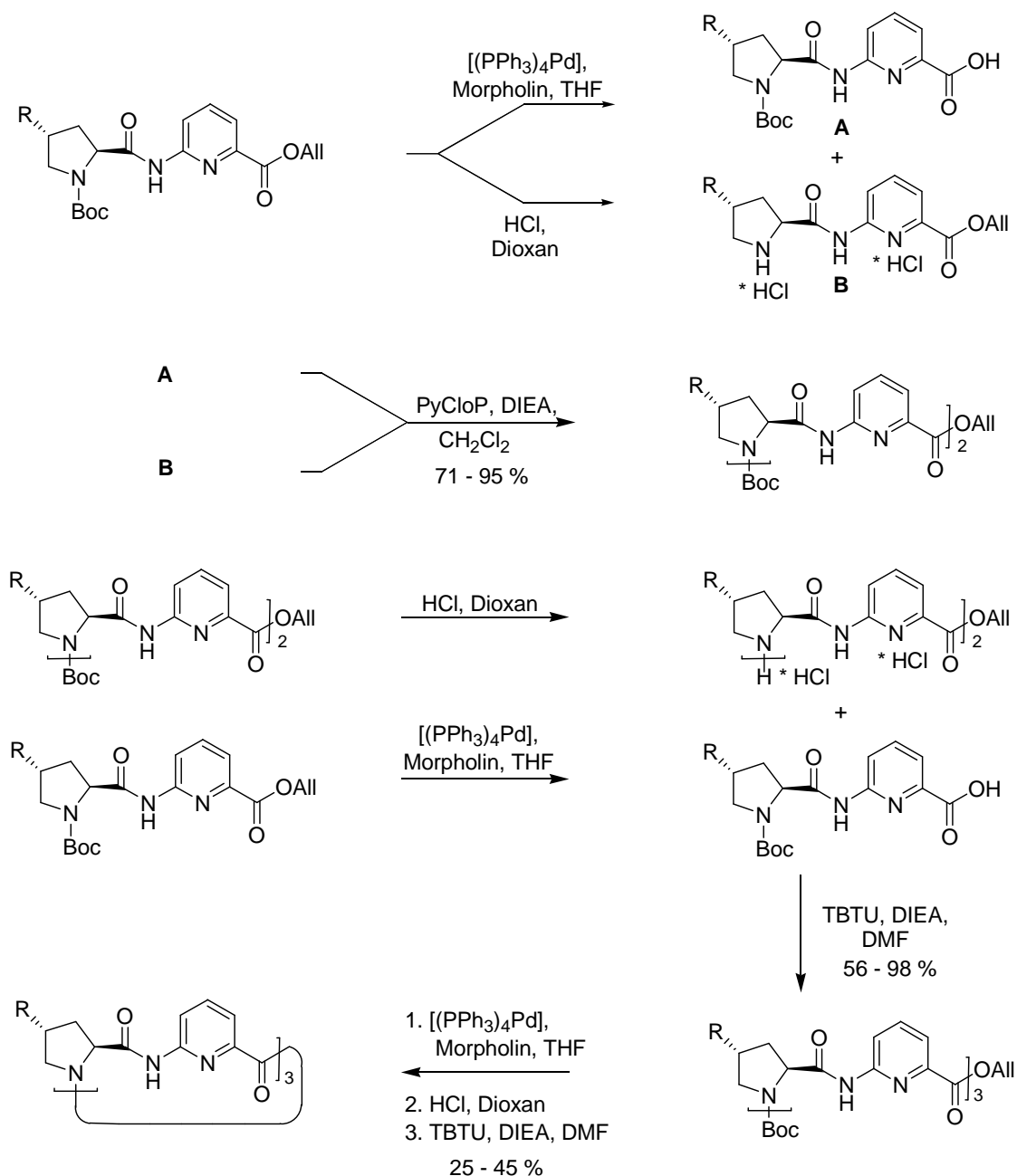
Bei der Entwicklung dieser Synthese waren die Schutzgruppenstrategie und die Generierung der 4*R*-konfigurierten Aminogruppen an den Prolinuntereinheiten die entscheidenden Kriterien. Die Boc-, Z- und Allyl-Schutzgruppe im Dipeptid **16** lassen sich in der erforderlichen Reihenfolge unabhängig voneinander abspalten. Der aufwendigste Teil in der Synthesestrategie war die Inversion am C(γ) des Hydroxyprolins.



Schema 1. Syntheseweg zum Dipeptid **16**.⁵⁵

Die Synthese des Cyclopeptids **5** aus **16** erfolgte nach den in der Arbeitsgruppe Kubik etablierten Methoden (Schema 2). Die Boc-Entschützungen wurden in 4 N HCl in Dioxan durchgeführt. Zur Entfernung der Allylschutzgruppe hat sich das Verfahren mit Tetrakis[triphenylphosphin]palladium(0) und Morpholin mit anschließender saurer Aufarbeitung bewährt. Die Ausbeuten der Entschützungen wurden in der Regel nicht bestimmt und die erhaltenen Produkte wurden ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt. Die Kupplungsreaktionen wurden bei der Synthese des Tetrapeptids mit PyCloP/DIEA in Methylenechlorid und bei der Reaktion zum Hexa- und Cyclopeptid mit

TBTU/DIEA in DMF durchgeführt. Bei der Cyclisierung wurde das Hexapeptid langsam mittels eines Perfusors zu einer Lösung des Kupplungsreagenzes zugegeben, wodurch eine hohe Verdünnung gewährleistet wurde, um die intramolekulare Reaktion zu favorisieren. Die Ausbeuten der Cyclisierungen liegen in der Regel bei etwa 25 bis 45 %.

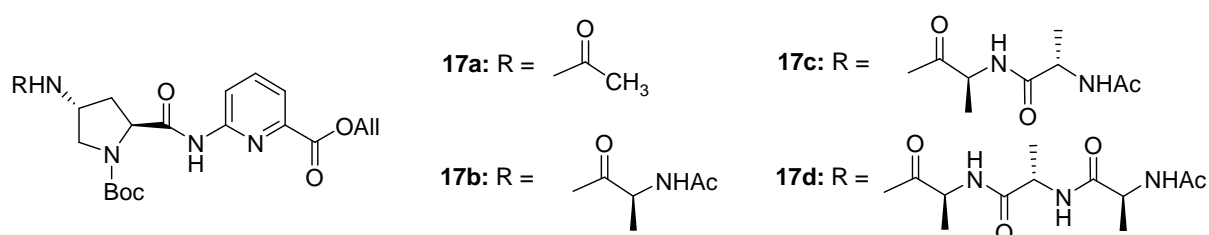


Schema 2. Allgemeiner Syntheseweg für die untersuchten Cyclopeptide.

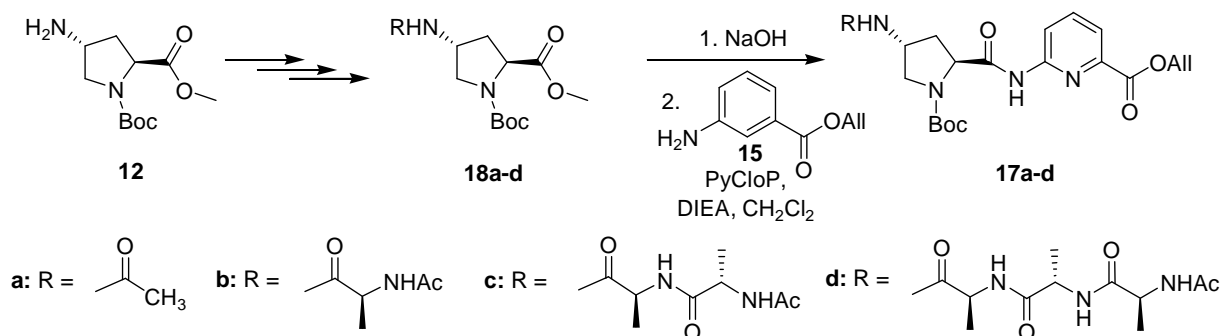
Ausgehend von **5** sollten die Cyclopeptide **4a** bis **d** durch hydrogenolytische Z-Entschützung und Einführung der entsprechenden Substituenten dargestellt werden. Diese Vorgehensweise erwies sich allerdings als problematisch. So entstand das gewünschte dreifach substituierte

Produkt bei Acetylierung des entsprechenden Triamins mit Acetanhydrid oder bei Umsetzung mit Ac-L-Ala-OH unter den Kupplungsbedingungen nur in inakzeptablen Ausbeuten. Dabei war es irrelevant, ob als Kupplungsreagenzien PyCloP/DIEA oder TBTU/DIEA verwendet wurde.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten beim modularen Aufbau der substituierten Cyclopeptide wurden im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich sequentielle Synthesen verfolgt. Die Substituenten wurden dabei schon zu einem früheren Zeitpunkt der Synthese eingeführt. Für den Aufbau der Cyclopeptide **4a-d** wurden dementsprechend die substituierten Dipeptide **17a-d** benötigt.



Die Synthese dieser Dipeptide sollte zunächst analog zur Synthese von **16** durchgeführt werden. Die Einführung der Substituenten musste also durch Modifizierung des Aminoprolins **12** erfolgen (Schema 3). Die dabei gebildeten Produkte **18a-d** können nach basischer Verseifung weiter zum entsprechenden Dipeptid aufgebaut werden.



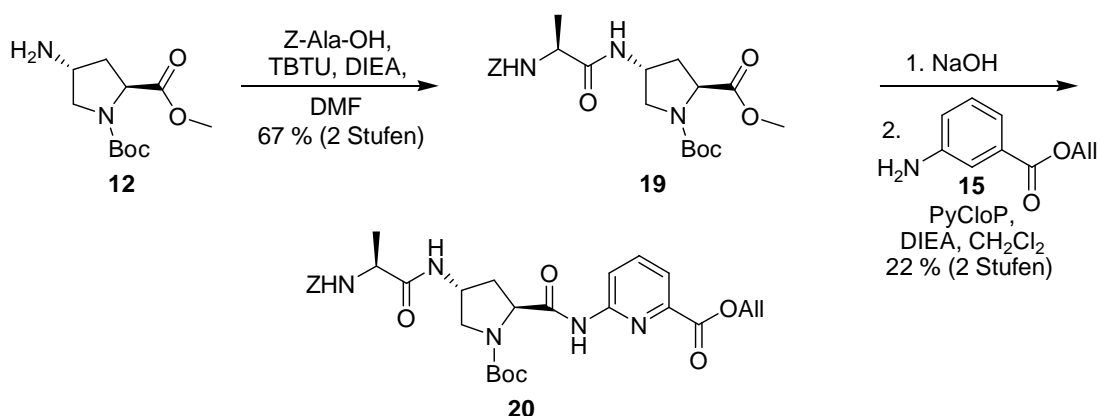
Schema 3. Plan zur Synthese der Dipeptide **17a-d** für den sequentiellen Aufbau der Cyclopeptide **4a-d**.

Zunächst wurden die Synthesen der substituierten Aminoprolin **18a** und **b** verfolgt. Beide gestalteten sich jedoch als schwierig. So verlief die Acetylierung von **12** mit Acetanhydrid nur mit mäßigen Ausbeuten zwischen 40 und 50 %.⁵⁶ Eine vielversprechende Alternative zur Synthese von **18a** bestand in der Umsetzung des Azids **11** mit Thioessigsäure, die nach T. Rosen direkt zum gewünschten acetylierten Amin führt.⁵⁷⁻⁵⁹ Bei dieser Reaktion konnte das

gewünschte Produkt zwar im Massen- und NMR-Spektrum nachgewiesen werden, die Aufreinigung der Reaktionsmischung ist jedoch nicht gelungen. Gleiches galt für die Umsetzung von **12** mit Thioessigsäure, so dass **18a** letztlich auf keinem der getesteten Wege in befriedigenden Ausbeuten und in ausreichender Reinheit erhalten werden konnte.

Bei der Synthese von **18b** durch Kupplung von **12** mit Acetyl-L-Alanin wurde in erheblichem Umfang die Racemisierung des Alanins beobachtet, unabhängig ob die Reaktion mit PyCloP/DIEA in Methylenchlorid bzw. TBTU/DIEA in DMF durchgeführt wurde. Damit ist **18b** ebenfalls nicht in einer für Cyclopeptidsynthesen einheitlichen Form zugänglich.

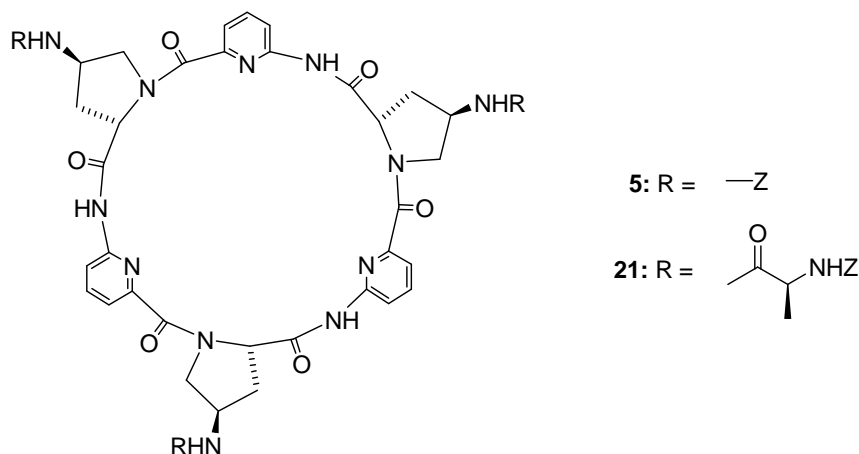
Die Racemisierung acetylierter Aminosäuren unter Kupplungsbedingungen ist in der Peptidchemie ein bekanntes Problem. Sie kann unterdrückt werden, wenn die Aminosäure eine Carbamatschutzgruppe, z.B. eine Boc- oder Z-Gruppe, trägt. Entsprechend verlief die Kupplung von **12** mit Z-L-Alanin sowohl mit PyCloP/DIEA in Methylenchlorid als auch mit TBTU/DIEA in DMF zu einem einheitlichen Diastereomer des entsprechenden Produkts **19**. Dieses kann nach Überführung in das Dipeptid **20** als Ausgangsprodukt für ein dem Cyclopeptid **4b** analogen Z-geschützten Derivat **21** dienen.



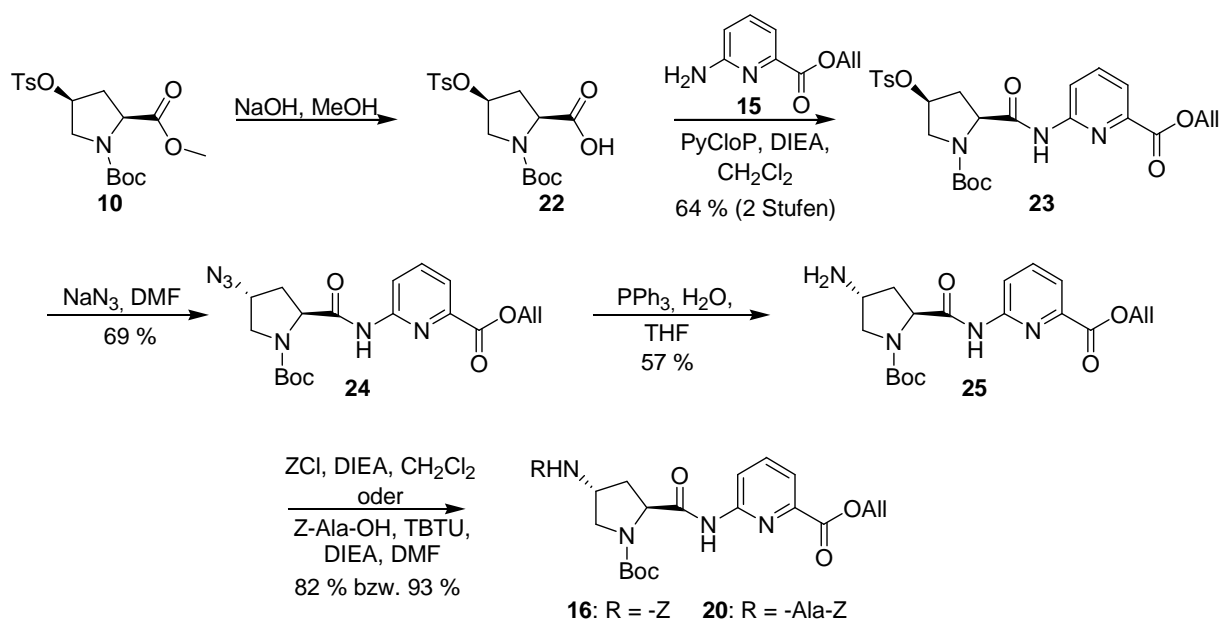
Schema 4. Synthese des Dipeptids **20**.

Ausgehend von **19** können auch die Derivate mit verlängerten Substituenten hergestellt werden. Die Synthesen dieser Verbindungen wurde im Rahmen dieser Dissertation aber nicht durchgeführt.

Zur Untersuchung des Einflusses von peripheren Substituenten auf die Bindungseigenschaften wurden neben dem unsubstituierten Cyclopeptid **1** zunächst lediglich die Z-geschützten Pendants zu **4a** und **b**, **5** und **21**, verwendet, wobei letzteres aus **20** analog der allgemeinen Vorschrift zum Aufbau der Cyclopeptide gemäß Schema 2 in 28 % Ausbeute analysenrein erhalten werden konnte.

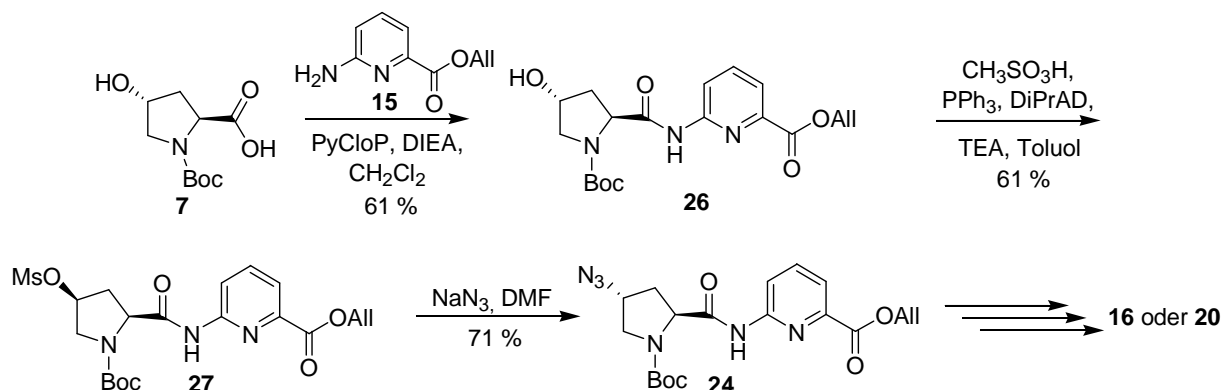


Im Verlaufe der Arbeiten wurden allerdings die Synthesen der beiden Cyclopeptide systematisch verkürzt und optimiert. So wurde auf dem in Schema 5 gezeigten Weg ein Dipeptid **25** mit einer freien Aminogruppe synthetisiert, das als gemeinsames Ausgangsprodukt für die Cyclopeptide **5** und **21** dienen kann. Bei diesem Weg wurde **10** zunächst basisch verseift, wobei unter den gewählten Bedingungen die Tosylgruppe stabil ist. Anschließend wurde die freie Säure **22** mit **15** und PyCloP/DIEA in Methylenchlorid zum Dipeptid **23** gekuppelt. Die Umsetzung mit Natriumazid in DMF bei 80°C lieferte das Azid **26**.⁵² Aufgrund der Allylschutzgruppe konnte die Reduktion des Azids zum Amin nicht hydrogenolytisch durchgeführt werden. Alternativ gelingt die Reaktion aber mit Hilfe der Staudinger-Reaktion, die auch von der Gruppe um V.J. Hruby erfolgreich zur Reduktion verschiedener Azidoprolinderivate angewendet wurde.⁶⁰ Das entsprechende Dipeptid Boc-[Apro-Apa]-OAll **25** konnte zwar nicht analysenrein erhalten werden, eine weitere Umsetzung mit ZCl und DIEA in Methylenchlorid oder Z-Alanin und TBTU/DIEA in DMF zu den Dipeptiden **16** bzw. **20** war jedoch problemlos möglich.



Schema 5. Neuer Weg zur Synthese der substituierten Dipeptide.

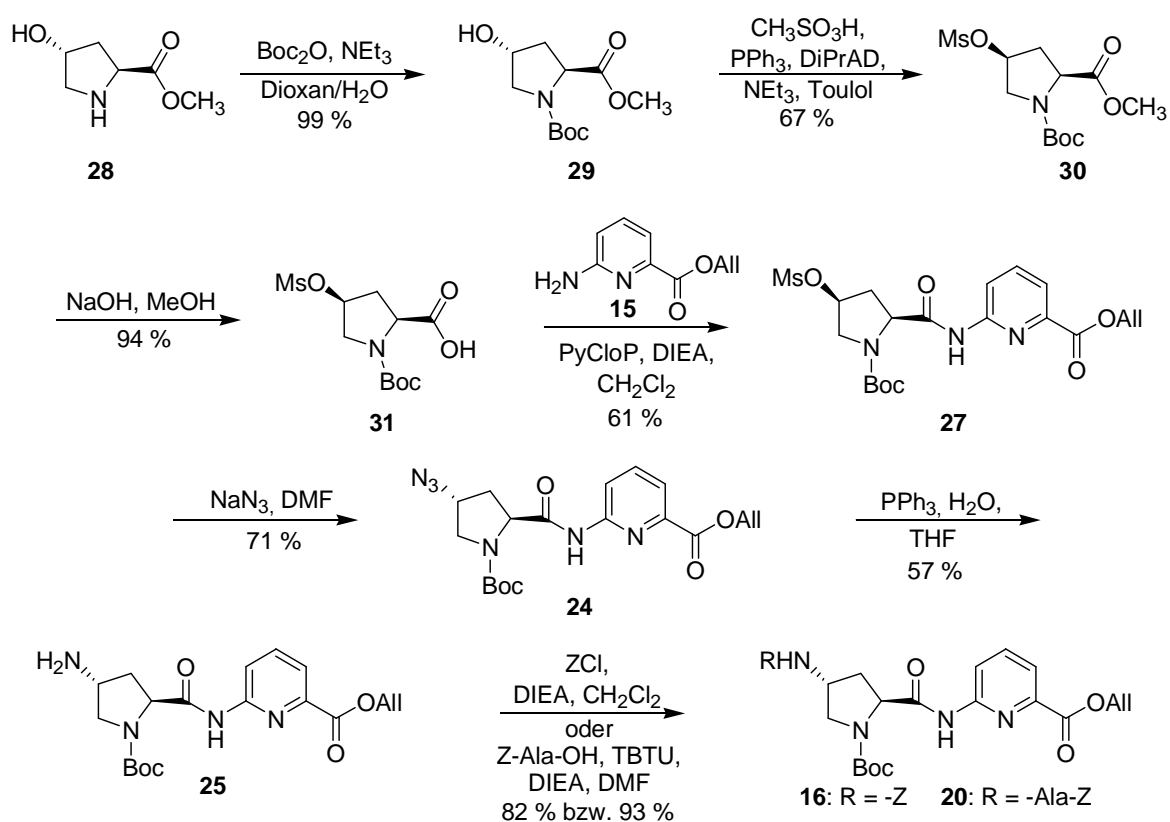
Zur weiteren Reduktion des präparativen Aufwands wurde versucht, das aus **7** und **15** zugängliche Dipeptid **26** in einer Stufe analog zu den Vorschriften von N.G. Anderson unter Inversion der Konfiguration am C(γ)-Atom zu mesylieren (Schema 6).^{61,62} Diese Reaktion, die zunächst in unbefriedigenden Ausbeuten von 20 % verlief, konnte in Zusammenarbeit mit dem Forschungspraktikanten S. Kunz durch Verwendung von frisch destillierten Reagenzien, einer Erhöhung der Reaktionstemperatur von 70°C auf 90°C und dem Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre auf über 60 % gesteigert werden. Ausgehend vom so erhaltenen Boc-[(Ms-Hyp)-Apa]-OAll **27** erfolgte die weitere Synthese wie vorher.



Schema 6. Verkürzte Dipeptidsynthese.

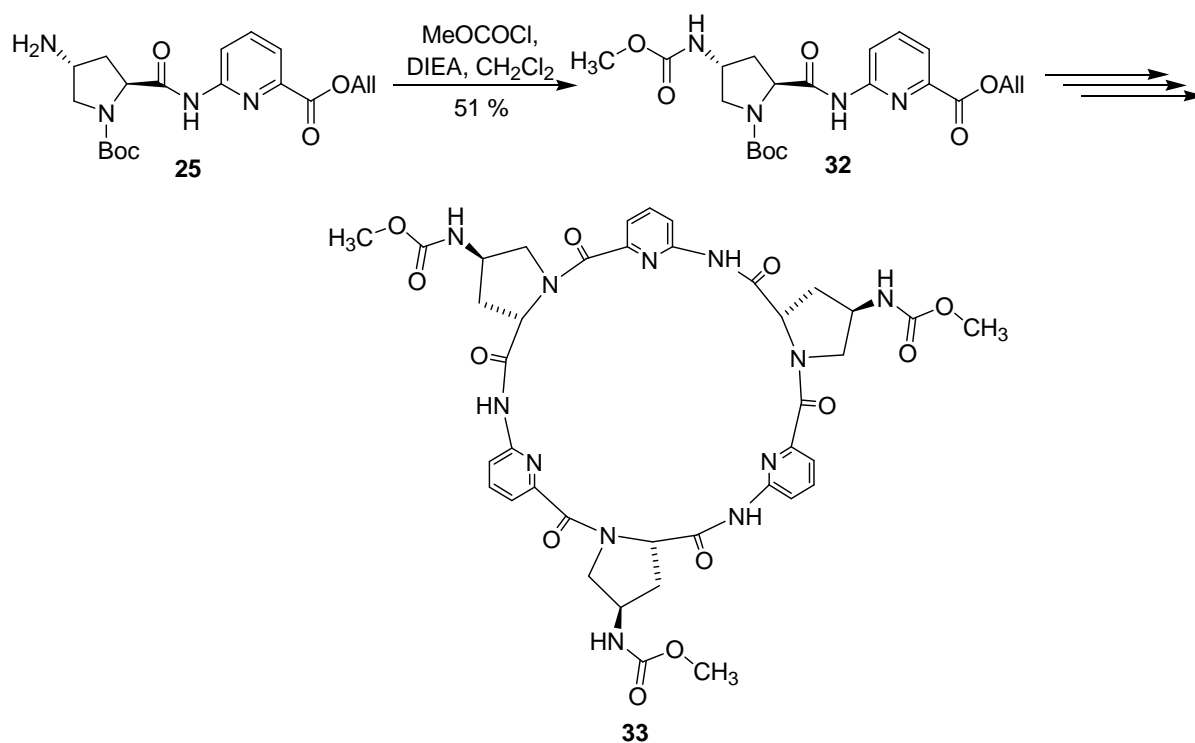
Auf dieser Route verringert sich die Cyclopeptidsynthese um drei Stufen. Allerdings war zu überlegen, ob die immer noch recht niedrige Ausbeute der Mitsunobu-Reaktion, die der

geringen Löslichkeit des Dipeptids **26** in Toluol zugeschrieben wurde, nicht zu umgehen ist. Die Reaktionsbedingungen sind ursprünglich für die Umsetzung von (4*R*)-1-Boc-4-Hydroxy-L-prolinmethylester **29** entwickelt worden.^{61,62} Tatsächlich verlief die Mitsunobu-Reaktion des Prolinderivats **29** mit Ausbeuten zwischen 65 und 70 %. Das Produkt wird auf dem in Schema 7 gezeigten Weg in die gewünschten Dipeptide **16** und **22** überführt. Auch wenn sich die Zahl der Stufen durch die Durchführung der Mitsunobu-Reaktion bereits auf der Stufe des Prolins wiederum erhöht, erscheint dieser Syntheseweg insgesamt am günstigsten. Er liefert die Cyclopeptide *cyclo*{[(*Z*-Apro)-Apa]₃} **5** und *cyclo*{[(*Z*-Ala-Apro)-Apa]₃} **21** in Gesamtausbeuten von etwa 2,2 und 2,8 %.



Schema 7. Optimierter Syntheseweg für die Dipeptide **16** und **20**.

Um einen möglichen Einfluss der aromatischen Einheiten im *Z*-geschützten Derivat **5** auf die Bindungseigenschaften zu untersuchen, wurde als weitere Referenzverbindung Cyclopeptid **33** auf einem analogen Syntheseweg dargestellt (Schema 8). Probleme machte allerdings der Aufbau des Hexapeptids, der wiederholt mit überraschend niedrigen Ausbeuten von etwa 30-34 % verlief. Die anschließende Cyclisierungsreaktion erfolgte aber wieder zufriedenstellend, so dass **33** mit einer Gesamtausbeute von 0,6 % analysenrein erhalten wurde.



Schema 8. Synthese des Cyclopeptids **33**.

Cyclopeptid **33** zeigte im Gegensatz zu den anderen von mir hergestellten Cyclopeptiden **5** und **21** eine hohe Tendenz zur Kristallisation. So wurden bei langsamer Verdampfung einer Lösung in 1,4-Dioxan/Wasser kleine Nadeln erhalten, die für eine Kristallstrukturanalyse ausreichende Qualität besaßen. Die Analyse wurde von R. Goddard am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mühlheim durchgeführt. Es konnten zwei unterschiedliche Strukturen identifiziert werden.

Die Struktur des Cyclopeptidrings im monoklinen Kristall von **33** ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Substituenten von **33** nehmen in dieser Struktur eine fast C₃-symmetrische Anordnung entlang der Anionenbindungsstelle des Cyclopeptids ein und erweitern so den Hohlraum, in dem die Substrate gebunden werden. Sowohl die NH-Protonen des Cyclopeptidrings und die zweier Carbamate als auch der Carbonylsauerstoff eines Carbamats bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu eingelagerten Wassermolekülen aus. Eine weitere Wasserstoffbrücke führt von einem Carbamat-NH zu einem Carbonylsauerstoff im Ring eines benachbarten Cyclopeptids. In Abbildung 11c ist die Kristallpackung dargestellt. Zur besseren Erkennbarkeit wurde ein Cyclopeptidmolekül und die Wasserstoffbrücke zum benachbarten Cyclopeptidmolekül hervorgehoben.

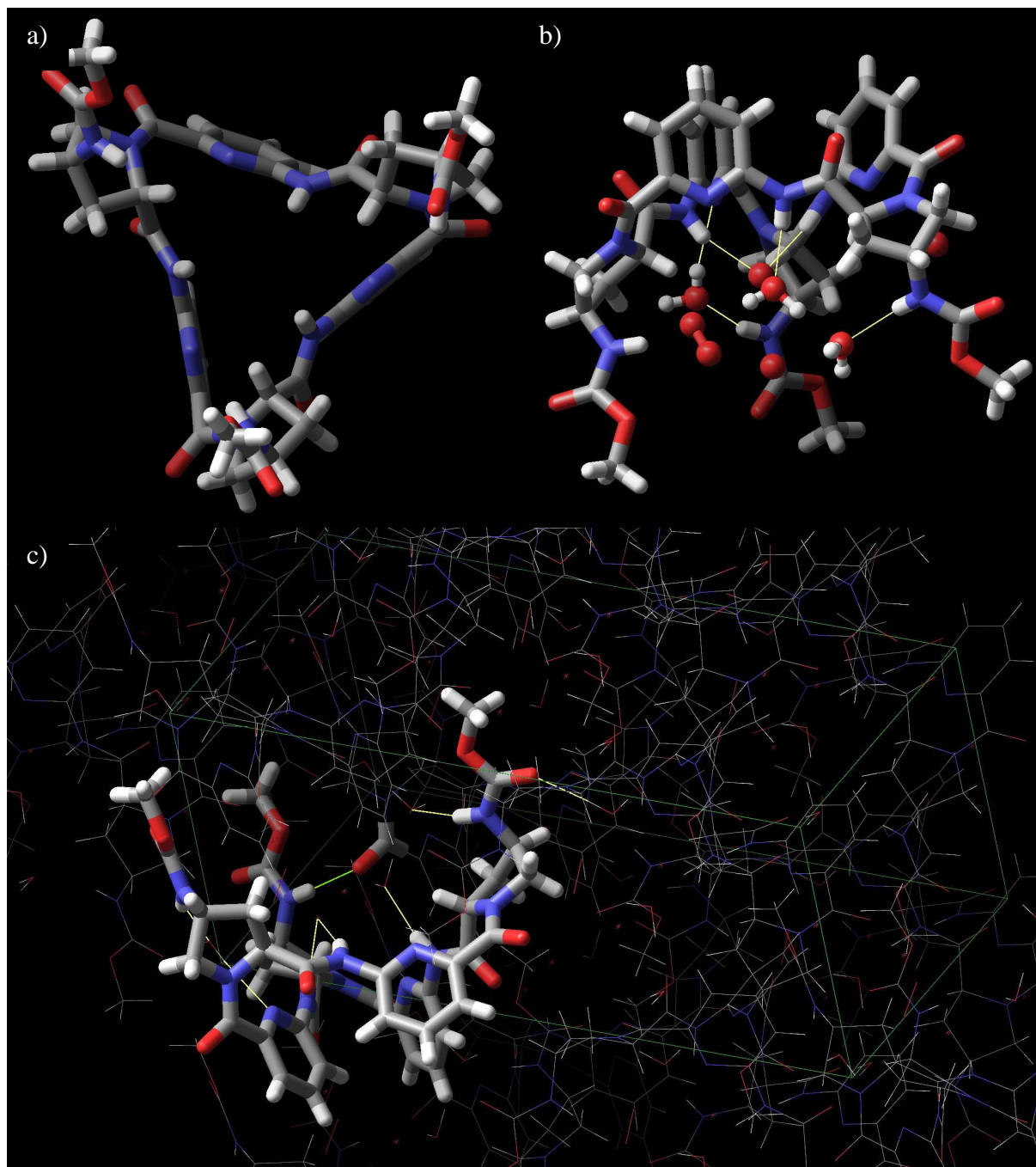


Abbildung 11. Monokline Kristallstruktur von $\text{cyclo}\{[(\text{MeOCO-Apro})\text{-Apa}]_3\}$ **33** von a) unten, b) der Seite inklusive Kristallwasser und c) im Kristallgitter (grün: Wasserstoffbrücke von AproNH zu RingCO , gelb: Wasserstoffbrücken zu Kristallwasser).

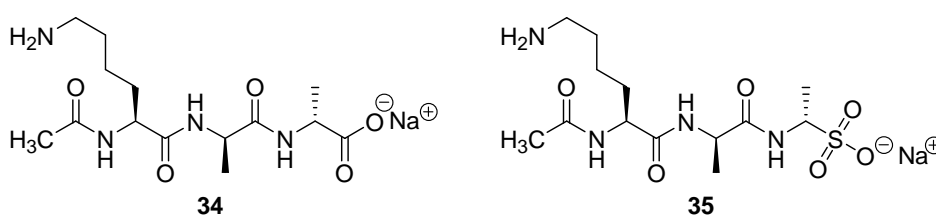
Die zweite, trikline Kristallstruktur, unterscheidet sich nur unwesentlich von der dargestellten monoklinen Struktur. Trotz unterschiedlicher Umgebung sind die Konformationen der Cyclopeptide in beiden Kristallen in etwa identisch. Die größten Differenzen treten in der Anordnung der Substituenten auf, wobei in der triklinen Struktur ein Substituent fehlgeordnet ist. Die Anzahl der Kristallwasser beträgt im Fall des monoklinen Kristallgitters sieben

eingelagerte Wassermoleküle und im Fall des triklinen nur sechs. Die Konformationen der Cyclopeptidringe in beiden Strukturen entsprechen im Wesentlichen derjenigen, die im Kristall bereits für das Cyclopeptid **1** beobachtet wurde, was zeigt, dass der eigentliche Cyclopeptidring relativ starr ist und man in Lösung eine analoge Konformation erwarten kann.

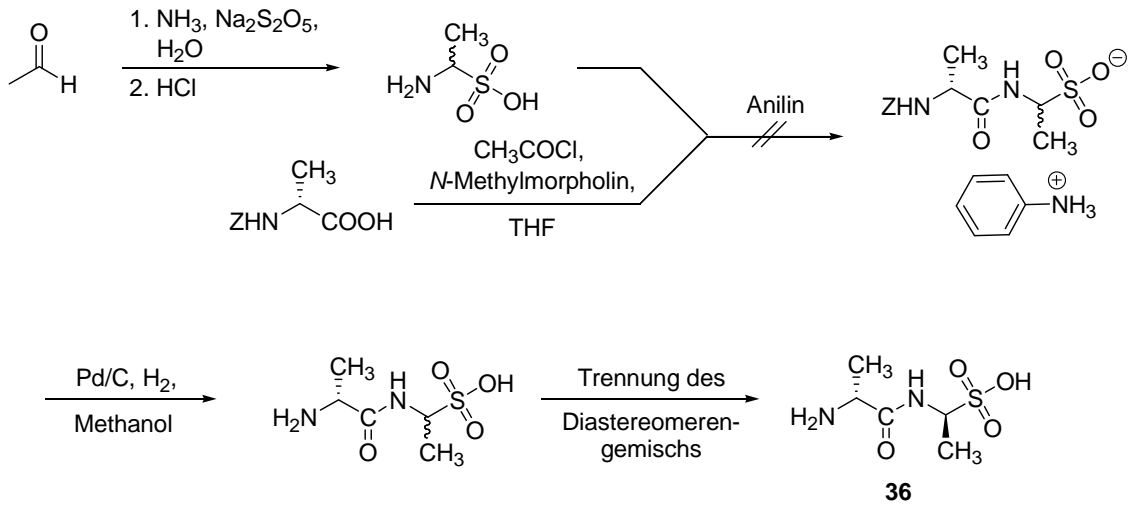
2.2. SUBSTRATSYNTHESEN

Die von mir synthetisierten Cyclopeptide sollten zur Komplexierung organischer Anionen eingesetzt werden, wobei die um den Cyclopeptidhohlraum angeordneten Substituenten zur Kontrolle der Bindungselektivität dienen. Fernziel ist die Entwicklung von Rezeptoren für die sequenzselektive Peptiderkennung. Dementsprechend sind Aminosäuren oder kurzkettige Peptide, z.B. das Tripeptid L-Lys-D-Ala-D-Ala, an welches Vancomycin bindet, besonders interessante Substrate für die Bindungsstudien.

Eine Vielzahl geeigneter geschützter Aminosäuren und Peptide ist kommerziell erhältlich. Grundsätzlich besteht bei den Untersuchungen zur Wechselwirkung von Carboxylaten mit synthetischen Rezeptoren in wässrigen Lösungen aber das Problem, dass der Protonierungsgrad von Carboxylatgruppen konzentrationsabhängig ist und eine vollständige Deprotonierung bei verschiedenen Konzentrationen nur durch Verwendung von Puffern gewährleistet werden kann. Puffer bestehen jedoch aus Salzen, deren Anionen mit den interessierenden Substraten um die Bindungsstellen am Rezeptor konkurrieren können. Um diese Problematik zunächst zu vermeiden, wurden als Substrate Analoga von Aminosäuren synthetisiert, die eine Sulfonatgruppe anstelle der Carboxylatgruppe enthalten. Als Salz einer starken Säure liegen Sulfonate unabhängig von der Konzentration bei neutralem pH vollständig deprotoniert vor. Ein besonders interessantes Substrat wäre die dem Tripeptid Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala **34** strukturell verwandte Ac-L-Lys-D-Ala-1*S*-aminoethansulfonsäure **35**.

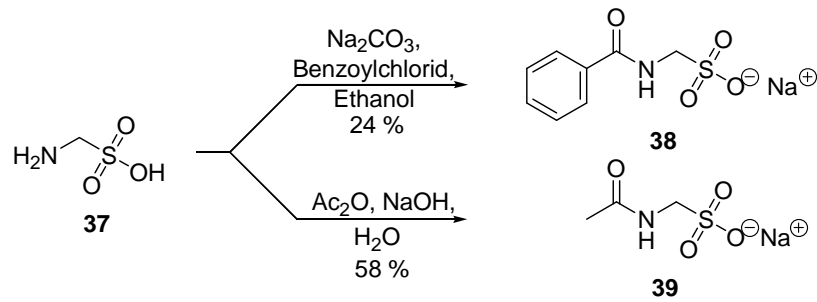


Die Synthese von Z-D-Ala-1*S*-aminoethansulfonsäure **36**, die als Ausgangsprodukt zur Synthese von **35** dienen kann, ist bekannt. Meine Bemühungen, diese Verbindung zu synthetisieren, schlugen jedoch leider fehl. Es gelang zwar die Synthese der Aminoethansulfonsäure aus Acetaldehyd und Natriumbisulfit unter Zugabe von konzentrierter Ammoniaklösung als racemisches Gemisch,⁶³ die Kupplung mit Z-D-Alanin zum Dipeptidanalogen nach einer literaturbekannten Methode über ein gemischtes Anhydrid mit Chlorameisensäureethylester führte jedoch nicht zum Erfolg (Schema 9).⁶⁴



Schema 9. Literatursynthese für Z-D-Ala-1S-aminoethansulfonsäure **36**,^{63,64} die Kupplung zum Dipeptid war nicht nachvollziehbar.

Für die Bindungsstudien wurden daher geschützte Derivate der kommerziell erhältlichen Aminomethansulfonsäure **37** eingesetzt. Das benzylierte Derivat **38** wurde durch die Reaktion von Benzoylchlorid in Gegenwart von Natriumcarbonat hergestellt, das acetylierte Derivat **39** durch Umsetzung von Aminomethansulfonsäure **37** mit Acetanhydrid und Natronlauge (Schema 10).⁶⁵



Schema 10. Synthese der Sulfonate **38** und **39**.

2.3. BINDUNGSSTUDIEN

2.3.1. METHODEN

In systematischen Bindungsstudien wurde nun der Einfluss der peripheren Substituenten in den Cyclopeptiden **5** und **21** auf die Anionenaffinität studiert. Als Vergleichsverbindung wurde das unsubstituierte Cyclopeptid **1** in diese Untersuchungen mit einbezogen. Im Folgenden sind die theoretischen Hintergründe der verschiedenen Methoden, die zur Ermittlung der Komplexstöchiometrie und -stabilitätskonstanten angewendet wurden, kurz erläutert.

Massenspektrometrie:

Bei der Elektrospray-Ionisation (ESI) handelt es sich um ein außerordentlich mildes Verfahren der Ionisation durch Versprühen einer Lösung der zu untersuchenden Verbindung. Auf diese Weise können auch nicht-kovalente Aggregate, z.B. Anionenkomplexe der Cyclopeptide, in die Gasphase überführt werden.⁵⁰ Die für die Massenspektrometrie notwendige Ladung des Aggregats ist auf die Ladung des gebundenen Anions zurückzuführen.

Zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie wurden äquimolare Lösungen des Rezeptors und Substrats (je 10 μM) in 40 % Wasser/Methanol hergestellt und vermessen.

Job-Plot:

In Anwesenheit von Anionen, die an die Cyclopeptide **1** und **2** binden, beobachtet man in ^1H -NMR-Spektren einen deutlichen Tieffeldshift des Signals der Prolin-H(α)-Protonen des Rezeptors im Vergleich zum freien Cyclopeptid. Gleichzeitig wandern die Signale der 6-Aminopicolinsäureuntereinheiten zu höherem Feld. Die Ursache für die Verschiebung der H(α)-Signale ist die räumliche Nähe der negativ geladenen Gäste zu den entsprechenden Rezeptorprotonen im Komplex. Diese führt zu einer Verringerung der Elektronendichte an diesen Protonen aufgrund von repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen. Umgekehrt erhöht sich die Elektronendichte der aromatischen Ringe, was den Hochfeldshift erklärt.

Da in den Spektren nur gemittelte Signale für freien Rezeptor und Komplex beobachtet werden, ist das Gleichgewicht schnell auf der NMR-Zeitskala und eine Bestimmung der Komplexstöchiometrie mittels der Methode der kontinuierlichen Variation (Job-Plot) ist möglich. Hierbei werden NMR-Spektren verschiedener Proben mit jeweils unterschiedlicher Rezeptor- und Substrat-, aber konstanter Gesamtkonzentration vermessen.⁶⁶⁻⁶⁸ Die Konzentration des Rezeptors nimmt dabei stetig ab, wobei die Konzentration des Substrats im gleichen Verhältnis ansteigt. Die Auswertung erfolgt durch Beobachtung der Änderung der chemischen Verschiebung eines Signals des Wirts oder Gasts im Vergleich zur unkomplexierten Verbindung.

Die Signale im ¹H-NMR-Spektrum, die für die Auswertung herangezogen werden, ergeben sich aus dem Mittelwert der konzentrationsabhängigen Verschiebungen des reinen Rezeptors und des reinen Komplexes.

$$\Delta\delta = \delta - \delta_0 \quad [1]$$

δ : chemische Verschiebung im Komplex

δ_0 : chemische Verschiebung der freien Komponente

Verfolgt man das Signal des Rezeptors, wird der Molenbruch X_R , der sich aus der Ausgangskonzentrationen des Rezeptors $[R]_0$ und der Gesamtkonzentration ergibt, definiert als:

$$X_R = \frac{[R]_0}{[R]_0 + [S]_0} = \frac{[R]_0}{c_0} \quad [2]$$

$[R]_0$: Ausgangskonzentration des Rezeptors

$[S]_0$: Ausgangskonzentration des Substrats

c_0 : Gesamtkonzentration

Im Job-Plot erfolgt die Auftragung des Produktes $\Delta\delta \cdot X_R$ als Funktion des Molenbruchs. Der Mittelwert der chemischen Verschiebung aus freiem Rezeptor und Komplex ergibt sich aus:

$$\delta = \frac{[R]}{[R]_0} \delta_0 + \frac{[K]}{[R]_0} \delta_K \quad [3]$$

$[R]$: Konzentration an freiem Rezeptor

$[K]$: Konzentration des Komplexes

Setzt man nun Gleichung [3] in Gleichung [1] ein und formt das Ergebnis unter Berücksichtigung, dass der Rezeptor n-mal im Komplex enthalten ist, um, erhält man:

$$\begin{aligned} \Delta\delta &= \frac{[\text{R}]}{[\text{R}]_0} \delta_0 + \frac{[\text{K}]}{[\text{R}]_0} - \delta_0 = \left(\frac{[\text{R}]}{[\text{R}]_0} - 1 \right) \delta_0 + \frac{[\text{K}]}{[\text{R}]_0} \delta_K = -\frac{n \cdot [\text{K}]}{[\text{R}]_0} \delta_0 + \frac{[\text{K}]}{[\text{R}]_0} \delta_K \\ &= \frac{[\text{K}]}{[\text{R}]_0} (\delta_K - n \cdot \delta_0) \end{aligned} \quad [4]$$

Für den Wert, der beim Job-Plot als Ordinate aufgetragen wird, erhält man somit:

$$\Delta\delta \cdot X_R = \frac{[\text{K}]}{[\text{R}]_0} (\delta_K - n \cdot \delta_0) \frac{[\text{R}]_0}{c_0} = \frac{(\delta_K - n \cdot \delta_0)}{c_0} [\text{K}] \quad [5]$$

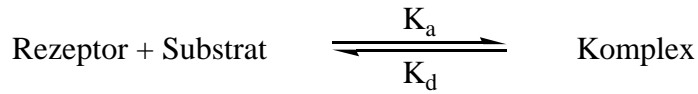
$\Delta\delta \cdot X_R$ ist damit direkt proportional zur Komplexkonzentration, welches die einzige Variable in Gleichung 5 ist. Dieser Wert erreicht gerade dann sein Maximum, wenn die Ausgangskonzentrationen von Rezeptor und Substrat im gleichen Verhältnis wie im Komplex zueinander vorliegen. An der Lage des Maximums kann man also auf der Abszisse die Komplexstöchiometrie ablesen.

Ein analoger Formalismus ergibt sich, wenn in den NMR-Spektren die Verschiebung eines Substratsignals anstelle eines Rezeptorsignals verfolgt wird.

NMR-Titrationsen:

Ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung der Bindungskonstante eines Komplexes ist die NMR-Titration.^{69,70} Dabei wird z.B. zu verschiedenen Proben mit konstanter Rezeptorkonzentration eine ansteigende Menge des Substrats gegeben und anschließend die ¹H-NMR-Spektren aufgenommen. Durch Verfolgen eines ausgewählten Rezeptorsignals und Auftragen der chemischen Verschiebung im Verhältnis zur reinen Rezeptorlösung gegen das molekulare Verhältnis von Substrat zu Rezeptor, erhält man eine Sättigungskurve, aus der sich durch nicht-lineare Regression die Bindungskonstante des Komplexes bestimmen lässt. Die Konzentrationen von Rezeptor und Substrat sollten möglichst so gewählt werden, dass am Ende der Titration das Gleichgewicht zu ca. 75 – 80 % auf der Seite des Komplexes liegt.⁷¹ Das umgekehrte Vorgehen ist ebenfalls möglich.

Für einen 1:1 Komplex lässt sich das Massenwirkungsgesetz folgendermaßen aufstellen:



K_a : Bindungskonstante

K_d : Dissoziationskonstante

$$K_a = \frac{[K]}{[R][S]} \quad [6]$$

[K]: Komplexkonzentration

[R]: Rezeptorkonzentration

[S]: Substratkonzentration

Die chemische Verschiebung δ des beobachteten Signals setzt sich konzentrationsabhängig zusammen aus der chemischen Verschiebung δ_0 des reinen Rezeptors und der des reinen Komplexes δ_{\max} .

$$\delta = \frac{[R]_0 - [K]}{[R]_0} \cdot \delta_0 + \frac{[K]}{[R]_0} \cdot \delta_{\max} \quad [7]$$

$[R]_0$: Ausgangskonzentration Substrat

Umgeformt ergibt sich daraus:

$$\frac{\delta - \delta_0}{\delta_{\max} - \delta_0} = \frac{[K]}{[R]_0} \quad [8]$$

Unter Berücksichtigung von

$$[R] = [R]_0 - [K] \quad [9]$$

und

$$[S] = [S]_0 - [K] \quad [10]$$

$[S]_0$: Ausgangskonzentration Rezeptor

lässt sich Gleichung [6] umformen zu:

$$K_a = \frac{[K]}{([R]_0 - [K]) \cdot ([S]_0 - [K])} \quad [11]$$

Aus dieser Gleichung erhält man durch Auflösen nach der Komplekonzentration das folgende Ergebnis:

$$[K] = \frac{[R]_0 + [S]_0 + K_a^{-1}}{2} - \sqrt{\frac{([R]_0 + [S]_0 + K_a^{-1})^2}{4} - [R]_0[S]_0} \quad [12]$$

Durch Einsetzen von Gleichung [12] in [8] erhält man:

$$\Delta\delta = \frac{\delta_{\max} - \delta_0}{[R]_0} \left(\frac{[R]_0 + [S]_0 + K_a^{-1}}{2} - \sqrt{\frac{([R]_0 + [S]_0 + K_a^{-1})^2}{4} - [R]_0[S]_0} \right) \quad [13]$$

Somit ist der durch die NMR-Messungen bestimmbare Shift des beobachteten Signals $\Delta\delta$ abhängig von den Gesamtkonzentrationen von Rezeptor und Substrat. Durch Anpassung der ermittelten Titrationskurve mit Hilfe nicht-lineare Regression lassen sich nun die gesuchten Parameter K_a und δ_{\max} bestimmen.

Isotherme Titrationskalorimetrie:

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine weitere Methode zur Bestimmung von Komplexbildungskonstanten.⁷²⁻⁷⁴ Im Gegensatz zu spektroskopischen Verfahren ist sie unabhängig davon, ob sich bei Komplexbildung eine Veränderung im Spektrum von Wirt oder Gast ergibt. Bei der ITC wird direkt die Wärmemenge bestimmt, die bei der Komplexbildung in Abhängigkeit vom Molverhältnis von Gast und Rezeptor frei bzw. benötigt wird. Nach Auswertung der Titrations erhält man die Komplexbildungsenthalpie und die Bindungskonstante, woraus sich unter Berücksichtigung der van't Hoff'schen Gleichung [14] und der Gibbs-Helmholtz-Beziehung [15] auch die Komplexbildungsentropie berechnen lässt. Mit einer einzigen Titration sind also alle thermodynamischen Parameter der Komplexbildung zugänglich.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_a \quad \text{van't Hoff'sche Gleichung} \quad [14]$$

ΔG^0 : freie Bildungsenthalpie

R: Gaskonstante

T: Temperatur

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad \text{Gibbs-Helmholtz-Gleichung} \quad [15]$$

ΔH^0 : Bildungsenthalpie

ΔS^0 : Bildungsentropie

Um eine Mikrokalorimetrie Messung erfolgreich durchzuführen, sind mehrere Faktoren wie die erwartete Bindungskonstante, Konzentration und Komplexstöchiometrie zu beachten. Man definiert daher einen kritischen Parameter c über die Bindungskonstante K_a , die Gesamtkonzentration des Rezeptors $[R]_0$ und den Stöchiometriefaktor des Komplexes N , der den Kurvenverlauf der Komplexbildungsisothermen voraussagt.

$$c = K_a \cdot [R]_0 \cdot N \quad [16]$$

In Abbildung 12 sind theoretische Komplexbildungsisothermen für unterschiedliche Werte von c dargestellt. Bei hohen Werten für c , z.B. aufgrund hoher Bindungskonstanten, bildet sich ein beinahe rechteckiger Kurvenverlauf, dessen Wendepunkt exakt bei N liegt und dessen Höhe genau ΔH^0 entspricht. Der Kurvenverlauf ändert sich nicht mehr für höhere Werte von K_a . Für sehr kleine c -Werte, z.B. bei niedrigen Konzentrationen, verliert die Isotherme ihren sigmoiden Verlauf. Ein Äquivalenzpunkt kann nicht mehr bestimmt werden, die Linie erscheint fast waagrecht. Daher wird geraten, das Experiment so anzusetzen, dass Konzentration, Bindungskonstante und Stöchiometrie zu c -Werten zwischen 5 und 500 führen, damit die Titrationskurven verlässlich ausgewertet werden können.⁷⁵ Aufgrund niedriger Löslichkeit und niedrigen Komplexbildungskonstanten kann es aber durchaus vorkommen, dass der Wert von c unterhalb der angeratenen Größenordnung liegt. Auch in diesem Fall ist es möglich, die Komplexbildungskonstante K_a und die Enthalpie ΔH^0 zu bestimmen. Es ist aber größere Vorsicht bei der Interpretation der Werte geboten.^{76,77}

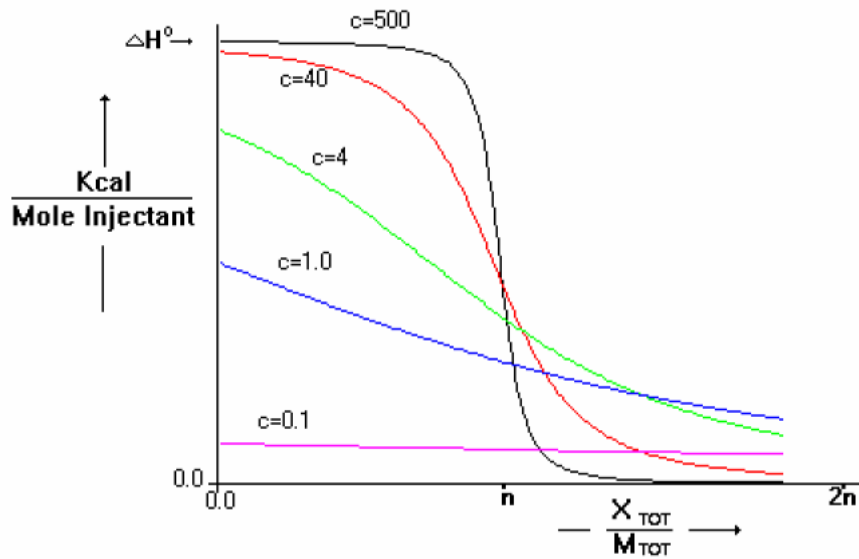


Abbildung 12. Erwartete Titrationskurven für verschiedene Werte von c in Abhängigkeit vom Molenbruch X_{Tot}/M_{Tot} .⁷⁵

Für die Durchführung einer Mikrokalorimetrietitration wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Stammlösung des Rezeptors und eine des Gastes angesetzt.^{78,79} Die Lösung mit dem Cyclopeptid wurde in die Messzelle gefüllt. Die Gastlösung in der Injektionsspritze wurde während der Messungen in äquivalenten Mengen hinzugegeben. In der Referenzzelle befand sich das Lösungsmittelgemisch, welches auch für die Messung verwendet wurde. Zur Bestimmung von Verdünnungswärmen wurde eine Referenztitration durchgeführt, bei der die Gastlösung unter den gleichen Bedingungen wie bei der eigentlichen Messung in reines Lösungsmittel titriert wurde. Die Werte für die Referenzmessung wurden von denen der Hauptmessung subtrahiert. Aus der Titrationskurve wurden dann mit Hilfe von MicroCal Origin die Werte für die Bindungskonstante der thermodynamischen Parameter für die untersuchten Komplexe unter Verwendung des One-Sites-Modells bestimmt.

2.3.2. SULFONATE

2.3.2.1. DMSO

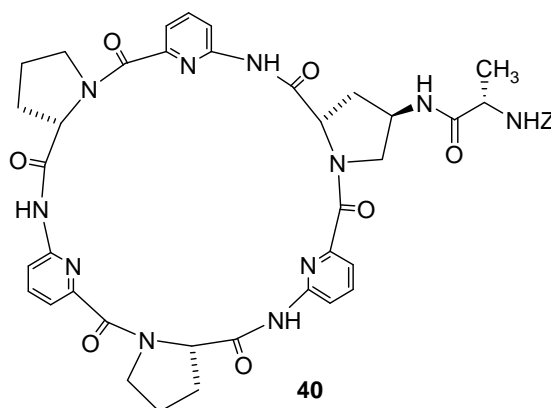
Die qualitativen und quantitativen Bindungsstudien der substituierten Cyclopeptiden **5** und **21** mit den Modelsubstraten **38** und **39** wurden zunächst in DMSO durchgeführt, um erste Hinweise auf den Einfluss der peripheren Substituenten auf die Bindungseigenschaften der Cyclopeptide zu erhalten. Das unsubstituierte Cyclopeptid **1** bindet in DMSO anorganische Anionen, z.B. Iodid, in Form von 1:1 Komplexen, so dass diese Stöchiometrie auch für die substituierten Cyclopeptide erwartet wurde.⁵³ Die ¹H-NMR-Spektren zeigen, dass **5** und **21** in DMSO-*d*₆ im zeitlichen Mittel C₃-symmetrische Konformationen annehmen. Die Komplexbildung war eindeutig an dem charakteristischen Tieffeldshift der H(α)-Protonen des jeweiligen Cyclopeptids bei Anionenzugabe erkennbar.⁵⁰ Dies lässt darauf schließen, dass die gebildeten Komplexe strukturell denen von **1** oder **2** ähneln.⁵³

Die Bindungskonstanten der Cyclopeptide mit den verschiedenen Gästen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Sulfonate **38** und **39** werden von den Cyclopeptiden mit einer Bindungsaffinität von etwa 10³ bis 10⁴ M⁻¹ gebunden. Sie liegen damit etwa in der Größenordnung der Bindungskonstante des Komplexes zwischen **1** und Benzolsulfonat (K_a = 3500 M⁻¹).⁸⁰ Weiterhin hat die Struktur der Substituenten wenig Einfluss auf die Komplexstabilität, wie der Vergleich der Komplexe von **5** und **33** jeweils mit **38** (K_a = 2140 bzw. 2350 M⁻¹) zeigt. Auffällig ist allerdings, dass das unsubstituierte Cyclopeptid **1** die Aminomethansulfonsäure **38** etwa dreimal so gut bindet wie Benzolsulfonat. Hierfür könnten stabilisierende Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Einheiten von Rezeptor und Gast, die aufgrund der erhöhten Flexibilität von **38** im Vergleich zum Benzolsulfonat möglich sein sollten, verantwortlich sein. Eine Vergleichstitration von **1** mit dem nicht-aromatischen Sulfonat **39** lieferte zwar mit K_a = 4980 M⁻¹ eine um etwa die Hälfte reduzierte Bindungskonstante, der Wert liegt aber immer noch deutlich über denen der anderen Cyclopeptid-Sulfonat-Komplexe. Eine abschließende Erklärung steht also noch aus. Auch NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Komplexgeometrie in Lösung lieferten keine eindeutigen Ergebnisse über Besonderheiten bei der Komplexierung von **38** durch **1**.

Tabelle 1. Assoziationskonstanten der Cyclopeptide mit den Sulfonaten **38** und **39** ermittelt durch NMR-Titration in DMSO- d_6 . Verfolgt wurde jeweils der Shift der H(α)-Protonen des Cyclopeptids (K_a in M^{-1} , Fehler < 15 %).

Cyclopeptid	Substrat	K_a
1	38	9440
1	39	4980
5	38	2140
33	38	2350
21	38	3200

Das unsymmetrische Cyclopeptid **40**, eine Verbindung mit zwei unsubstituierten und einer Z-Alanin-Amino-substituierten Prolinuntereinheiten, wurde ebenfalls in DMSO- d_6 auf seine Affinität zu dem Sulfonat **38** und zu Tosylat untersucht. Dieses Cyclopeptid wurde zur Entwicklung optischer Sensoren hergestellt (Kapitel 4.3), könnte aber aufgrund seiner strukturellen Verwandtschaft mit **1** und **21** auch Informationen zur Anionenkomplexierung liefern.



Im Gegensatz zu den C_3 -symmetrischen Verbindungen **1** und **21** sind bei **40** die chemischen Verschiebungen der drei H(α)-Protonen verschieden, so dass aus den Shifts aller drei Signale bei Komplexbildung Bindungskonstanten ermittelt werden konnten (Abbildung 13). Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Man erkennt, dass die drei Konstanten signifikant z.T. um fast 100 % voneinander abweichen, was weit außerhalb des zulässigen Fehlers liegt. Daher ermöglichen sie keine Aussage über die Bindungskonstante des Gesamtsystems. Die einzelnen Werte liegen aber in der gleichen Größenordnung wie die der symmetrischen Cyclopeptide.

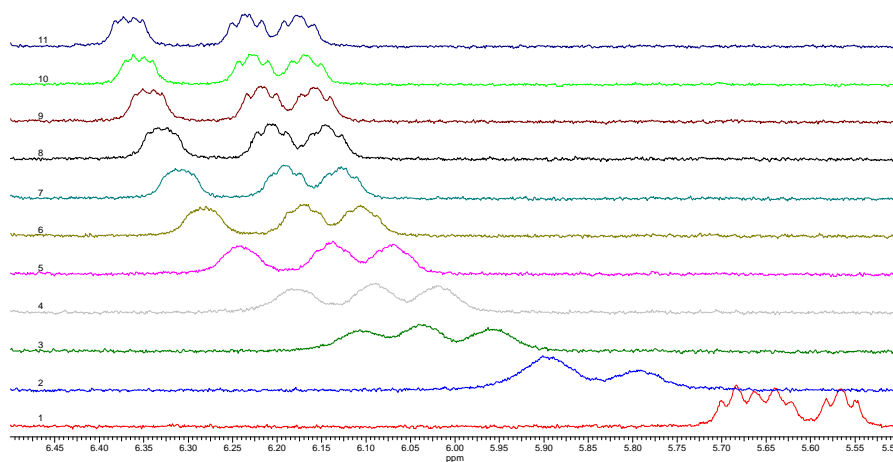


Abbildung 13. Titration von **40** mit $n\text{-BuMe}_3\text{NTs}$ in $\text{DMSO-}d_6$; nur der Bereich der Spektren mit den drei $H(\alpha)$ -Signalen ist abgebildet.

Tabelle 2. Assoziationskonstanten des Cyclopeptids **40** für verschiedene Gäste ermittelt durch NMR-Titration in $\text{DMSO-}d_6$. Verfolgt wurde jeweils der Shift der $H(\alpha)$ -Signale im $^1\text{H-NMR}$ des Cyclopeptids (K_a in M^{-1} , Fehler $< 15\%$).

Substrat	K_a
38	$K_1 = 7530$
	$K_2 = 9000$
	$K_3 = 5570$
NaTs	$K_1 = 3410$
	$K_2 = 4350$
	$K_3 = 2580$
$\text{Me}_3\text{N}(n\text{-Bu})\text{Ts}$	$K_1 = 6260$
	$K_2 = 8520$
	$K_3 = 4960$

Ähnliche Beobachtungen beschrieb kürzlich die Gruppe um S. Roelens, die ebenfalls unterschiedliche Bindungskonstanten bei Auswertung verschiedener Signalverschiebungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei Komplexbildung eines Rezeptors für Monosaccharide beobachtete.⁸¹ Ursache war in diesem Fall die Überlagerung verschiedener Komplexbildungsgleichgewichte aufgrund der Ausbildung von Komplexen unterschiedlicher Stöchiometrie. Um Informationen über die Stöchiometrie der bei der Wechselwirkungen von **40** mit **38** gebildeten Komplexe zu erhalten, habe ich daher ein ESI-Massenspektrum einer äquimolaren Lösung von **40** mit **38** ($10\ \mu\text{M}$) im negativen Modus aufgenommen. Aus technischen Gründen wurde die Messung in

Wasser/Methanol durchgeführt. Allerdings wurden auch in diesem Lösungsmittel unterschiedliche Bindungskonstanten bei Auswertung der Shifts der einzelnen H(α)-Signale bei Komplexbildung erhalten (Kapitel 2.3.2.2). Das Spektrum in Abbildung 14 zeigt deutlich das Vorliegen des 1:1 Komplexes aber keine höheren Aggregate (Die kleineren Signale konnten nicht zugeordnet werden). Damit ist es unwahrscheinlich, dass die bei der Auswertung der NMR-Titrations erhaltenen Ergebnisse auf das Vorliegen verschiedener Komplexe unterschiedlicher Stöchiometrie zurückzuführen sind.

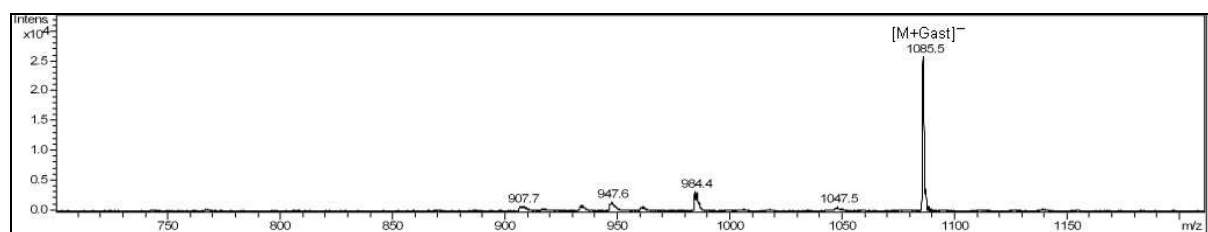


Abbildung 14. ESI-Massenspektrum (negativer Modus) von Cyclopeptid **40** mit **38** (10 μ M) aus 40 % Wasser/Methanol; gezeigt ist nur der Bereich, der Signale enthielt.

Alternativ könnte die Ursache des Effekts auch eine spezifische Wechselwirkung des Cyclopeptids mit dem Kation des als Substrat verwendeten Salzes sein. Dies würde ebenfalls zu komplexeren, überlagerten Bindungsgleichgewichten führen, wenn das Cyclopeptid das Anion, das Kation und eventuell das gesamte Ionenpaar spezifisch bindet. Es wurde daher eine weitere Titration mit *n*-Butyltrimethylammoniumtosylat als Substrat durchgeführt. Tabelle 2 zeigt, dass durch den Übergang vom Natriumsalz zum Ammoniumsalz die Bindungskonstanten des Komplexes insgesamt ansteigen. Dies ist ein bekanntes Phänomen, das u.a. auf eine vollständigere Dissoziation des Salzes mit dem lipophileren Kation im organischen Lösungsmittel zurückzuführen ist.^{51,82} Auch in diesem Fall wurden jedoch unterschiedliche Bindungskonstanten aus den einzelnen Sättigungskurven berechnet, deren Verhältnis fast exakt dem der drei Bindungskonstanten, die für den Natriumtosylatkomplex bestimmt wurden, entspricht. Auch wenn damit nicht eindeutig ein Kationeneffekt auf die Komplexbildung ausgeschlossen werden kann, ist es unwahrscheinlich, dass zwei Kationen so unterschiedlicher Natur wie Natrium und *n*-Butyltrimethylammonium vom Cyclopeptid völlig analog komplexiert werden. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Bindungskonstanten konnte demnach leider nicht gefunden werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen in DMSO zeigen letztlich, dass die peripheren Substituenten an den Cyclopeptiden keinen signifikanten Einfluss auf die Anionenbindung besitzen. Lediglich die Komplexe des unsubstituierten Cyclopeptids **1** mit den Sulfonaten **38**

und **39** besitzen ungewöhnlich hohe Stabilitätskonstanten, wobei der Ursprung dieses Effektes aber nicht eindeutig mit NMR-spektroskopischen Methoden geklärt werden konnte.

2.3.2.2. WASSER/METHANOL

Cyclopeptid **1** bildet mit anorganischen Anionen wie Sulfat und Iodid in 50 % Wasser/Methanol sandwichartige 2:1 Komplexe, in denen das Anion von zwei Cyclopeptideinheiten gebunden wird (siehe Abbildung 7). Das organische Anion Benzolsulfonat wird jedoch in einem 1:1 Komplex gebunden, da die Größe des Gastes die Annäherung zweier Cyclopeptidringe aus sterischen Gründen verhindert.⁵⁰ Das substituierte Cyclopeptid **2** mit 4*R*-Hydroxyprolinuntereinheiten bindet anorganische Anionen ebenfalls in 1:1 Komplexen. Hierfür sind sterische Effekte der OH-Gruppen an den Hydroxyprolineinheiten verantwortlich, aber auch die erschwerte Desolvatation der polaren Hydroxyprolineinheiten in wässrigen Lösungsmitteln kann ein Grund sein, warum zwei Ringe dieses Cyclopeptids sich weniger gut aneinander lagern als zwei des Prolin-haltigen Analogons.⁵¹

Für die Peptide **5** und **21** ist also zu erwarten, dass mit geeigneten Anionen 1:1 Komplexe gebildet werden. Dies sollte zunächst durch Bestimmung der Komplexstöchiometrie verifiziert werden. Als Lösungsmittel sollte in den Bindungsstudien möglichst ein Wasser/Methanol-Gemisch mit hohem Wasseranteil verwendet werden. Aufgrund der zusätzlichen Substituenten sind die Cyclopeptide **5** und **21** etwas schlechter löslich als **1** und für die ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen ausreichend hohe Konzentrationen konnten nur in 40 % Wasser/Methanol erreicht werden. Dieses Lösungsmittelgemisch wurde dementsprechend in der Mehrzahl der Bindungsstudien eingesetzt.

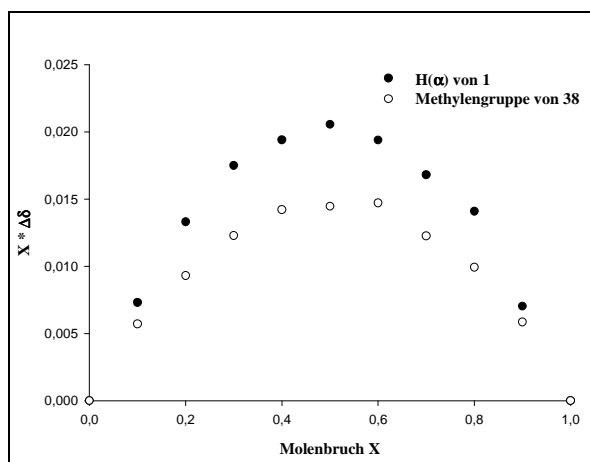


Abbildung 15. Job-Plot von cyclo{[Pro-Apa]₃} **1** mit PhCONHCH₂SO₃Na **38** in 40 % D₂O/Methanol-d₄.

In Abbildung 15 ist der Job-Plot für den Komplex aus **1** und **38** gezeigt. Verfolgt wurden die Shifts der H(α)-Signale des Rezeptors und die der Signale der Methylenprotonen des Gasts. Die Maxima beider Kurven bei 0,5 belegen eindeutig, dass, wie erwartet, ein 1:1 Komplex vorliegt. Dieses Ergebnis wurde durch Aufnahme eines ESI-Massenspektrums einer äquimolaren Lösung von **1** und **38** (10 μ M) im negativen Modus bestätigt. Im in Abbildung 16 dargestellten Massenspektrum ist der 1:1 Komplex als intensivstes Signal zu erkennen. Die Signale zwischen $m/z = 680$ und 770 können keinen definierten Komplexen aus Cyclopeptid und Gast zugeordnet werden.

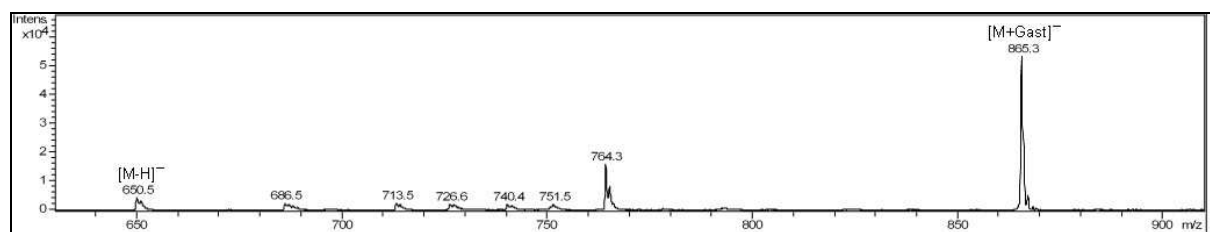


Abbildung 16. ESI-Massenspektrum von Cyclopeptid **1** mit $\text{PhCONHCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ **38** (10 μ M, negativer Modus); gezeigt ist nur der Bereich, der Signale enthält.

Der Job-Plot und das Massenspektrum zeigen unabhängig voneinander, dass das unsubstituierte Cyclopeptid **1** das organische Anion **38** mit einer Komplexstöchiometrie von 1:1 bindet. Die Assoziation zweier Cyclopeptidringe, die bei der Komplexbildung kleinerer anorganischer Anionen beobachtet wird, ist bei der Komplexbildung des größeren Gastes also nicht möglich. Man kann daher davon ausgehen, dass auch die substituierten Cyclopeptide **5** und **21** die verwendeten organischen Substrate im Sinne von 1:1 Komplexen binden.

Die Komplexstabilität im Lösungsmittel 40 % Wasser/Methanol wurde mit $^1\text{H-NMR}$ -Titrationen bestimmt. Die Spektren der NMR-Titrationen, in denen die Cyclopeptide **1** oder **5** eingesetzt wurden, waren problemlos auszuwerten. Die NMR-Spektren von **21** in 40 % D_2O /Methanol- d_4 waren jedoch deutlich komplexer und zeigten eine Vielzahl unerwarteter Signale. Die Serie von NMR-Spektren der Titration von **21** mit Sulfat ist exemplarisch für alle Wirt-Gast-Titrationen dieses Cyclopeptids in dem verwendeten Lösungsmittelgemisch in Abbildung 17 dargestellt. Während das Spektrum von **21** in DMSO einer im zeitlichen Mittel C_3 -symmetrischen Konformation zugeordnet werden konnte, zeigt die Aufspaltung einzelner Signale in 40 % D_2O /Methanol- d_4 , dass in diesem Lösungsmittel ein auf der NMR-Zeitskala langsames Gleichgewicht zwischen verschiedenen Cyclopeptidspezies besteht. Durch Gastzugabe wird die Signalaufspaltung noch verstärkt, was z.B. an den drei breiten Signalen für die H(α)-Protonen in Anwesenheit von 1,9 Äquivalenten Na_2SO_4 im Spektrum 2 deutlich

sichtbar ist. Im Spektrum 11 fallen die H(α)-Signale zwar wieder zusammen, die Signale der restlichen Prolinprotonen sind aber immer noch erheblich komplexer als für eine symmetrische Struktur zu erwarten ist. Die Änderung verschiedener Faktoren wie Lösungsmittelzusammensetzung und Temperatur beeinflussten die Anzahl der Signale in den Spektren kaum.

Die Komplexität der NMR-Spektren von **21** in 40 % D₂O/Methanol-*d*₄ kann mehrere Ursachen haben. So kann die Signalaufspaltung durch eine Aggregation des Cyclopeptids hervorgerufen werden oder sie deutet an, dass das freie und das komplexierte Cyclopeptid mehrere unsymmetrische Konformationen annehmen, die in einem langsamen Gleichgewicht stehen.

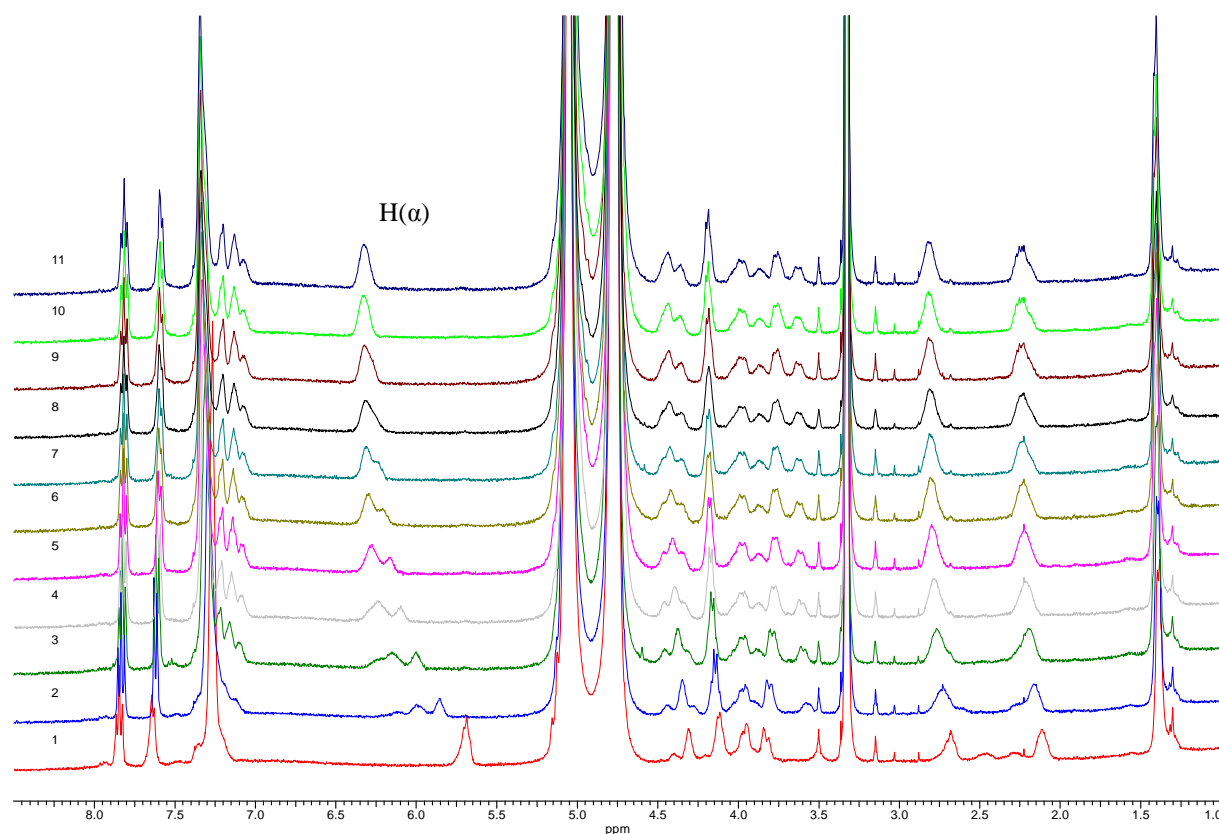


Abbildung 17. ¹H-NMR-Spektren der Titration von **21** (0,5 mM) mit Na₂SO₄ in 40 % D₂O/Methanol-*d*₄; Spektrum 1: reine Rezeptorlösung; Spektren 2-12: Rezeptor mit steigenden Äquivalenten Gast.

Die Aggregation des Cyclopeptids bzw. die Bildung von Cyclopeptidkomplexen höherer Stöchiometrie konnte durch Aufnahme von ESI-MS-Spektren ausgeschlossen werden. So sind in den Massenspektren von äquimolaren Mischungen aus **21** und den Gästen **38** oder Iodid im negativen Modus nur die entsprechenden 1:1 Komplexe sichtbar (Abbildung 18; die unbeschrifteten Signale konnten nicht zugeordnet werden).

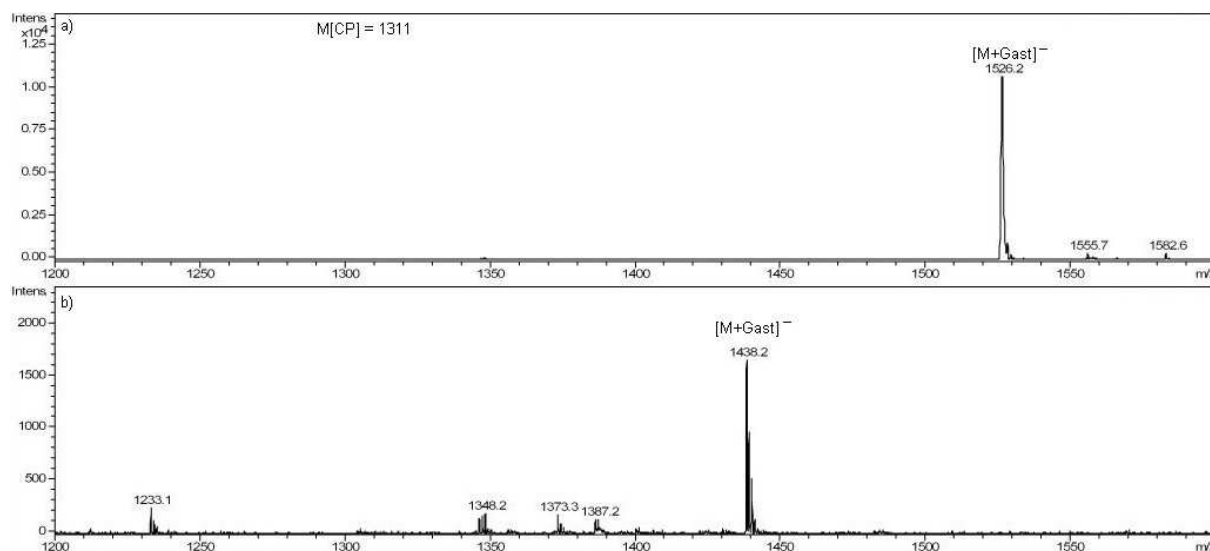
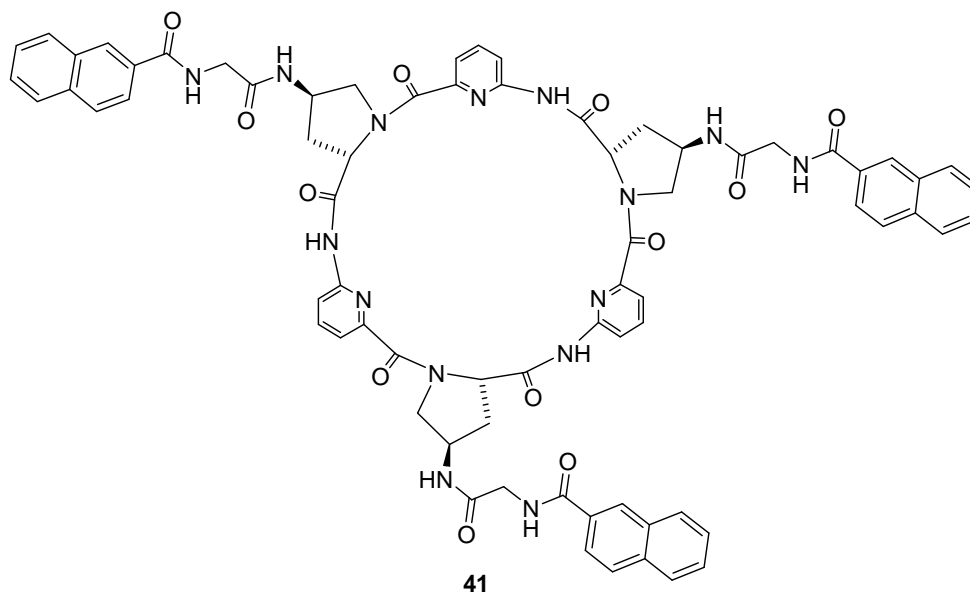


Abbildung 18. ESI-Massenspektren von Cyclopeptid **21** mit a) **38** und b) Iodid (negativer Modus); gezeigt ist nur der Ausschnitt, der Signale enthält; die unbeschrifteten Signale konnten nicht zugeordnet werden.

Es scheint daher wahrscheinlicher, dass das Z-Alanin-haltige Cyclopeptid **21** in Wasser/Methanol aufgrund der Substituenten verschiedene diastereomere Konformationen einnehmen kann, die im langsamen Gleichgewicht vorliegen. Selbst bei hoher Substratzugabe ist das Gleichgewicht nicht vollständig zugunsten eines Konformers verschoben. Ein Hinweis darauf ist, dass das strukturell ähnlich aufgebaute Cyclopeptid **41**, das C. Richter im Rahmen ihrer Diplomarbeit hergestellt hat, in 30 % D_2O /Methanol- d_4 ein einfaches NMR-Spektrum besitzt, welches auch bei Gastzugabe nicht aufspaltet.⁸³ Das besondere Verhalten von **21** scheint also eine Konsequenz der chiralen Alaninuntereinheiten in den Substituenten zu sein, welche offensichtlich für die diastereomeren Konformationen verantwortlich sind. Aufgrund der Komplexität der Spektren von **21** in 40 % D_2O /Methanol- d_4 konnten keine Bindungskonstanten aus den NMR-Titrationen mit diesem Cyclopeptid berechnet werden.



In Tabelle 3 sind daher nur die aus den NMR-Titrationsen ermittelten Stabilitätskonstanten für die Komplexe der Cyclopeptide **1**, **5**, **33** und **40** mit unterschiedlichen Gästen zusammengefasst. Die Mehrzahl der Stabilitätskonstanten liegt aufgrund des stärker kompetitiven Lösungsmittelgemisches wie erwartet etwa eine Größenordnung unter denen in DMSO. Cyclopeptid **1** nimmt in 40 % D_2O /Methanol- d_4 diesmal keine Sonderstellung ein, wie es in DMSO- d_6 der Fall war. Die Bindungskonstanten von **1** mit Tosylat bzw. **38** betragen $K_a = 150 M^{-1}$ bzw. $K_a = 290 M^{-1}$. Diese Bindungskonstanten sind durchaus vergleichbar mit bekannten Literaturwerten. So bindet **1** Benzolsulfonat mit $K_a = 44 M^{-1}$ in 80 % Wasser und die Bindungskonstante K_1 für die Affinität des ersten Cyclopeptidrings zum Gast im 2:1 Komplex von **1** mit Sulfat liegt in 50 % Wasser/Methanol bei $360 K^{-1}$.^{50,52} Das Hydroxyprolin-haltige Cyclopeptid **2** bindet Sulfat in 50 % Wasser/Methanol mit $K_a = 260 M^{-1}$. Aufgrund der unterschiedlichen Lösungsmittelzusammensetzung sind die zitierten Werte nicht direkt mit denen im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Werte vergleichbar. Der Trend ist aber ähnlich.

Tabelle 3. Assoziationskonstanten der Cyclopeptide für verschiedene Gäste ermittelt durch NMR-Titration in 40% D₂O/Methanol-d₄. Verfolgt wurde jeweils der Shift der H(α)-Protonen des Cyclopeptids (K_a in M⁻¹, Fehler < 15 %).

Cyclopeptid	Substrat	K _a
1	NaTs	150
1	38	290
5	Na ₂ SO ₄	820
5	NaTs	680
5	38	1050
5	39	390
33	38	470
40*	38	K ₁ = 460 K ₂ = 390

* Unterschiedliche Shifts der verschiedenen H(α)-Protonen führen zu unterschiedlichen Bindungskonstanten.

Interessanterweise liegen die Stabilitätskonstanten für die Komplexe von **5** mit Sulfat, Tosylat und insbesondere mit Sulfonat **38** mit Werten für K_a zwischen 680 M⁻¹ und 1050 M⁻¹ deutlich über den Werten der Komplexe von **1**. Dass der Wert für den Komplex mit Tosylat niedriger liegt als der des entsprechenden Sulfatkomplexes wurde auch schon für die Komplexe von **1** mit diesen Anionen in 80 % Wasser/Methanol beobachtet (K_a = 44 M⁻¹ gegenüber 96 M⁻¹) und ist wahrscheinlich eine Konsequenz der geringeren Ladung des Tosylatanions.⁵² Die erhöhte Stabilität der Komplexe zwischen **5** und **38** deutet auf Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Gruppen im Gast und den Substituenten des Rezeptors hin. Hierfür spricht, dass Komplexe von Wirt/Gast-Kombinationen, bei denen entweder im Wirt oder im Gast die aromatischen Untereinheiten fehlen (**5** und **39** bzw. **33** und **38**) Stabilitäten besitzen, die in der Größenordnung des Komplexes aus **1** und **38** liegen. Es scheint daher wahrscheinlich, dass die Stabilität des Komplexes zwischen **5** und **38** in Wasser/Methanol auf hydrophobe Wechselwirkungen und/oder attraktive Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Einheiten zurückzuführen sein könnte. Hydrophobe Wechselwirkungen treten auf, wenn bei der Komplexbildung Solvensmoleküle aus den Solvathüllen von Wirt und Gast freigesetzt werden. Solche Wechselwirkungen sind auf wässrige Lösungsmittel beschränkt. In DMSO sind sie nicht möglich, weswegen **38** von **5** bzw. **33** in diesem Lösungsmittel etwa gleich gut gebunden wird (Tabelle 1).

Bei der Bestimmung der Komplexstabilitätskonstanten zwischen dem einfach substituierten Cyclopeptid **40** und **38** traten die gleichen Probleme bei der Auswertung auf wie schon in DMSO. Aufgrund des unterschiedlichen Shifts der verschiedenen H(α)-Signale wurden

unterschiedliche Bindungskonstanten erhalten. Diese lagen im Bereich der Komplexe von **1** und **33** mit demselben Gast.

Um die bei den NMR-Titrationsen erhaltenen Werte zu verifizieren und Informationen zur Anionenaffinität von **21** in 40 % Wasser/Methanol zu erhalten, wurden zusätzlich ITC-Messungen mit den Cyclopeptiden **1**, **5**, **21** und **33** durchgeführt. Vermessen wurde die Komplexbildung der vier Cyclopeptide jeweils mit den beiden Gästen Natriumtosylat und **38**. Tabelle 4 zeigt, dass die Ergebnisse dieser Messungen im guten Einklang mit denen der NMR-Titrationsen stehen. Bei Cyclopeptid **1** ist die Bindungskonstante für den Komplex mit Tosylat für eine verlässliche Auswertung der Titrationskurve zu gering (vgl. 2.3.1). Im Falle von **5** gab es Löslichkeitsprobleme mit dem Cyclopeptid, so dass ebenfalls kein verlässliches Resultat für den Komplex mit Tosylat erhalten werden konnte.

Tabelle 4. Assoziationskonstanten der Cyclopeptide (1 mM) mit den Gästen NaTs und **38** (30 mM) in 40 % H₂O/Methanol ermittelt durch isotherme Titrationskalorimetrie. (N = Stöchiometriefaktor, T = 298 K, K in M⁻¹, ΔG⁰ in kJ·mol⁻¹, ΔH⁰ in kJ·mol⁻¹, TΔS⁰ in kJ·mol⁻¹).

Cyclopeptid	Substrat	N	K _a	ΔG ⁰	ΔH ⁰	TΔS ⁰
1	NaTs	nb	nb			
	38	0,904	290	-14,1	-17,6	-3,5
5	NaTs	*				
	38	0,774	900	-16,8	-22,7	-5,9
21	NaTs	0,791	1140	-17,5	-13,6	3,9
	38	1,070	720	-16,3	-10,2	6,1
33	NaTs	0,863	1190	-17,6	-15,4	2,2
	38	0,810	440	-15,1	-18,3	-3,2

nb: nicht bestimmbar; * Löslichkeitsprobleme mit **5**

Die ITC-Messungen bestätigen, dass die Bindungskonstanten der Komplexe der substituierten Cyclopeptide mit Tosylat und **38** deutlich über den Werten liegen, die für Cyclopeptid **1** erhalten wurden. Dies trifft nicht nur für Cyclopeptid **5** zu, sondern auch für **21**. Die erhaltenen thermodynamischen Daten zeigen, dass die Bildung aller Komplexe enthalpisch favorisiert ist. Die Entropie liefert nur einen kleinen Beitrag, der die Komplexstabilität in einigen Fällen schwächt (TΔS⁰ < 0), in anderen Fällen, vor allem bei Cyclopeptid **21**, verstärkt (TΔS⁰ > 0).

Die Bindungskonstante von **5** mit **38** liegt mit K_a = 900 M⁻¹, wie schon bei der NMR-Titration, um etwa das dreifache über der Bindungskonstanten des entsprechenden Komplexes mit dem unsubstituierten Cyclopeptid **1** (K_a = 290 M⁻¹) und etwa doppelt so hoch wie beim

Komplex des Cyclopeptids ohne aromatische Substituenten **33** ($K_a = 440 \text{ M}^{-1}$). Die für diesen Effekt mutmaßlich verantwortlichen Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Einheiten in Rezeptor und Gast äußern sich allerdings nicht in einem entropischen Vorteil der Komplexbildung ($T\Delta S^0 = -5,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), was bei hydrophoben Wechselwirkungen der Fall sein müsste.

Überraschend ist die hohe Bindungskonstante des Tosylatkomplexes von **33** ($K_a = 1190 \text{ M}^{-1}$). Während die durch NMR-Titrationen ermittelte Bindungskonstante für den Tosylatkomplex von **5** niedriger ist als die von **38** ($K_a = 680 \text{ M}^{-1}$ verglichen mit $K_a = 1050 \text{ M}^{-1}$, Tabelle 3), ist dies im Falle von **33** umgekehrt.

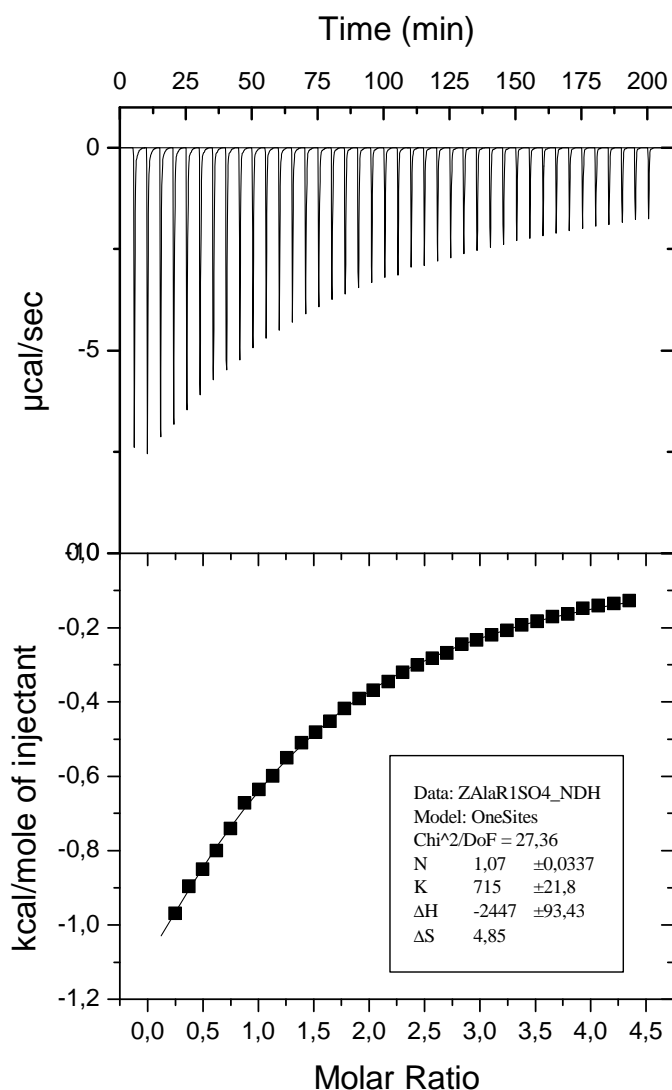


Abbildung 19. Mikrokalorimetrisches Titrationsdiagramm der Komplexbildung von Cyclopeptid **21** (1 mM) mit dem Sulfonat **38** in 40 % Wasser/Methanol.

Die Stabilität des Komplexes zwischen **21** und **38** (Abbildung 19) bzw. Tosylat liegen etwa in der Größenordnung der Komplexe des Cyclopeptids **5**. Allerdings ist die Bindungskonstante für die Tosylatkomplexierung ($K_a = 1140 \text{ M}^{-1}$) hier ebenfalls höher als die der Sulfonatkomplexierung ($K_a = 715 \text{ M}^{-1}$). Das Binden des kleineren, weniger flexiblen Gastes scheint bevorzugt zu sein. Im Gegensatz zur Bildung der Komplexe der anderen Cyclopeptide sind die Komplexe von **21** mit Tosylat und **38** beide entropisch begünstigt ($T\Delta S = 3,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ bzw. $6,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), obwohl auch in diesem Fall die Komplexstabilität im Wesentlichen durch den Enthalpiebeitrag bestimmt wird.

Die Ergebnisse zeigen, dass in Wasser/Methanol periphere Substituenten an den Cyclopeptiden durchaus einen Einfluss auf die Komplexbildung besitzen. Damit ist das Konzept, die Anionenaffinität und -selektivität solcher Rezeptoren durch Variation der Substituenten zu beeinflussen, prinzipiell möglich. Weitere systematische Untersuchungen müssen nun Informationen darüber liefern, wie die Bindungseigenschaften der Cyclopeptide durch strukturelle Veränderung der Substituenten gezielt beeinflusst werden können.

2.3.2.3. MOLECULAR MODELLING

Mit Hilfe der NMR- und ITC-Messungen konnte ich zeigen, dass die Substituenten an den Prolinuntereinheiten durchaus einen Einfluss auf die Substrataffinität der von mir synthetisierten Cyclopeptide in Wasser/Methanol-Gemischen besitzen. Diese Untersuchungen lieferten aber keine Informationen zur Struktur der gebildeten Komplexe. Hierüber sollten Molecular Modelling Studien Aufschluss geben. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms MacroModel 9.0 durchgeführt (Konformationssuche: Methode MCMM, 3000 Schritte; Minimierung: Kraftfeld Amber*, Methode PRCG, 3000 Schritte, Lösungsmittel: Wasser). Auf Moleküldynamiksimulationen wurde verzichtet. Als Ergebnisse ergaben sich optimierte Konformationen, die lokalen Minima im Konformationsraum entsprechen und ein statisches Bild der Strukturen liefern. Aufgrund der Vielzahl von Freiheitsgraden in den Cyclopeptiden und in einigen der Gäste ist in Lösung mit einem Gleichgewicht vieler Konformationen zu rechnen. Die berechneten Strukturen liefern aber dennoch Informationen über die strukturellen Gegebenheiten in den gebildeten Komplexen. Zur besseren Übersicht wurden in den Abbildungen nur die an den Wasserstoffbrücken beteiligten, aciden Wasserstoffatome eingezeichnet.

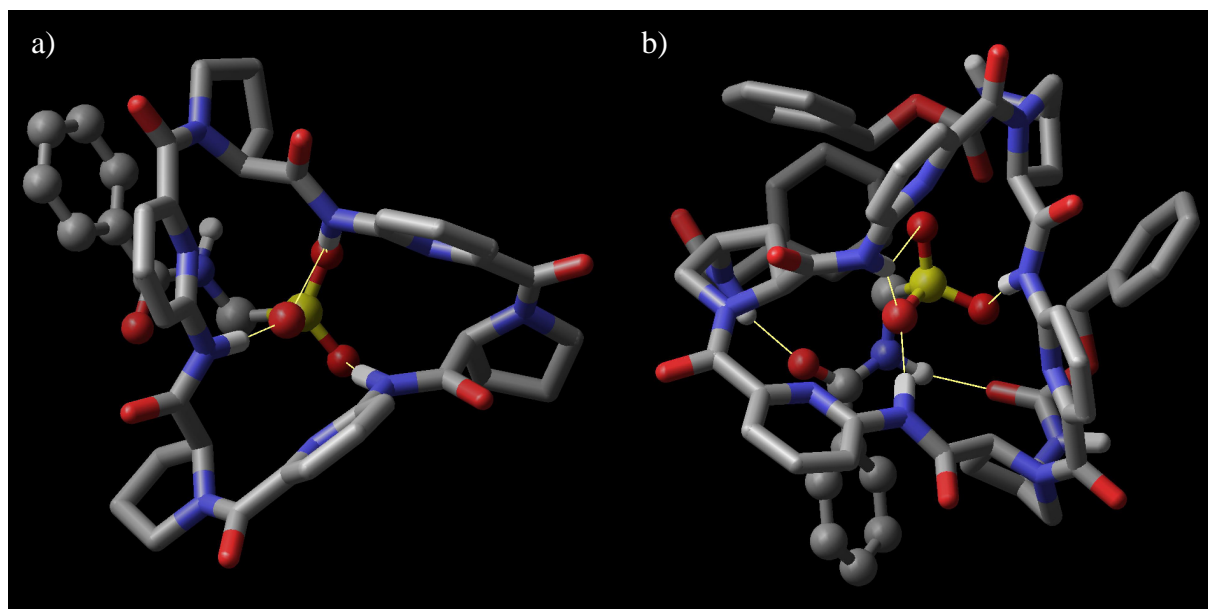


Abbildung 20. Molecular Modelling Studien von a) $\text{cyclo}[[\text{Pro-Apa}]_3]$ **1** und b) $\text{cyclo}\{[(\text{Z-Apro})\text{-Apa}]_3\}$ **5** mit **38**.

In den Abbildungen 20 bis 22 sind mögliche Komplexe der Cyclopeptide **1**, **5**, **21** und **33** jeweils mit dem Sulfonat **38** dargestellt. Die Wasserstoffbrücken zwischen Rezeptor und Gast sind durch gelbe Linien hervorgehoben. Es ist deutlich erkennbar, dass mit Zunahme der Substituentenlänge von **1** (Abbildung 20a) über **5** bzw. **33** (Abbildung 20b/Abbildung 21) hin zu **21** (Abbildung 22) die Anzahl der möglichen Wasserstoffbrücken ansteigt. Diese Zunahme der Wasserstoffbrücken könnte die Ursache für die höhere Stabilität des Komplexes von **5** mit **38** in 40 % Wasser/Methanol im Vergleich zum Komplex von **1** sein, wobei sich dieser Trend allerdings für das Cyclopeptid **21** in diesem Lösungsmittelgemisch nicht fortsetzt. In DMSO ist der Komplex von **21** mit **38** stabiler als der von **5**, die Berechnungen liefern aber keine Informationen über die hohe Stabilität des Komplexes von **1** in diesem Lösungsmittel.

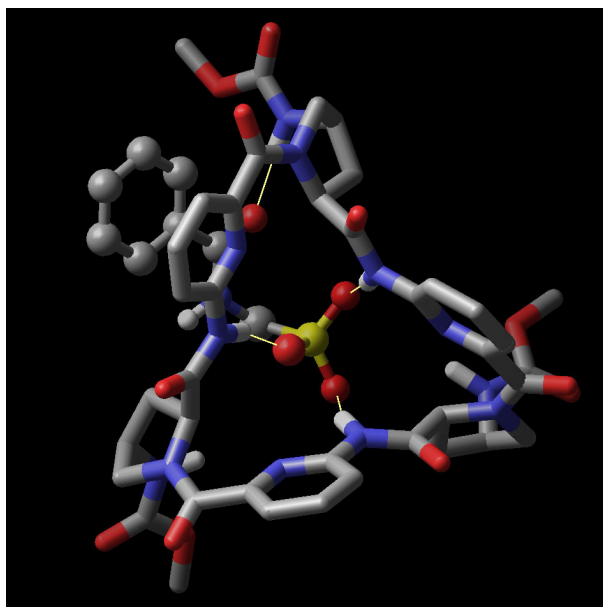


Abbildung 21. Berechnete Struktur von $\text{cyclo}\{[(\text{MeOCO-Apro})\text{-Apa}]_3\}$ **33** mit **38**.

Direkte aromatische Wechselwirkungen sind in der berechneten Struktur des Komplexes von **21** und **38** nicht ersichtlich. Es ist jedoch denkbar, dass es Konformationen gibt, in denen die aromatischen Substituenten von Wirt und Gast sich räumlich näher kommen. Nähere Informationen über die Dynamik im Komplex würden Moleküldynamikberechnungen liefern. Durch die Komplexbildung wird die C_3 -Symmetrie des Wirtes gebrochen. In wässrigen Lösungsmitteln scheint aber bereits der freie Wirt nicht-symmetrische Konformationen zu bevorzugen. Die berechnete Darstellung in Abbildung 23 weist beispielsweise eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen einem Ring-NH und einem Carbonylsauerstoff der Z-Schutzgruppe eines benachbarten Substituentenarms auf.

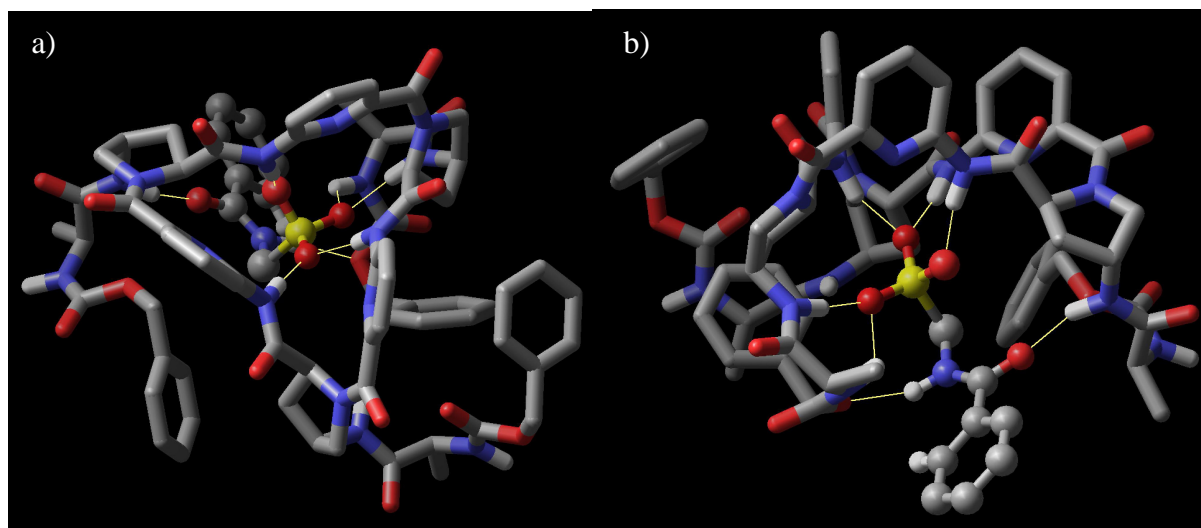


Abbildung 22. Berechnete Struktur von cyclo{[(Z-Ala-Apro)-Apa]₃} **21** mit **38**, Ansicht von a) oben und b) der Seite.

Die Flexibilität der Z-Alanin-Substituenten ist beachtlich. Ein Übereinanderlegen verschiedener Strukturen zeigte, welche Orientierungen der Substituentenarme, besonders der Z-Gruppen, möglich sind. Aber schon bei zwei Strukturen übereinander wird eine zweidimensionale Darstellung so kompliziert, dass im Prinzip nur noch der vergleichsweise starre Cyclopeptidring identifizierbar ist. Allerdings sind hier zum Teil erhebliche Unterschiede in der Energie der Konformeren festzustellen. Bei den Berechnungen zu möglichen Konformationen des freien Cyclopeptids **21** wurden fünf weitere Strukturen mit einer Energie bis zu einer Abweichung von $6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ über der Energie des Minimums, welches einer Populationswahrscheinlichkeit von 90 % entspricht, gefunden. Die einzelnen Strukturen wurden z.T. bis zu 35 mal ermittelt. Erheblich größer ist die Anzahl der möglichen Strukturen bei der Komplexierung von **38** durch **21**. Es konnten 20 verschiedene Strukturen mit Energien bis zu einer Abweichung von $6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ über der Energie des Minimums in Abbildung 22 gefunden werden. Die Berechnungen für die Komplexe von **1** und **5** mit **38** liefern zwar ebenfalls verschiedene Strukturen, diese unterscheiden sich aber überwiegend nur an der Lage des Substrats im Bindungshohlraum. Beim Übereinanderlegen verschiedener Konformationen des Komplexes von **5** mit **38** sind im Rezeptor nur minimale Abweichungen beim Ring und bei den Substituenten zu erkennen. Ein ähnliches Verhalten zeigt sich bei möglichen Strukturen für den freien Rezeptor, wobei sich die Konformationen im freien und komplexierenden Cyclopeptid **5** kaum unterscheiden. Bei **21** sind signifikante Unterschiede möglich. Die Länge und Struktur der Substituenten spielt demnach eine entscheidende Rolle

bei der Flexibilität und der Vororganisation des Bindungshohlraum bzw. den möglichen Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Substrat.

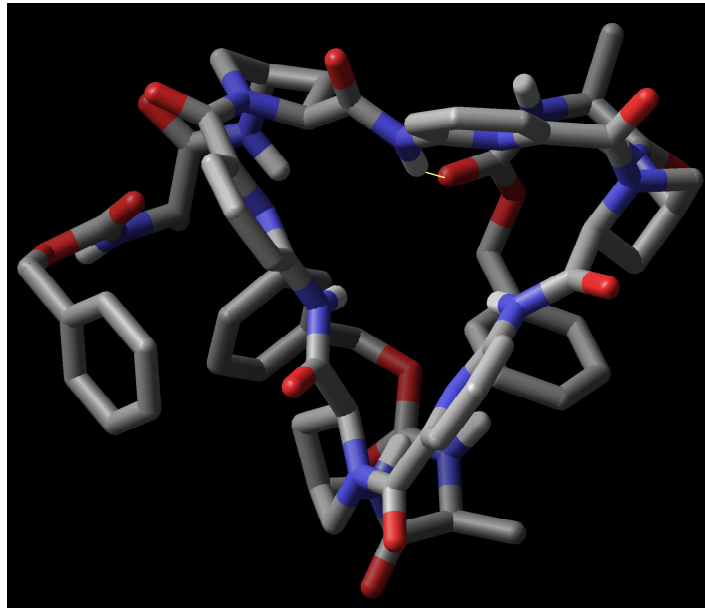


Abbildung 23. Berechnete Struktur von $\text{cyclo}\{[(Z\text{-Ala-Apro})\text{-Apa}]_3\}$ 21.

2.3.3. ACETAT

In den vorangegangenen Kapiteln wurden nur Komplexe von Cyclopeptiden mit den Anionen starker Säuren untersucht. Da ein Ziel meiner Dissertation war, die Eignung der Cyclopeptide zur Komplexierung von Aminosäuren bzw. kurzen Peptiden zu untersuchen, habe ich darüber hinaus die Bindung von Acetat studiert. Ein Problem bei der Verwendung dieses Gastes ist, dass sein Protolysegleichgewicht stärker vom pH-Wert und der Konzentration abhängig ist. Um eine vollständige Deprotonierung des Carboxylats in wässrigen Lösungsmitteln bei verschiedenen Gastkonzentrationen zu gewährleisten, müssen die Untersuchungen also in gepufferten Lösungen durchgeführt werden, wobei Puffer aus Salzen bestehen, deren Anionen mit dem eigentlichen Gast um die Bindungsstellen des Rezeptors konkurrieren. Voruntersuchungen in nicht gepufferten Lösungen zeigten jedoch, dass die Wechselwirkungen von Acetat mit den Cyclopeptiden in wässriger Umgebung – wenn überhaupt vorhanden – außerordentlich schwach sind. So waren Verschiebungen der Signale der H(α)-Protonen im Vergleich zur Signallage im ^1H -NMR-Spektrum der freien Cyclopeptide **1** oder **2** in 80 % D_2O /Methanol- d_4 praktisch nicht sichtbar. Für die Bindungsstudien mit Acetat als Gast wurde daher 5 % D_2O /DMSO- d_6 gewählt, ein Lösungsmittelgemisch, das auch von anderen Gruppen zur Charakterisierung der Wechselwirkungen neutraler Anionenrezeptoren mit Carboxylaten verwendet wurde.⁸⁴ In diesem Lösungsmittel waren die charakteristischen Veränderungen in den ^1H -NMR-Spektren der Cyclopeptide bei Wechselwirkungen mit Natriumacetat eindeutig sichtbar und konnten zur Bestimmung von Bindungskonstanten herangezogen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5. Assoziationskonstanten der Cyclopeptide für Natriumacetat in 5 % D_2O /DMSO- d_6 ermittelt durch NMR-Titration. Verfolgt wurde jeweils der Shift der H(α)-Protonen des Cyclopeptids (K_a in M^{-1} , Fehler < 15 %).

Cyclopeptid	K_a
1	3890
5	4420
21	32030
	$K_1 = 4340$
40*	$K_2 = 3500$
	$K_3 = 4930$

* keine einheitliche Bindungskonstante aus den einzelnen H(α) bestimmbar

Die Werte der Komplexstabilitätskonstanten der beiden Cyclopeptide **1** und **5** liegen mit $K_a = 3890 \text{ M}^{-1}$ und $K_a = 4420 \text{ M}^{-1}$ beide in der gleichen Größenordnung. Wie bei den anderen Untersuchungen in DMSO besitzen die Substituenten hier keinen großen Einfluss auf die Substrataffinität. Die leicht höhere Stabilitätskonstante von **5** kann möglicherweise zusätzlichen Wasserstoffbrücken zwischen Rezeptor und Substrat zugeschrieben werden. Auffällig ist die unerwartet hohe Stabilitätskonstante des Komplexes von **21** mit Acetat von $K_a = 32030 \text{ M}^{-1}$. Ein Job-Plot von **21** mit Acetat zeigte, dass es sich eindeutig um einen 1:1 Komplex handelt (Abbildung 24a). Der Vergleich der Titrationskurven der drei Cyclopeptide in Abbildung 24b verdeutlicht die unterschiedliche Acetataffinität. So ist die Sättigung der Titrationskurve bei Cyclopeptid **21** schon bei etwa 2 Äquivalenten Acetat erreicht, wohingegen bei **1** und **5** fünf Äquivalente Gast zur Sättigung notwendig sind. Der Tieffeldschieft der $\text{H}(\alpha)$ -Signale des Cyclopeptids **21** im ^1H -NMR-Spektrum fällt allerdings mit $\Delta\delta_{\text{max}} \approx 0,3 \text{ ppm}$ deutlich geringer aus.

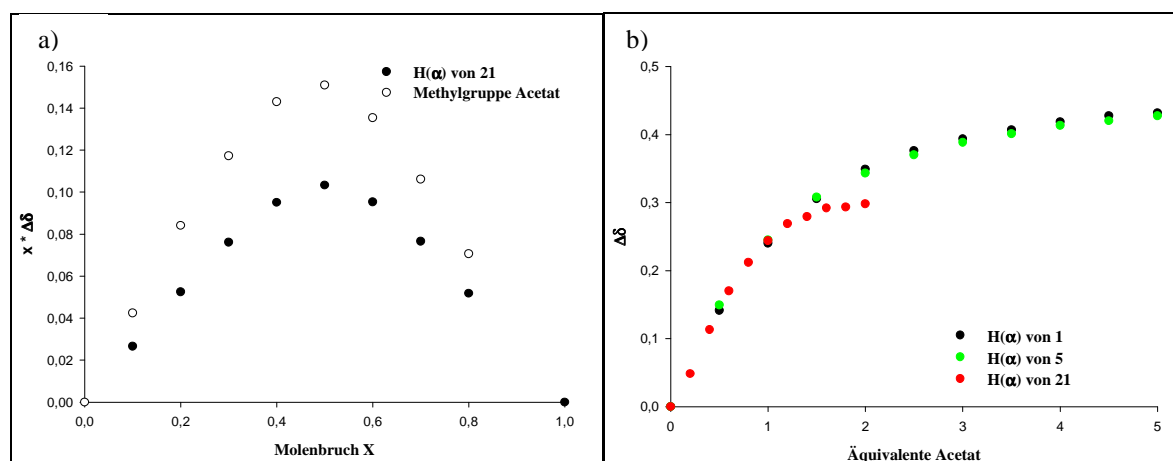


Abbildung 24. a) Job-Plot des Komplexes von **21** mit Natriumacetat in 5 % $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$ (verfolgt wurden das $\text{H}(\alpha)$ -Signal des Cyclopeptids und das Signal der Methylgruppe des Acetats); b) ^1H -NMR-Titration der Cyclopeptide **1**, **5** und **21** mit Natriumacetat in 5 % $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$.

Informationen zur Struktur der gebildeten Komplexe, die möglicherweise Hinweise für das besondere Verhalten von **21** liefern könnten, z.B. charakteristische Shifts einzelner Signale von Wirt und/oder Gast, waren den ^1H -NMR-Spektren nicht zu entnehmen. Daher wurden wiederum Kraftfeldberechnungen durchgeführt, die Aufschlüsse über die Strukturen der gebildeten Komplexe liefern sollten. Das unsubstituierte Cyclopeptid **1** kann nur seine drei Amidprotonen zur Komplexierung des Carboxylats zur Verfügung stellen. Beim dreifach Z-substituierten Derivat **5** sind zusätzliche Wechselwirkungen von mindestens einem Carbamat-NH eines Aminoprolins möglich (Abbildung 25). Das Cyclopeptid tendiert dabei zu einer C_3 -

symmetrischen Anordnung. In Cyclopeptid **21** sind die Substituenten wesentlich flexibler. Die in Abbildung 26 dargestellte berechnete Struktur des Acetatkomplexes zeigt, dass sich ein Substituentenarm um das Acetat „herum klappen“ kann. Dabei wird der Gast nicht nur von den drei Amidprotonen aus dem Cyclopeptidring komplexiert, drei zusätzliche Wasserstoffbrücken sind zu den Substituenten möglich. Zwei von diesen stammen von Aminoprolin-Amidprotonen und eine von einem Carbamat-NH. Ein Substituentenarm ist an der Bindung nicht beteiligt.

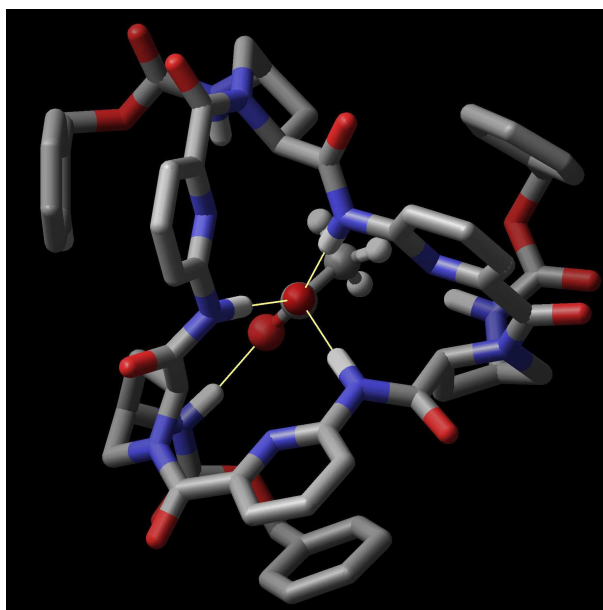


Abbildung 25. *Molecular Modelling Studie von 5 mit Acetat in Wasser.*

Einerseits kann die hohe Anzahl von Wasserstoffbrücken, andererseits auch die Abschirmung des Gastes vom umgebenden Lösungsmittel eine Ursache für die hohe Stabilität des Komplexes zwischen Acetat und **21** sein. Die Arbeitsgruppe um J. Rebek Jr. hat kürzlich über einen Rezeptor mit ähnlichen Eigenschaften berichtet. In diesem Fall trägt ein Vasen-förmiger Rezeptor eine bewegliche, in den Rezeptorhohlraum gerichtete Carboxylatgruppe.⁸⁵ Bei Anwesenheit eines tertiären Ammoniumions im Hohlraum bindet das Carboxylat dieses Substrat und schirmt den Hohlraum gegenüber Lösungsmittelmolekülen der wässrigen Umgebung ab. Der Unterschied zu meinem System besteht allerdings darin, dass bei der Komplexierung des Acetats durch **21** keine Salzbrücke auftritt und entropische Effekte in 5 % Wasser/DMSO nur schwach sind.

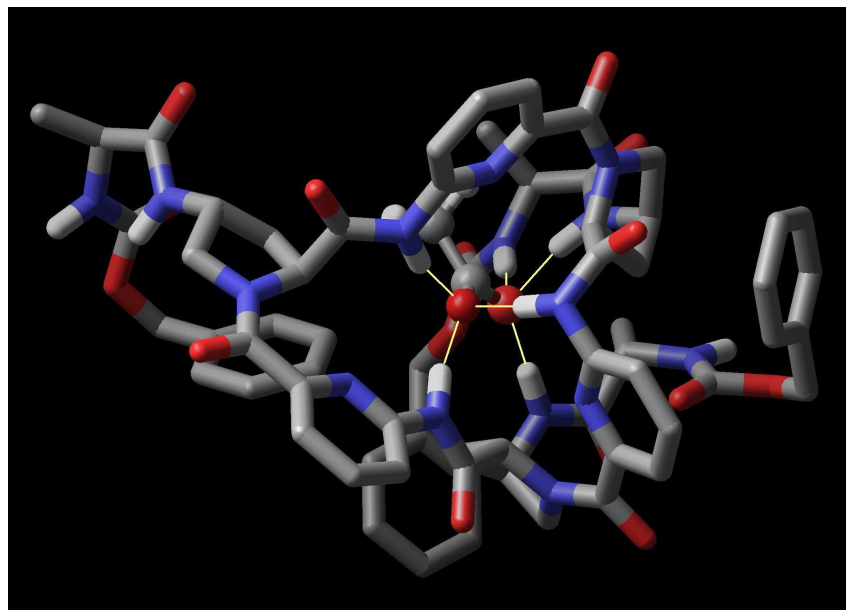


Abbildung 26. Molecular Modelling Studie des Komplexes von $\text{cyclo}\{[(Z\text{-Ala-Apro})\text{-Apa}]_3\}$ **21** mit Acetat in Wasser.

Um zu untersuchen, ob alle drei Substituenten in **21** für die effiziente Acetatkomplexierung notwendig sind oder ein Substituent ausreicht, wurde auch eine NMR-Titration mit dem nur einfach Z-Alanin-substituierten Cyclopeptid **40** und Acetat durchgeführt. Wie in den anderen Lösungsmitteln wurde auch in diesem Fall keine einheitliche Komplexstabilitätskonstante aus den Shifts der einzelnen $\text{H}(\alpha)$ -Signale berechnet. Die erhaltenen Bindungskonstanten der drei einzelnen Protonen im asymmetrischen **40** liegen mit Werten zwischen 3500 und 4930 M^{-1} alle in der gleichen Größenordnung wie die Komplexstabilitätskonstanten des unsubstituierten Cyclopeptids **1** bzw. des dreifach Z-substituierten Cyclopeptids **5** (Tabelle 5). Damit verhält sich Cyclopeptid **40** eher wie diese beiden Cyclopeptide. Auch wenn die Molecular Modelling Studien nur Hinweise auf die Beteiligung eines Cyclopeptidsubstituenten an der Komplexbildung gegeben haben, scheint eine effiziente Acetatbindung wohl die kooperative Wirkung der drei Substituenten in **21** zu erfordern. Anhand dieser Messungen ist ein Einfluss der Substituenten auf die Bindungseigenschaften eindeutig erkennbar, auch wenn nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die hohe Bindungskonstante der Acetatkomplexierung durch **21** auf die direkten Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat oder zwischen Komplex und Umgebung zurückzuführen ist.

3. SYNTHESE VON CYCLOPEPTIDEN FÜR DIE DYNAMISCHE KOMBINATORISCHE CHEMIE

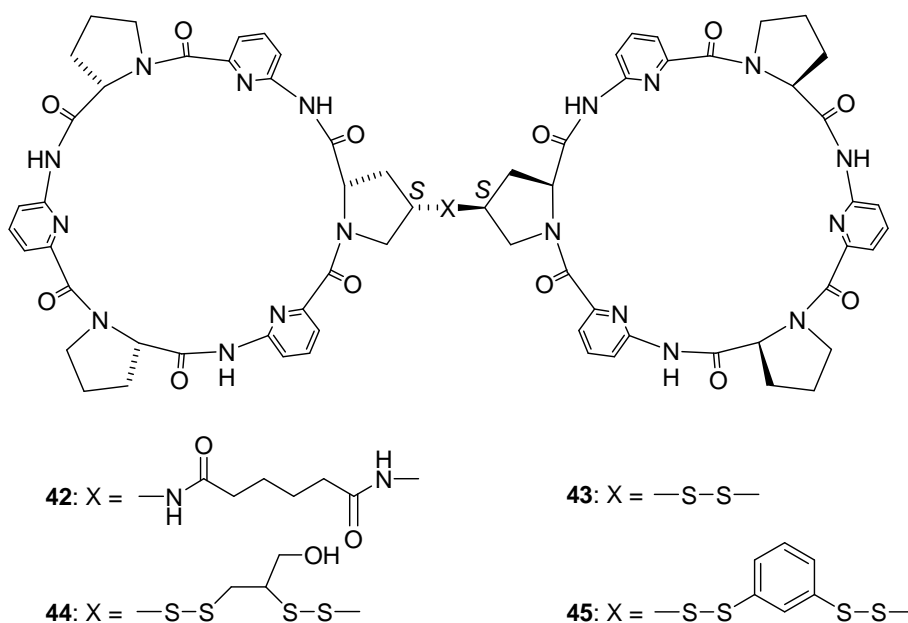
3.1. THEORETISCHER HINTERGRUND

Die vorangegangenen Kapitel zeigen, dass um den Hohlraum der von mir untersuchten Cyclopeptide angeordnete Substituenten prinzipiell einen Einfluss auf deren Bindungseigenschaften besitzen. Gleichzeitig wird aber auch klar, dass die gezielte Synthese eines Rezeptors z.B. für das Tripeptid L-Lys-D-Ala-D-Ala außerordentlich schwierig ist, da eine Vorhersage des Einflusses der Substituenten auf die Bindungsselektivität der Cyclopeptide auch unter Zuhilfenahme von Molecular Modelling Studien wahrscheinlich nicht gelingt. Darüber hinaus sind die Synthesen potentieller Rezeptoren außerordentlich aufwendig. Im Rahmen meiner Dissertation habe ich daher Voruntersuchungen durchgeführt, um mit Hilfe von kombinatorischen Verfahren Rezeptoren auf Basis substituierter Cyclopeptide für die sequenzselektive Peptiderkennung zu identifizieren. Die Arbeiten von Kilburn und Schmuck zeigen, dass die kombinatorische Chemie durchaus ein geeignetes Verfahren zur Synthese von Peptidrezeptoren darstellt.^{29,30,40} Beide Arbeitsgruppen verwendeten die konventionelle kombinatorische Chemie, um eine Rezeptorbibliothek auf einem festen Träger unter Verwendung der *split and mix* Methode herzustellen. Ein attraktives modernes Verfahren, das gerade in jüngster Zeit große Bedeutung gefunden hat, stellt die dynamische kombinatorische Chemie dar.⁸⁶⁻⁸⁹ Hierbei wird eine Substanzbibliothek generiert, bei der alle Bibliothekskomponenten in einem dynamischen Gleichgewicht stehen. Voraussetzung für die Herstellung einer solchen Bibliothek ist, dass die Bausteine der Bibliothekskomponenten über reversible Reaktionen miteinander kombiniert werden können. Die Zugabe eines Templats zu der dynamischen Bibliothek führt nun dazu, dass sich die Gleichgewichtslage zugunsten der Komponente innerhalb der Bibliothek verschiebt, die mit dem Templat am stärksten wechselwirkt. Ist das Templat ein Rezeptor, kann man mit Hilfe der dynamischen kombinatorischen Chemie das beste Substrat identifizieren. Umgekehrt kann die dynamische kombinatorische Chemie auch zur Synthese von Rezeptoren dienen. Als reversible Reaktionen zur Generierung einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek wurden vor allem die Iminbildung, die Hydrazonebildung, die Olefin-Metathese, der Disulfidaustausch und die Thioesterbildung ausgenutzt, wobei die letzten beiden Reaktionen auch die Herstellung einer dynamischen Bibliothek in Wasser erlauben.⁹⁰

Grundlegende Arbeiten zur Nutzung des Disulfidaustauschs und der Thioesterbindung in der dynamischen Chemie wurden in den Gruppen um J.K.M. Sanders und S. Otto durchgeführt.⁹¹⁻

⁹⁵ Diese und andere Gruppen haben darüber hinaus theoretische Betrachtungen zu den Grenzen der dynamischen kombinatorischen Chemie durchgeführt.⁹⁶

Auch in unserer Arbeitsgruppe ist die dynamische kombinatorische Chemie in Zusammenarbeit mit S. Otto bereits zur Rezeptoroptimierung eingesetzt worden. So wurde aus einem Cyclopeptidmonothiol und geeigneten Dithiolen eine dynamische Bibliothek von Bis(cyclopeptiden) generiert.^{53,97,98} Durch Zugabe von Sulfat oder Iodid konnten die Rezeptoren **44** und **45** für diese Anionen identifiziert werden, deren Anionenaffinität deutlich über der eines mit Adipinsäure verbrückten Bis(cyclopeptids) **42** lag.



3.2. UNTERSUCHUNGEN ZUR SYNTHESE EINES TRITHIO-HALTIGEN CYCLOPEPTIDS

Dynamische kombinatorische Bibliotheken stellen eine interessante Möglichkeit dar, um schnell und effizient neue Rezeptoren zu identifizieren. Zum Aufbau einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek aus Cyclopeptiden mit drei peripheren Substituenten müsste man, wie schematisch in Abbildung 27 gezeigt, ein Cyclopeptidtrithiol mit strukturell unterschiedlichen Monothiolen umsetzen. Durch den reversiblen Disulfidaustausch bildet sich aus diesen Komponenten eine Substanzbibliothek mit allen denkbaren Kombinationsmöglichkeiten der Substituenten um den Cyclopeptidhohlraum. Durch Zugabe geeigneter Substrate kann sich das Gleichgewicht zugunsten eines oder mehrerer komplementärer Rezeptoren verschieben. Als Cyclopeptidbaustein für diese Untersuchungen wird also Cyclopeptid **46** benötigt.

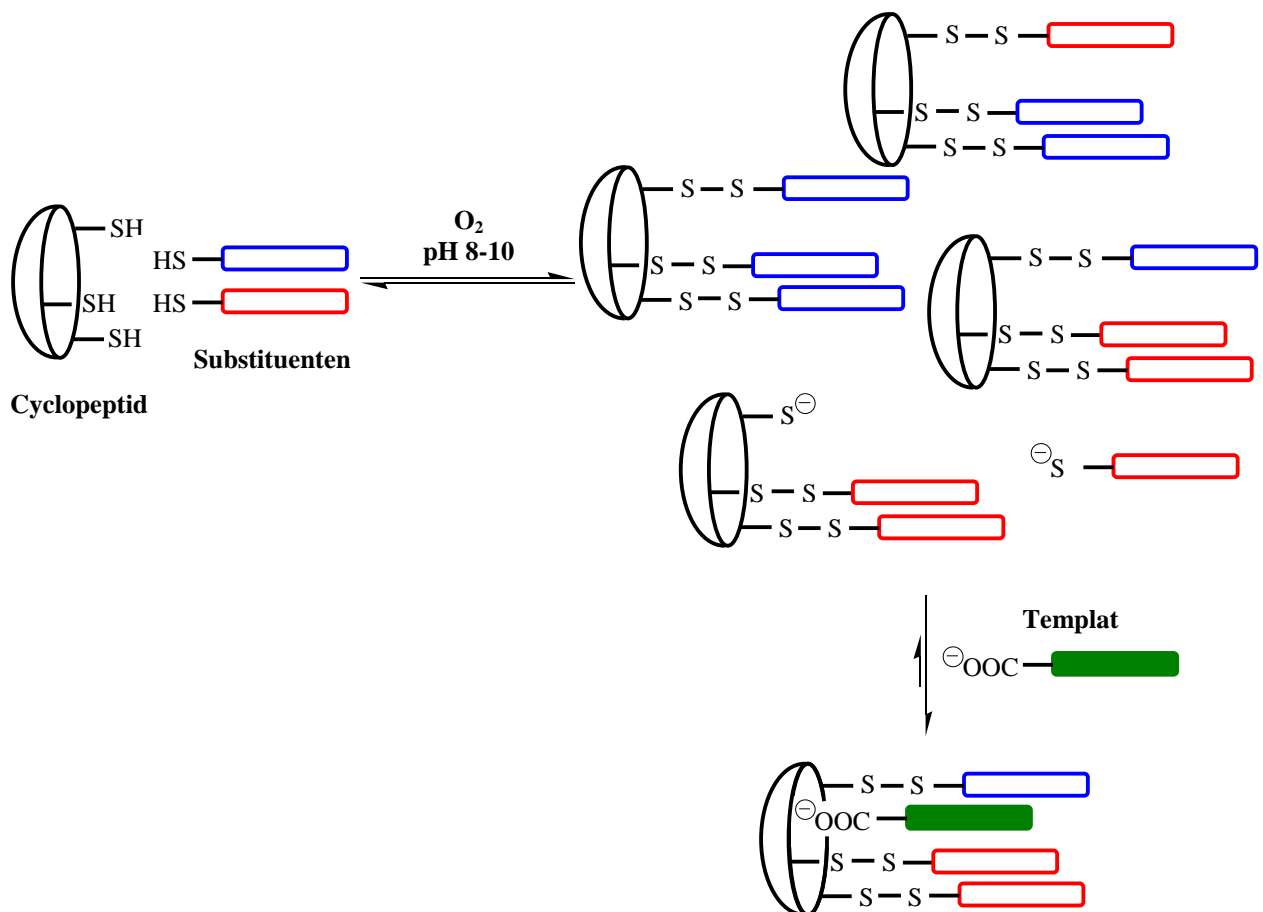
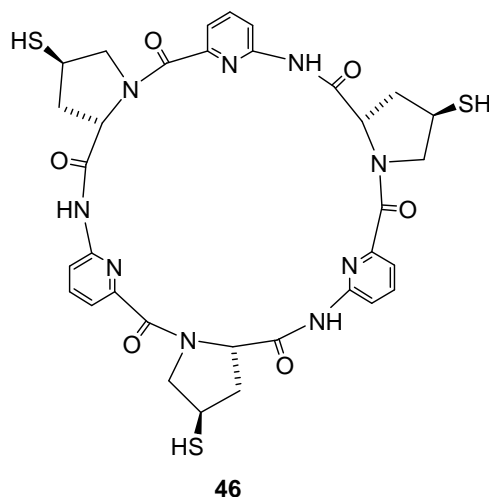


Abbildung 27. Aufbau einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek.



Die Einsatzmöglichkeiten von **46** gehen über die Anwendung in der dynamischen kombinatorischen Chemie hinaus. Die oxidative Dimerisierung von **46** könnte zu Kapseln führen, in denen zwei Cyclopeptide über drei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Gegebenenfalls können in den so gebildeten Hohlraum Anionen permanent eingeschlossen werden. Ausgehend von **46** sind zwei Stereoisomere denkbar, die man in Analogie zu oktaedrischen Komplexen als Δ - und Λ -Isomer, je nach räumlicher Orientierung der Disulfidbrücken, bezeichnen könnte. In Abbildung 28 ist die berechnete Struktur dieser Kapseln dargestellt.

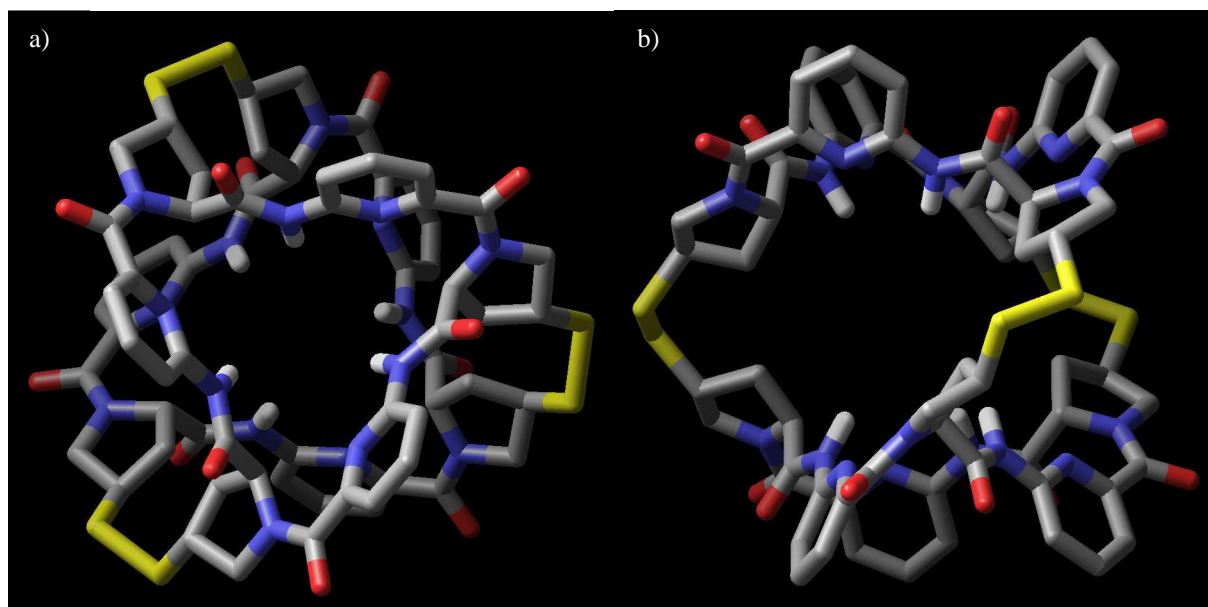
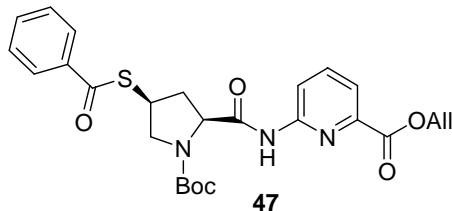


Abbildung 28. Struktur eines dreifach verbrückten Dimers von **46**, Ansicht von a) oben und b) von der Seite (semiempirische Berechnung: Kraftfeld AM1, Vakuum, MacSpartan).

Das Cyclopeptid **46** könnte also neben dem Einsatz in der dynamischen kombinatorischen Chemie auch den Einstieg in ein aktuelles Forschungsgebiet erlauben, mit dem sich gegenwärtig viele Arbeitsgruppen beschäftigen.⁹⁹⁻¹⁰⁴

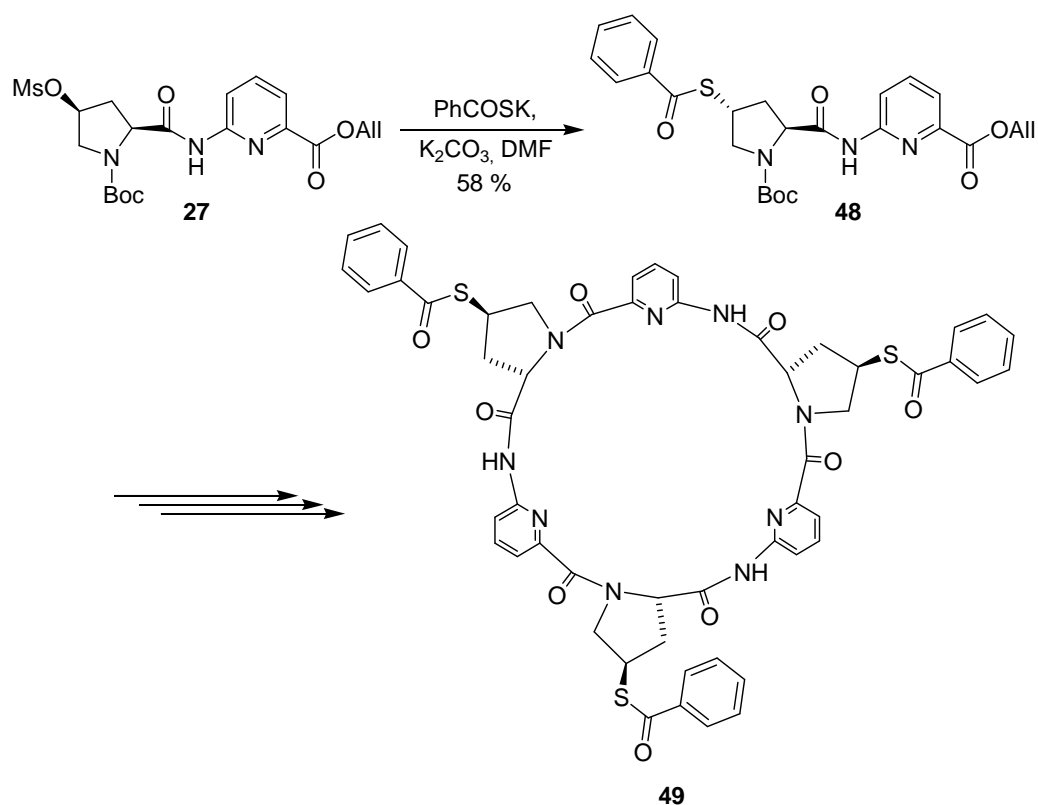
Für die Synthese des Cyclopeptids **46** konnte auf in der Gruppe vorliegende Erfahrungen zur Synthese von Cyclopeptiden mit 4-Thioprolinuntereinheiten zurückgegriffen werden. So wurde zur Synthese des Bis(cyclopeptids) **43** ein einfach tosyliertes Cyclopeptid mit Kaliumthioacetat umgesetzt. Die basische Hydrolyse des gebildeten Cyclopeptidacetats unter oxidativen Bedingungen lieferte **43**. Die nucleophile Substitution vom Cyclopeptidtosylat zum -thioacetat verlief mit einer Ausbeute von 90 %. In der entsprechenden Synthese eines dreifach substituierten Cyclopeptids ausgehend von einem Tris(tosylat) wäre also im Idealfall mit einer Ausbeute von ca. 70 % zu rechnen. Darüber hinaus ist zu erwarten, dass das Produktgemisch schwierig zu reinigen ist. Aus diesem Grund sollte **46** auf sequentiellem Wege ausgehend von einem geeigneten substituierten Dipeptid aufgebaut werden.

Von C. Reyheller wurde bereits eine Synthese für ein Cyclopeptiddithiol mit zwei 4S-konfigurierten Thioprolineinheiten erarbeitet. Diese Synthese verläuft ausgehend von Dipeptid **47**.



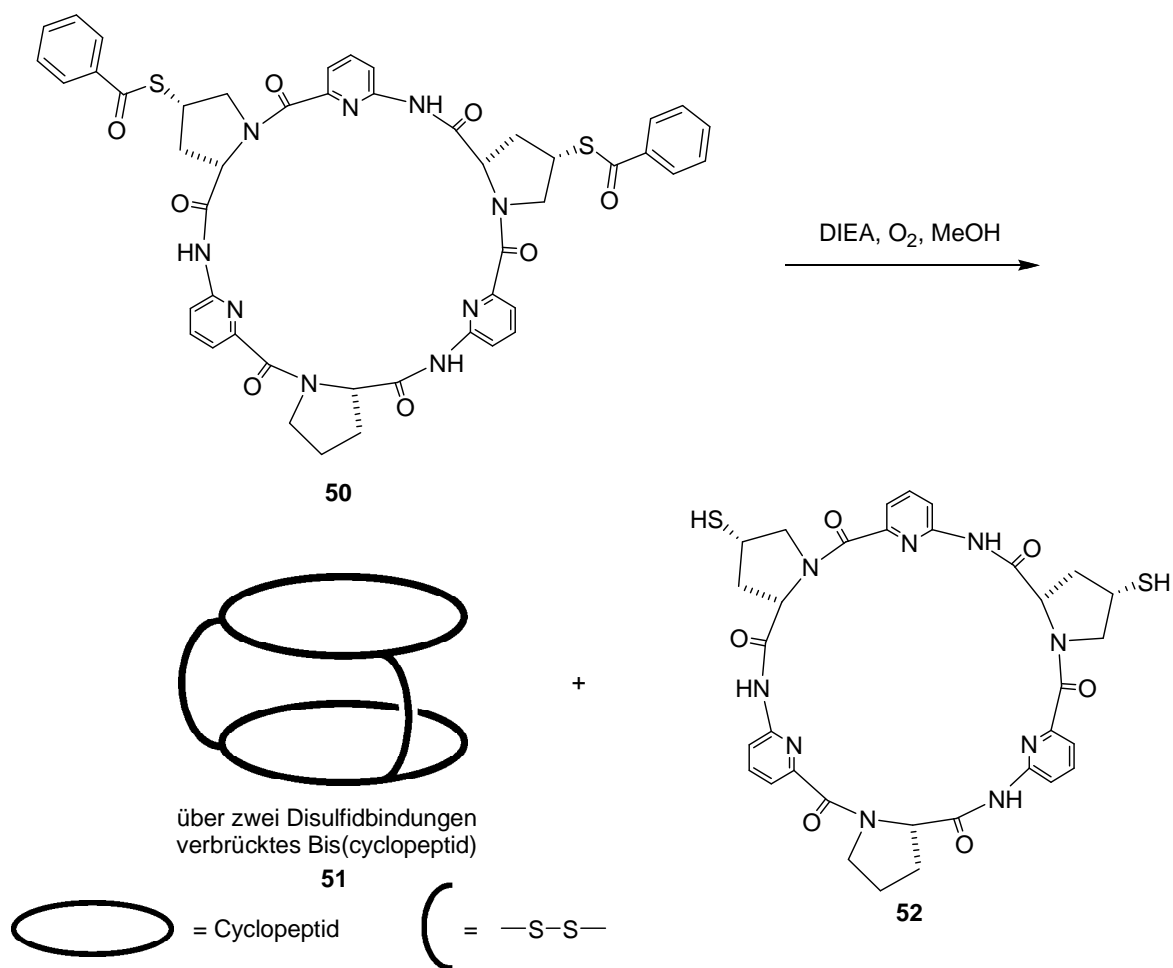
Als Schutzgruppe für die Thiogruppe wurde die Benzoylgruppe verwendet, da sich Thioacetate unter den Bedingungen der Cyclisierung als nicht stabil herausgestellt haben. Auf Basis dieser Strategie sollte das gewünschte Cyclopeptid **46** hergestellt werden.

Zur Synthese des hierfür notwendigen Dipeptids **48** wurde **27** mit dem Kaliumsalz der Thiobenzoessäure unter nucleophiler Substitution umgesetzt (Schema 11). Aus **48** wurde dann analog zum üblichen Synthesewegs das dreifach Benzoyl-geschützte Cyclopeptid **49** mit einer Gesamtausbeute von 6 % hergestellt.



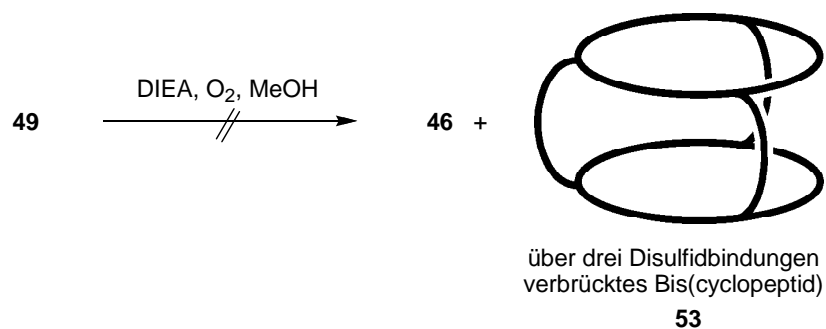
Schema 11. Synthese des Dipeptids Boc-[(TB-Pro)-Apa]-OAlI **48** zum Aufbau des Cyclopeptids **49**.

Durch Entschützen von **49** sollte **46** zugänglich sein. Für die Hydrolyse des Thioesters, der als Vorstufe zur Synthese von Bis(cyclopeptid) **43** diente, wurde die Verbindung in Methanol unter Sauerstoffatmosphäre in Gegenwart von Diisopropylethylamin umgesetzt.⁹⁷ Unter den gleichen Bedingungen gelang auch die Hydrolyse des benzylierten Dithiols, das von C. Reyheller zur Herstellung zweifach verbrückter Bis(cyclopeptide) eingesetzt wurde (Schema 12).¹⁰⁵ Als Produkt wurde ein Gemisch aus dem zweifach Disulfid-verbrückten Bis(cyclopeptid) **51** und dem monomeren Cyclopeptid **52** erhalten.



Schema 12. Synthese des zweifach Disulfid-verbrückten Bis(cyclopeptids) **51** von C. Reyheller.

Zunächst wurde versucht, diese Reaktionsbedingungen auf das Entschützen von **49** zu übertragen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von **49** in reinem Methanol wurde 1,4-Dioxan zugefügt, damit das Cyclopeptid vollständig in Lösung ging. Nach Zugabe von DIEA wurde die Reaktionsmischung mehrere Tage unter Sauerstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels MALDI/TOF-Massenspektrometrie verfolgt.



Schema 13. Entschützung des Cyclopeptids **49**.

Aufgrund der Reaktionsdurchführung unter Sauerstoffatmosphäre wurde erwartet, dass das primär entstehende freie Thiol **46** sofort oxidiert und zu einer dreifach verbrückte Kapsel **53** weiterreagieren würde (Schema 13). Wie in Abbildung 29 ersichtlich, wurde im MALDI/TOF-Massenspektren der Reaktionsmischung die Abnahme des Startmaterials ($[M+H]^+ = 1060,6$) und die Bildung der einfach ($[M+H]^+ = 956,1$), zweifach ($[M+H]^+ = 852,1$) und dreifach ($[M+H]^+ = 748,1$) entschützten Cyclopeptide beobachtet. Ebenso war nach einer Reaktionszeit von 12 Tagen eine signifikante Menge von Dimeren zu beobachten, die aus einer Mischung aus ein- bis mehrfach z.T. noch nicht vollständig entschützten, verbrückten Aggregaten bestand. Die Bildung eines einheitlichen Produktes wurde jedoch nicht beobachtet. Nach 22 Tagen waren auch Trimere und in Spuren Tetra- und Pentamere (dieser Massenbereich ist in Abbildung 29 nicht mehr dargestellt) erkennbar. In diesem Zeitraum nahm außerdem die Konzentration der monomeren Cyclopeptide wieder ab und es traten zusätzliche, nicht zu identifizierende Produkte auf. Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass bei der Reaktion unter Sauerstoff die Thiogruppen nicht nur bis zur Stufe der Disulfide, sondern auch zu Sulfoxiden oder Sulfonsäuren oxidiert werden. Bei Durchführung der Reaktion unter Stickstoffatmosphäre konnte das Auftreten von Nebenprodukten zurückgedrängt, aber nicht vollständig verhindert werden. Auch unter diesen Bedingungen war die vollständige Hydrolyse nicht zu erreichen.

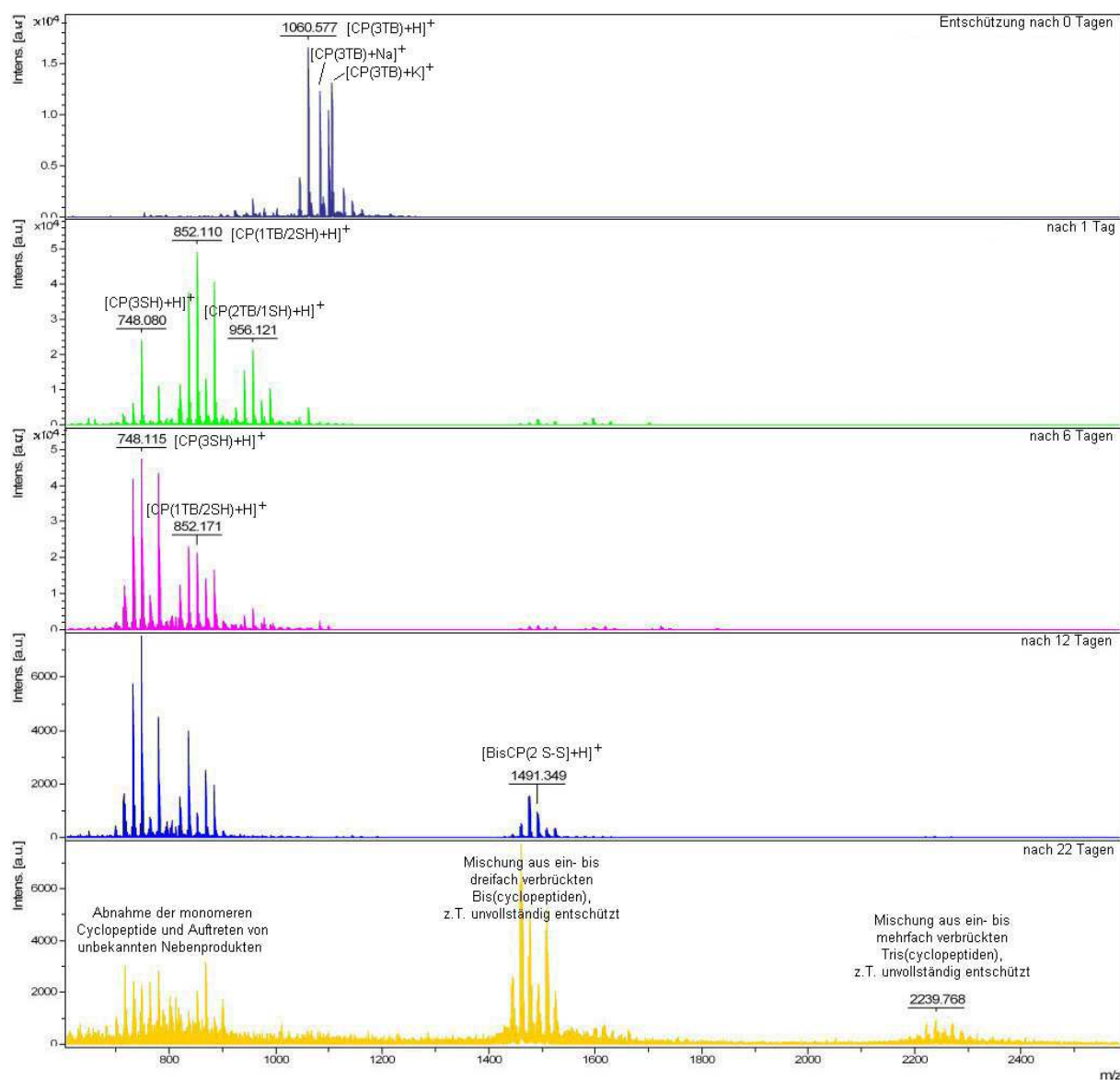
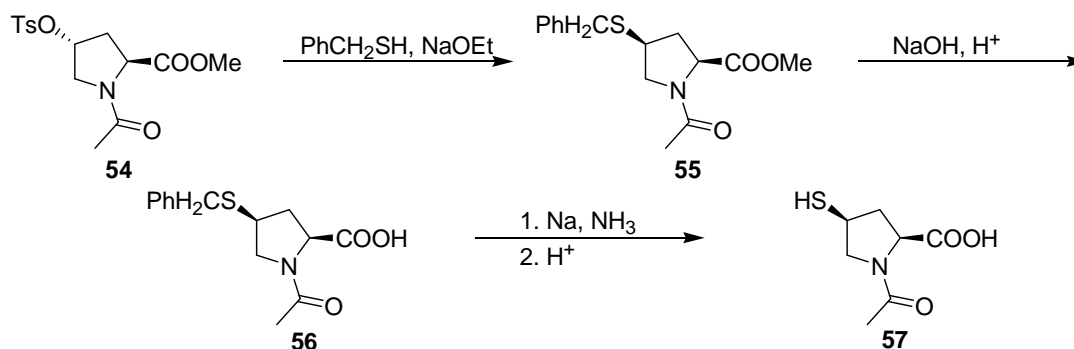


Abbildung 29. Massenspektren der Reaktionsmischung der Hydrolyse von Cyclopeptid **49** nach verschiedenen Zeiträumen (TB = Thiobenzoesäure, SH = freies Thiol, S-S = Disulfidbrücke).

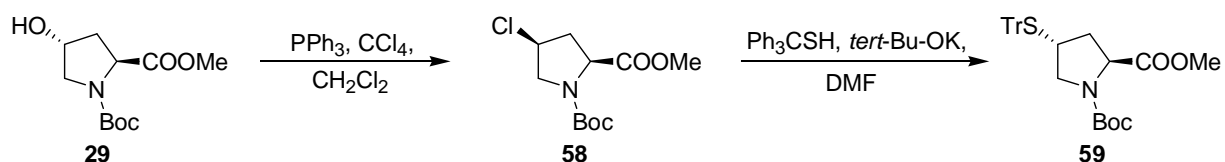
Die Reaktionsbedingungen, unter denen Cyclopeptid **50** erfolgreich entschützt werden konnte, sind also zum Entschützen von **49** ungeeignet. Daher wurden diverse weitere Methoden getestet, um die Benzoylgruppen in **49** zu hydrolysieren. So wurde unter anderem Natriumhydroxid in Methanol unter Wasserstoffatmosphäre¹⁰⁶ oder eine Mischung aus Natronlauge (pH 13)/Acetonitril verwendet.¹⁰⁷ Neben Natronlauge wurden auch andere Basen wie wässriges Ammoniak, Natriummethanolat und die starke, nicht nucleophile Base DBU verwendet. In keinem Fall konnte jedoch die Bildung des gewünschten Produkts beobachtet werden. Entweder zersetzte sich das Cyclopeptid oder die Entschützung war so langsam, dass eine Überoxidation oder eine Zersetzung zur Hauptreaktion wurde. Auch Erhitzen brachte keinen Erfolg.

Warum die Hydrolyse aller drei Thiobenzoate in **49** nicht realisiert werden konnte, ist unklar. In der Literatur gibt es zahlreiche Methoden für analoge Reaktionen. In der Regel werden alkoholische Kalium- oder Natriumhydroxid-Lösungen oder Kaliumcarbonatlösung verwendet¹⁰⁸⁻¹¹¹ oder Lösungen von verschiedenen Aminen in Methanol.¹¹²⁻¹¹⁴ Da diese Reaktionsbedingungen im Falle von **49** nicht zum Erfolg geführt haben, muss die Synthesestrategie zur Darstellung von **46** vollständig umgestellt werden.



Schema 14. Synthese eines Mercaptoprolins nach L. Field.¹¹⁵

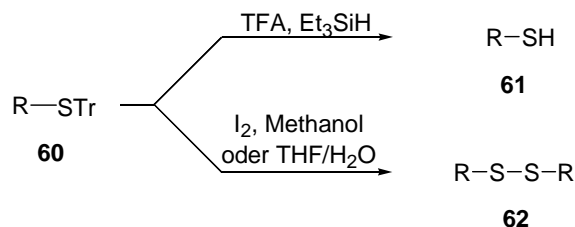
Bekannt ist z.B. die Substitution eines tosylierten Hydroxyprolins **54** mit Phenylmethanthiol und Natriummethanolat (Schema 14).¹¹⁵ Das Abspalten des Benzyls in **56** erfolgt mit ammoniakalischem Natrium und anschließendem Ansäuern.



Schema 15. Einführung der Thiofunktionalität in ein Prolinderivat.¹¹⁶

Eine weitere Alternative wäre die Verwendung eines Trityl-geschützten Mercaptoprolins **59**. Bei der Synthese dieser Verbindung wurde Boc-Hyp-OMe **29** mit Triphenylphosphan und Tetrachlorkohlenstoff unter Inversion zum Chlorprolin **58** und unter erneuter Substitution mit Triphenylmethanthiol und Kalium-*tert*-butanolat zum gewünschten geschützten Thiol **59** umgesetzt (Schema 15).¹¹⁶ Das Abspalten der Tritylschutzgruppe erfolgt unter Verwendung von Trifluoressigsäure/Triethylsilan (Schema 16). In Anwesenheit von Iod in Methanol oder THF/Wasser finden Entschützung und Oxidation zum entsprechenden Disulfid in einem Schritt statt.¹¹⁷ Da die Tritylgruppe säurelabil ist, wird sie den Standardbedingungen zur Boc-Entschützung beim Aufbau zum Cyclopeptid mit 4 N HCl in Dioxan wahrscheinlich nicht

stand halten. Man müsste also die Boc-Entschützung z.B. mit Trifluoressigsäure durchführen, da die Tritylgruppe unter diesen Bedingungen nicht abgespalten wird. Die Realisierung dieser Methoden zum Aufbau von **46** muss in zukünftigen Untersuchungen getestet werden.



Schema 16. Abspalten der Trityl-Schutzgruppe.^{116,117}

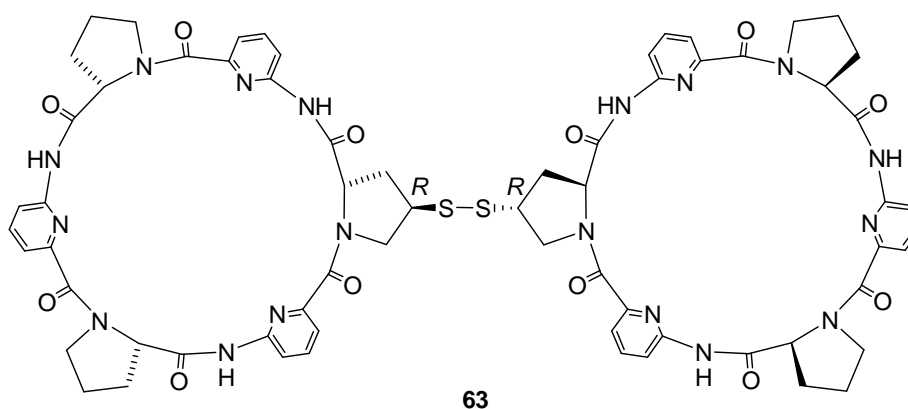
Aus Zeitgründen wurden weitere Arbeiten zur Synthese von **46** im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Da dieses Cyclopeptid also nicht erfolgreich synthetisiert werden konnte, liegen bisher auch keine Ergebnisse zu Untersuchungen im Zusammenhang mit der dynamischen kombinatorischen Chemie vor.

3.3. SYNTHESE EINES EINFACH VERBRÜCKTEN BIS(CYCLOPEPTID)DISULFIDS

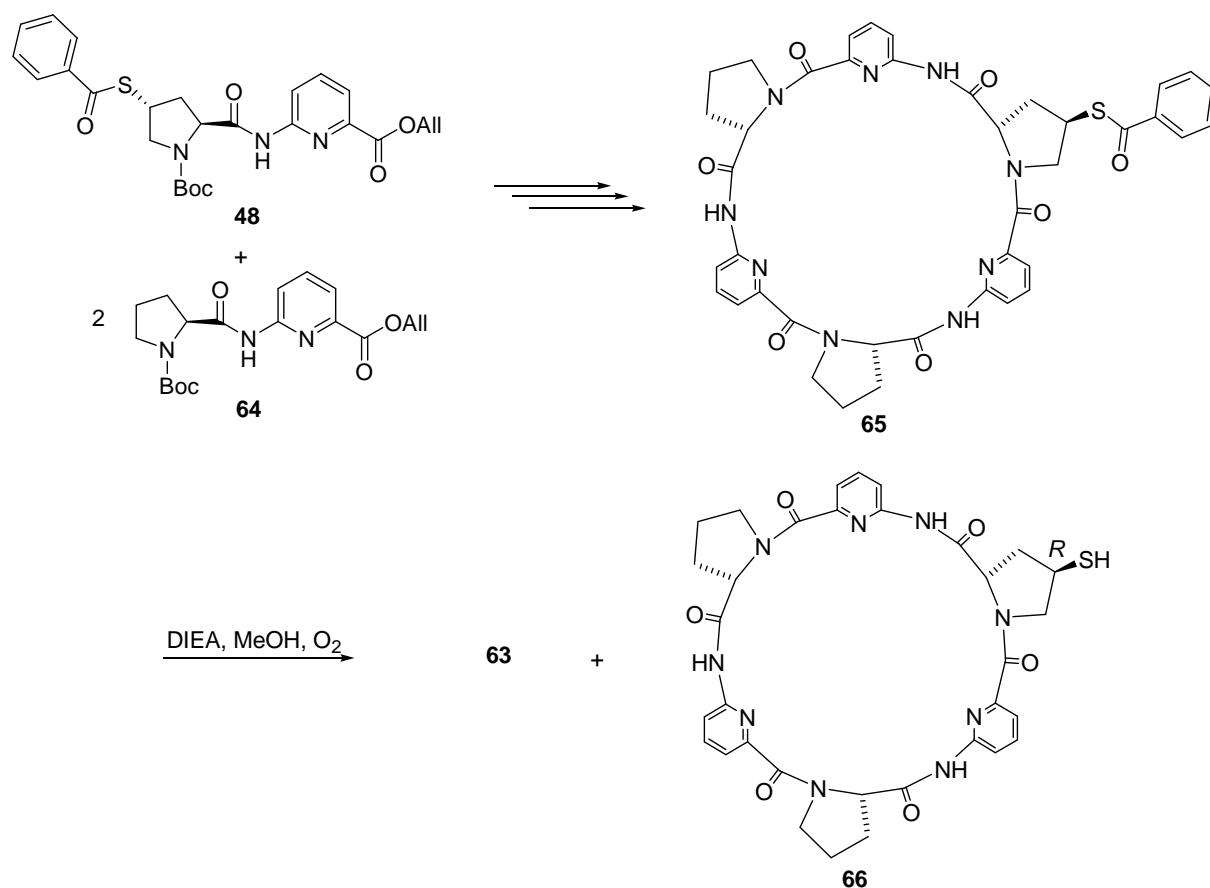
Bisherige Untersuchungen zur Optimierung der Bindungseigenschaften der Cyclopeptide beschäftigten sich meist mit dem Einfluss von Substituenten entlang des Cyclopeptidrings oder des Linkers in den verbrückten Bis(cyclopeptiden). Die Wahl der Konfiguration am C(γ) der Prolinuntereinheit stützte sich vorwiegend auf Molecular Modelling Studien. Ein systematischer Vergleich des Einflusses von *R*- und *S*-Konfiguration am C(γ) substituierter Cyclopeptide auf die Bindungseigenschaften wurde bisher nur unter Verwendung von Cyclopeptid **2** und dem entsprechenden Derivat mit drei *4S*-konfigurierten Hydroxyprolinuntereinheiten durchgeführt.⁵¹ Bei diesen Untersuchungen ergaben sich signifikante Unterschiede in Eigenschaften wie Löslichkeit, Konformation und Bindungseigenschaften.

Die Methoden der dynamischen kombinatorischen Chemie sollen durch den schnellen Zugang zu vielen potentiellen Rezeptorverbindungen vergleichende Untersuchungen zum Einfluss der Cyclopeptidstruktur auf die Bindungseigenschaften der sich daraus ableitenden Rezeptoren erleichtern.

Das Bis(cyclopeptid)disulfid **43** mit der *S*-Konfiguration am C(γ)-Atom der substituierten Prolinuntereinheit ist bereits zum Aufbau einer dynamischen Rezeptorbibliothek eingesetzt worden.^{53,97,98} Die Darstellung eines analogen Bis(cyclopeptids) mit invertierter Konfiguration am C(γ) des Thioprolins (**63**) und dessen Einsatz in der dynamischen kombinatorischen Chemie sollte zeigen, ob trotz der geänderten Konfiguration in den substituierten Prolinuntereinheiten anionenbindende Bis(cyclopeptide) erhalten werden können und welchen Einfluss die Konfiguration auf die Struktur des Linkers besitzt.



Auf Basis der Synthese von **49** war ein analoges Derivat **66** mit einer substituierten Prolineinheit, wie in Schema 17 dargestellt, leicht zu realisieren. So wurde das entsprechende Cyclopeptid **63** aus einem Dipeptid **48** und zwei Dipeptideinheiten **64**, welche aus Boc-Pro-OH **7** und 6-Aminopicolinsäureallylester **15** unter Verwendung von PyCloP/DIEA in Methylenchlorid aufgebaut wurden, analog des allgemeinen Cyclopeptidsynthesewegs (Schema 2) dargestellt. In diesem Fall gelang die Hydrolyse und Oxidation zum Disulfid mit Diisopropylethylamin in Methanol unter Sauerstoffatmosphäre nach zwei Tagen problemlos. Ich erhielt eine Mischung aus dem Bis(cyclopeptid)disulfid **63** und dem Cyclopeptid mit freier Thiogruppe **66**. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte reines Cyclopeptid **66** isoliert werden. Das Bis(cyclopeptid)disulfid **63** wurde nur als Gemisch mit **66** erhalten.



Schema 17. Synthese von Bis(cyclopeptid) **63** und Cyclopeptid **66**.

Die Verbindungen **63** und **66** wurden an unseren Kooperationspartner S. Otto nach Cambridge verschickt. Dort soll mit Hilfe der dynamischen kombinatorischen Chemie überprüft werden, ob auf Basis von **63** Bis(cyclopeptide) zugänglich sind, in denen sich die beiden Cyclopeptidringe des Rezeptors kooperativ an der Anionenbindung beteiligen.

Weiterhin ist interessant, welchen Einfluss die im Vergleich zu **43** geänderte Konfiguration am C(γ) der substituierten Prolinuntereinheit auf die Struktur des Linkers besitzt, der die beiden Cyclopeptide zu dem einsprechenden Bis(cyclopeptid) verbrückt. Diese Arbeiten sind bisher noch nicht durchgeführt worden, weswegen noch keine Ergebnisse vorliegen.

4. SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON OPTISCHEN SENSOREN

4.1. THEORETISCHER HINTERGRUND

Zur Untersuchung der Komplexbildung der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Cyclopeptide wurde die NMR-Spektroskopie und die isotherme Titrationskalorimetrie angewendet. Diese apparativ relativ aufwendigen Verfahren gestatten die qualitative und quantitative Charakterisierung der Komplexbildung. Gerade im Hinblick auf praktische Anwendungen der Cyclopeptide ist es aber wünschenswert, wenn der Vorgang der Komplexbildung mit einer weniger aufwendigeren Methode detektiert werden könnte. Ein Cyclopeptidderivat, bei dem die Komplexbildung beispielsweise optische Eigenschaften wie UV/Vis-Absorption oder Fluoreszenz ändert, kann als optischer Sensor eingesetzt werden. Im Idealfall kann die Veränderung der Farbe oder Emission einer Lösung dieses Cyclopeptids bei Komplexbildung selektiv die Anwesenheit des entsprechenden Substrats in Lösung anzeigen. Dabei gibt es im Wesentlichen zwei Vorgehensweisen, um die Substratbindung zu verfolgen: Im ersten Fall enthält das Sensormolekül einen Bereich, der für die Substratbindung zuständig ist und einen für die Signalgebung. Letzterer kann z.B. ein Fluorophor, Chromophor oder redoxaktives Zentrum sein. Beide Bereiche müssen miteinander kommunizieren, damit eine Signalgebung gewährleistet ist. In der Praxis ist der signalgebende Teil eines optischen Sensors oft ein an das Rezeptormolekül gebundener Farbstoff, welcher seine optischen Eigenschaften bei der Substratbindung ändert. Die zweite Möglichkeit zur optischen Detektion bietet das sogenannte *indicator displacement assay*.¹¹⁸⁻¹²⁰ Dabei bildet der Rezeptor mit einem Farbstoff (meist einem Indikator) einen Komplex. Bei der Substratbindung wird das Indikatormolekül aus diesem Komplex verdrängt, wodurch sich seine optischen Eigenschaften ändern.

Die meisten optischen Sensoren gehören zur ersten Sorte.¹²¹⁻¹²³ Ueno et al. beschäftigen sich beispielsweise mit dem Einschluss von Terpenen, Steroiden und anderen Naturstoffen in Farbstoff-substituierte Cyclodextrine.¹²⁴⁻¹²⁶ Die β - oder γ -Cyclodextrine tragen als fluorophore Einheit einen Dansyl-, Pyren- oder 4-Amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazolsubstituenten, welcher in Abwesenheit des Substrats im Inneren des Cyclopeptids gebunden wird. In Anwesenheit eines Substrats wird dieses in den Hohlraum eingelagert und der Chromophor verdrängt. Dabei ändert sich seine Fluoreszenzintensität. Da für die Komplexbildung im wesentlichen hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich sind, ist

dieser Rezeptor ungeeignet für polarere Gäste. Der auf 6-Methoxy-1-methylquinolinium basierende Rezeptor von L. Fabbrizzi (Abbildung 30a) hingegen unterscheidet sich durch zwei Eigenschaften grundlegend vom Beispiel Uenos.¹²⁷ Durch die positive Ladung sind elektrostatische Wechselwirkungen mit Anionen möglich und die chromophore Einheit ist direkt an der Komplexierung beteiligt. In Anwesenheit eines Anions erhöht sich die Absorption im UV/Vis-Spektrum. Ähnlich verhält es sich bei dem auf einem Calix[4]aren basierenden Sensor der Gruppe um D. Diamond (Abbildung 30b).¹²⁸ Zwei Anionen, hier ist es bevorzugt Chlorid, können über Wasserstoffbrücken an die Harnstoffeinheiten gebunden werden. Dabei werden die paarweise angeordneten Pyrensubstituenten auseinandergedrückt, wodurch die Fluoreszenz des Sensors einen starken hypsochromen Shift erfährt.

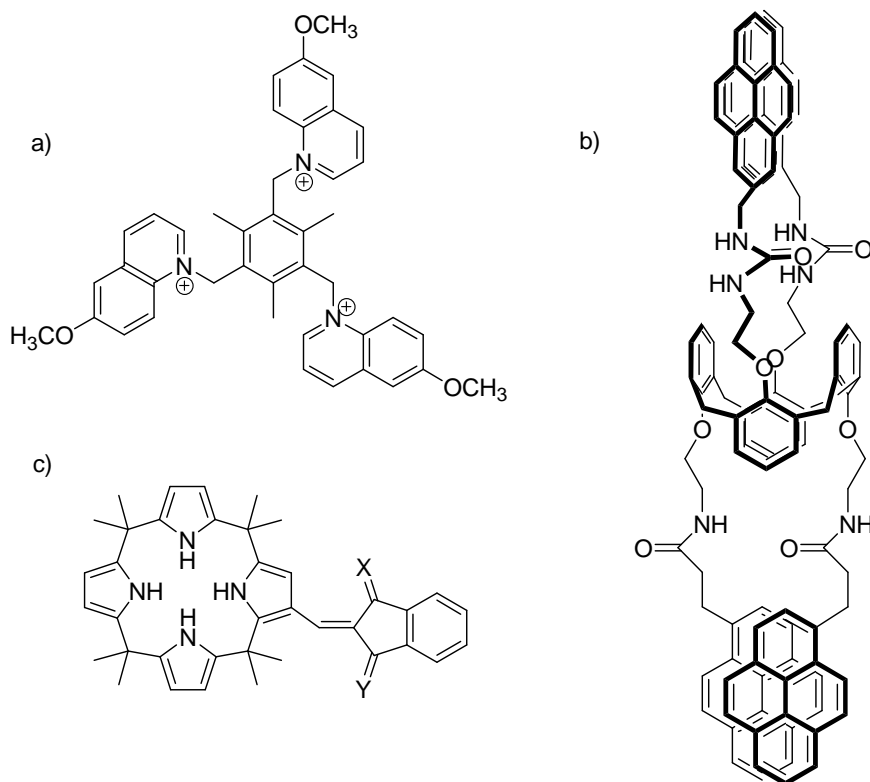


Abbildung 30. Fluoreszenzaktive Rezeptoren nach a) L. Fabbrizzi,¹²⁷ b) D. Diamond¹²⁸ und c) P. Anzenbacher.¹²⁹

Diese starke Farbverschiebung kann auch bei der Anionenkomplexierung bei dem Calixpyrrolsensor von P. Anzenbacher (Abbildung 30c) beobachtet werden.¹²⁹ Abhängig von den Gruppen X und Y (Sauerstoff oder Dicyanomethyliden) besitzen schon die reinen Rezeptoren Farben von gelbbraun oder pink. Bei Zugabe verschiedener Anionen wechselt die Farbe substratspezifisch, das heißt, der Farbwechsel zeigt nicht nur an, dass ein Gast gebunden wird, sondern über Fluoreszenzmessungen kann sogar identifiziert werden, um

welches Anion es sich handelt. Im Sinne eines *push-pull* Mechanismus führt die Wasserstoffbrücke zum gebundenen Anion zu einem Elektronentransfer vom elektronenreichen Pyrrol zum elektronenarmen Indanyliden. Dies wiederum führt dazu, dass das Pyrrol-NH azider wird und sich eine erhöhte Anionenaffinität ergibt.

Die Gruppe um E.V. Anslyn hat diverse Sensorsysteme entwickelt, in denen das *indicator displacement assay* Anwendung findet. Die auf 1,3,5-trisubstituierten 2,4,6-Triethylbenzol basierenden Rezeptoren in Abbildung 31a und b mit Guanidiniumsubstituenten bzw. einem Guanidinium und zwei Boronsäuresubstituenten dienen zur Bestimmung von Citrat in Getränken bzw. zur Altersbestimmung von Scotch.^{118,119,130-132} In beiden Fällen werden die in dem *indicator displacement assay* verwendeten Indikatoren (5-Carboxyfluorescein bzw. Pyrocatecholviolett) schwächer gebunden als das Substrat und von diesem bei Zugabe verdrängt. Die Verdrängung kann über UV/Vis-Messungen verfolgt werden. Ein ähnlicher Rezeptor wird auf analoge Weise zur Erkennung von Inositoltriphosphat (IP₃) eingesetzt.¹³³

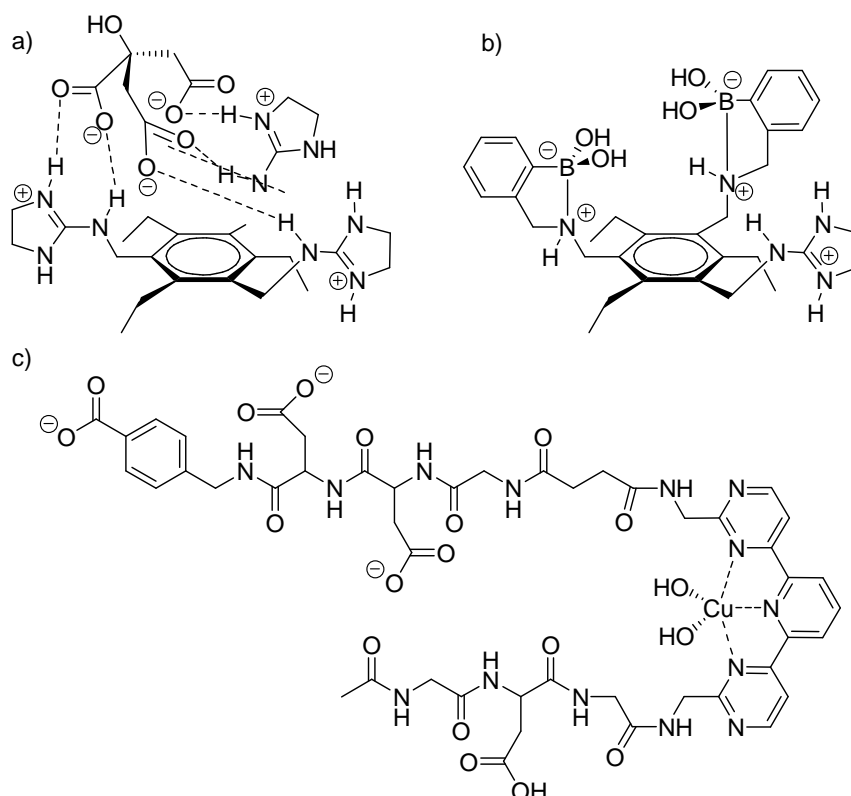


Abbildung 31. Rezeptoren der Arbeitsgruppe um E.V. Anslyn.^{132,134}

Das Konzept der in der Einleitung beschriebenen, Pinzetten-ähnlichen Rezeptoren wurde ebenfalls von E.V. Anslyn aufgegriffen. In diesem Zusammenhang beschrieb er einen Rezeptor mit einem metallhaltigen Bindungszentrum für das Carboxylatende eines Tripeptids und unterschiedlich langen Peptidseitenketten (Abbildung 31c).¹³⁴ An Polymerbeads wurde

zuerst der eine Peptidarm synthetisiert, an den dann die polyazatricyclische Hauptbindungseinheit geknüpft wurde. Beim Aufbau des zweiten Arms an der anderen Seite des Polyazatricyclus wurden die Aminosäureeinheiten in einem kombinatorischen Ansatz variiert.¹³⁵ Bei der Analyse, welche Rezeptorstrukturen für die selektive Tripeptidbindung geeignet sind, wurden die Polymerbeads zuerst mit Substratlösung und anschließend mit einer Lösung des Farbstoffs Orange G versetzt. Bei schwacher Wechselwirkung des Substrats mit dem Rezeptor wird bevorzugt der Farbstoff gebunden, bei einer starken Wechselwirkung das Substrat.

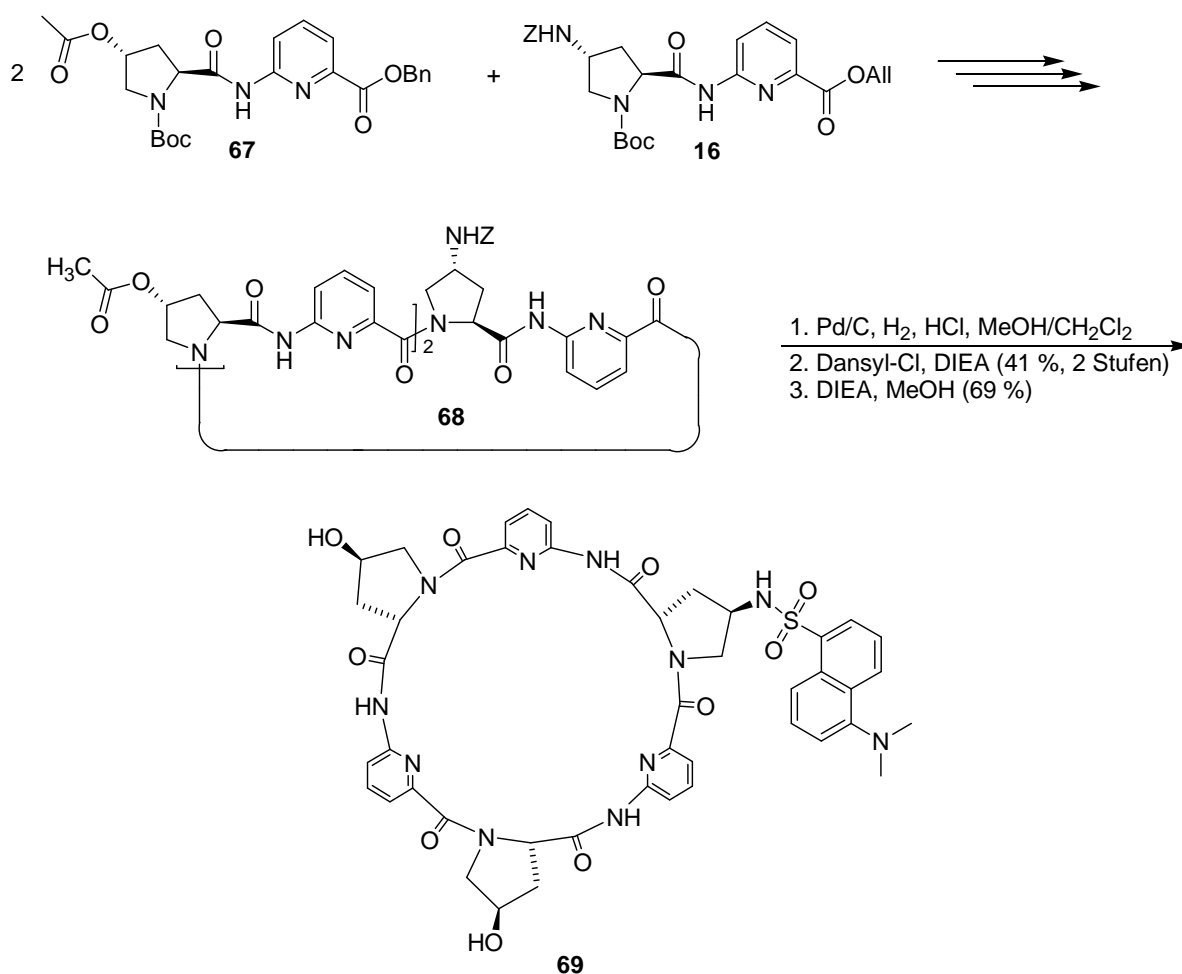
Im Rahmen dieser Dissertation wurden analoge Wege verfolgt, um auf Basis der hergestellten Cyclopeptide optische Sensoren für anionische Substrate zu entwickeln.

4.2. SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG EINES CYCLOPEPTIDS MIT DANSYL-SUBSTITUENTEN

Zur Synthese eines optischen Sensors auf Basis substituierter Cyclopeptide muss ein geeigneter Chromophor in räumlicher Nähe des Hohlraums, in dem die Komplexbildung stattfindet, eingeführt werden. Als Chromophore kommen prinzipiell viele Farbstoffe in Frage, die bei biochemischen Untersuchungen als Fluoreszenzlabel eingesetzt werden. Einer der am häufigsten verwendeten Label ist die stark fluoreszierende Dansylgruppe, weswegen zu Beginn der Untersuchungen zunächst ein Cyclopeptidmolekül mit einem Dansyl-Substituenten an einer der Prolinuntereinheiten synthetisiert wurde. Das entsprechende Cyclopeptid **69** enthält zwei 4*R*-Hydroxyprolineinheiten, die die Wasserlöslichkeit erhöhen sollen, und eine 4*R*-Aminoprolineinheit, die über eine Sulfonamidgruppe einen Dansyl-Substituenten trägt. Dieses Cyclopeptid wurde auf dem in Schema 18 dargestellten Weg synthetisiert.

Dabei stellt Cyclopeptid **68** die Ausgangsverbindung zur Realisierung der Sensorsynthese dar. Über die Amino-funktionalisierte Prolinuntereinheit kann der Dansylfarbstoff leicht eingeführt werden. Cyclopeptid **68** setzt sich aus den zwei Dipeptiden **16** und **67** zusammen. Die Synthese von Dipeptid **16** wurde bereits in Kapitel 2.1 beschrieben. Das Dipeptid **67** erhält man durch Reaktion von Boc-L-Hydroxyprolin **7** mit 6-Aminopicolinsäurebenzylester und PyCloP/DIEA in Methylenchlorid und anschließender Acetylierung der Hydroxygruppe mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von DIEA in Methanol.⁵¹ Der Aufbau des Cyclopeptids **68** erfolgt gemäß der allgemeinen Vorschrift in Schema 2 mit dem Unterschied, dass die Benzylschutzgruppen hydrogenolytisch mit Pd/C unter Wasserstoffatmosphäre abgespalten werden.

Für die Synthese der Zielverbindung wurde **68** unter hydrogenolytischen Methoden Z-entschützt und das freie Amin mit 5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonylchlorid (Dansylchlorid) umgesetzt. Anschließend wurden die Acetylgruppen basisch verseift. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhielt ich in einer Gesamtausbeute von 2 % den analysenreinen Rezeptor **69**, welcher in Lösung bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 366 nm hellgelb fluoresziert.



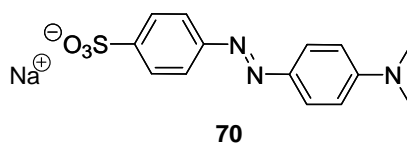
Schema 18. Syntheseweg zum Dansyl-substituierten Cyclopeptid **69**.

Löslichkeitsstudien mit verschiedenen Wasser/Methanol-Gemischen zeigten, dass **69** in einer Konzentration von 1 mM in Gemischen mit bis zu 95 % Wasser vollständig löslich ist. Die Aufnahme von Emissionsspektren bei Anregung der Lösung mit Licht der Wellenlänge 350 nm in den gleichen Lösungsmittelgemischen zeigte eine deutliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Wassergehalt der Lösung. Mit Zunahme des Wassergehalts sank die Intensität des Emissionsmaximums der Bande bei 560 nm. Um eine für Untersuchungen zum Einfluss der Komplexbildung auf das Emissionsspektrum von **69** ausreichende Fluoreszenzintensität der Lösungen zu gewährleisten, wurden daher alle Messungen in 50 % Wasser/Methanol durchgeführt.

Bei Zugabe von Iodid oder Sulfat zu Lösungen von **69** in diesem Lösungsmittelgemisch konnte ich leider keine signifikante Veränderung der Fluoreszenzbande bei 560 nm feststellen. Sulfat wird von **2** im selben Lösungsmittel mit signifikanter Affinität gebunden ($K_a = 260 \text{ M}^{-1}$).⁵² Eine NMR-Titration von **69** mit Sulfat ergab für die Anionenkomplexierung eine vergleichbare Bindungskonstante von $K_a = 240 \text{ M}^{-1}$. Dies zeigt, dass Sulfat in 50 %

Wasser/Methanol von **69** durchaus komplexiert wird, die Komplexbildung aber keine Auswirkung auf das Fluoreszenzspektrum besitzt. Während der Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurde nur eine langsame Abnahme der Intensität der Emissionsbande von **69** bei anhaltender Bestrahlung beobachtet, die aber auch in Abwesenheit von Sulfat auftritt und auf das sogenannte *photo bleaching*, der Zersetzung des Dansylchromophors unter dem Einfluss des UV-Lichts, zurückzuführen ist.¹³⁶

Da die direkte Bindung eines Anions also nicht zur Veränderung der Fluoreszenz von **69** führt, wurde im Folgenden überprüft, ob die Anionenbindung indirekt durch Anwendung des *indicator displacement* Verfahrens beobachtet werden kann.^{119,137,138}



Zur Realisierung dieses Konzepts habe ich Methylorange **70** als Indikator gewählt, von dem bekannt ist, dass es die Fluoreszenz von Dansylgruppen durch Wechselwirkungen mit deren π -System quencht.^{136,139} Darüber hinaus verfügt Methylorange über eine Sulfonsäuregruppe, wodurch es von **69** gebunden werden sollte.

In unabhängigen NMR-Titrationsen wurde zunächst die Stabilität des Komplexes von **69** mit Methylorange **70** ermittelt. Danach beträgt die Bindungskonstante 59 M^{-1} . Die Voraussetzung für die Anwendung eines *indicator displacement assays*, nämlich die höhere Stabilität des Komplexes zwischen dem Rezeptor und dem Substrat im Vergleich zu der des Komplexes zwischen Rezeptor und Indikator, ist also erfüllt. Zusätzlich weisen Shifts der Signale von Cyclopeptid- und Dansylprotonen von **69** im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei der Bildung des Methylorange-Komplexes auf eine räumliche Nähe des Farbstoffmoleküls zum Fluoreszenzchromophor und zum Rezeptor hin. Der Methylorange-Komplex von Cyclopeptid **2**, dem die zusätzliche Wechselwirkung zwischen Dansylgruppe und Methylorange fehlt, besitzt nur eine Stabilitätskonstante von 15 M^{-1} .

Der Einfluss der Methylorangezugabe auf die Fluoreszenz von **69** ist in Abbildung 32 abgebildet. Wie erwartet wird mit steigender Methylorangekonzentration die Fluoreszenz der Dansylgruppe gequencht, eine vollständige Löschung der Fluoreszenz wird aber erst bei einem Überschuss von ca. 100 Äquivalenten Methylorange beobachtet. Dieses Ergebnis ist auf die geringe Stabilität des Komplexes zwischen **69** und **70** sowie auf die bei der Fluoreszenztitration verwendeten geringeren Konzentration der beiden Komponenten zurückzuführen. Für ein *indicator displacement assay* ist der hohe Überschuss des Indikators,

der für die Fluoreszenzlöschung notwendig ist, außerordentlich ungünstig. Wünschenswert wäre vielmehr, wenn bereits bei äquimolaren Verhältnissen von Rezeptor und Indikator die Fluoreszenz des Rezeptors effizient gequencht wäre.

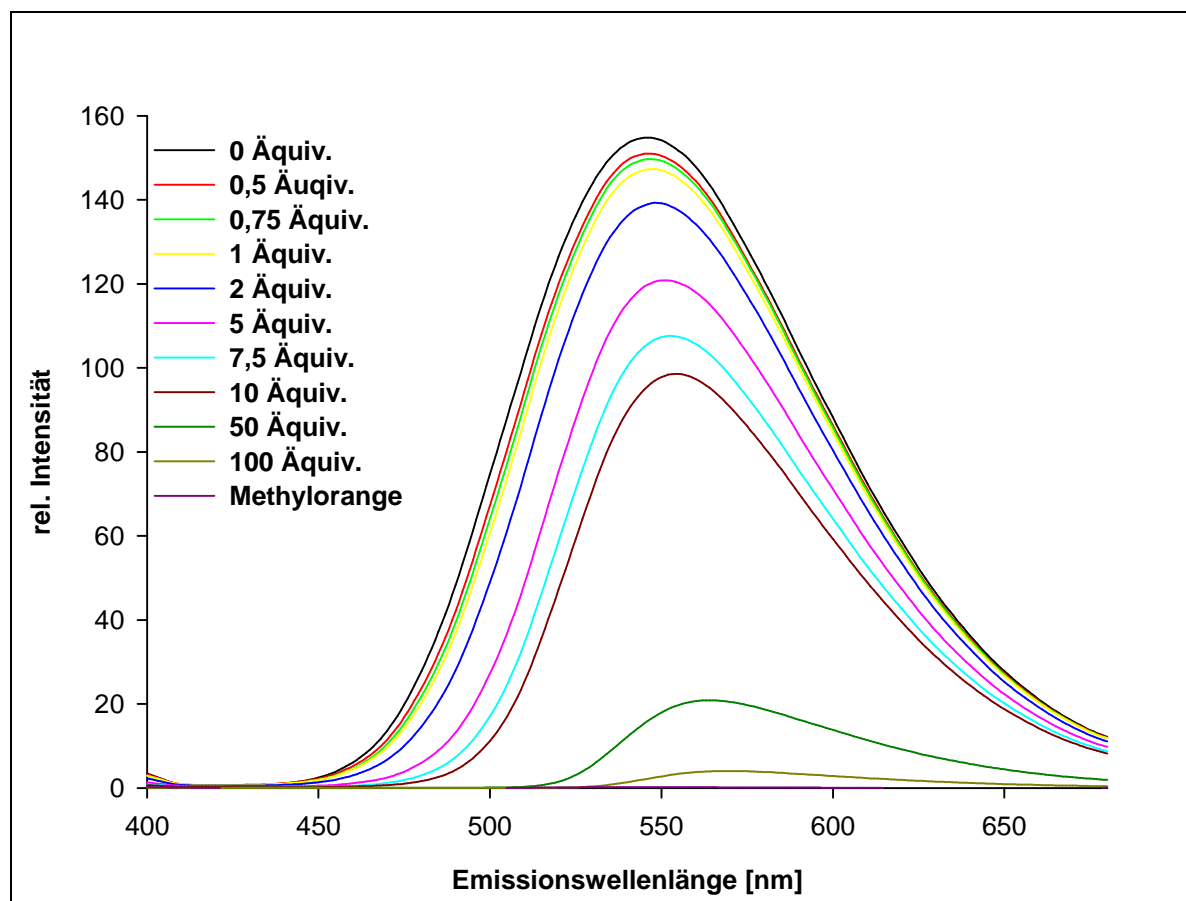


Abbildung 32. Fluoreszenztitration von Cyclopeptid **69** mit Methylorange **70** in 50 % Wasser/Methanol.

Die Auftragung der in Abbildung 32 dargestellten Abnahme der Fluoreszenzintensität im Maximum der Emissionsbande gegen die Methylorangekonzentration liefert eine Sättigungskurve, aus der die Stabilitätskonstante des gebildeten Komplexes berechnet werden kann. Als Ergebnis erhält man $K_a = 4150 \text{ M}^{-1}$. Dieser Wert weicht erheblich von dem der NMR-Titrations ab. Eine Struktur eines optimalen Komplexes zwischen **69** und **70** ist in Abbildung 33 dargestellt. Die Sulfonatgruppe wird von den Amidprotonen des Cyclopeptidrings gebunden und die aromatischen Einheiten von Methylorange und Dansylchromophor können ebenfalls miteinander wechselwirken. Das Ergebnis der Fluoreszenztitration zeigt allerdings, dass dies nicht der Realität entspricht. Eine mögliche Erklärung ist, dass es neben der spezifischen Bindung der Sulfonatgruppe des Methyloranges an **69**, welche mit Hilfe der NMR-Titration verfolgt wird, eine weniger spezifische

Wechselwirkung, z.B. über aromatische Wechselwirkungen, zwischen der Dansylgruppe von **69** und nicht vom Cyclopeptid gebundenem Methylorange gibt, welche zur Fluoreszenzlöschung führt.

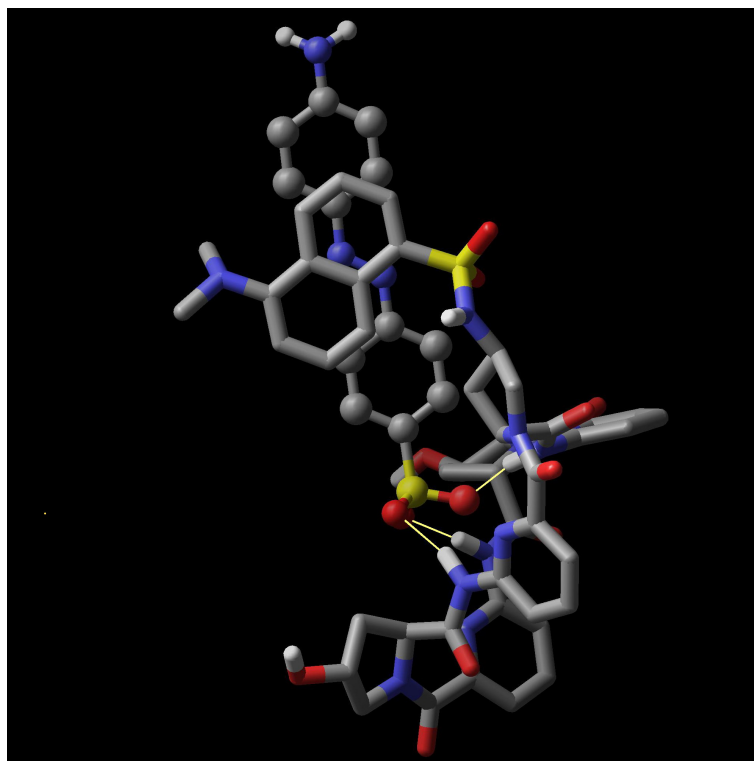


Abbildung 33. Berechnete Struktur des Komplexes von **69** mit Methylorange **70** (Macromodel 7.0, Konformationssuche: Kraftfeld Amber*, Methode MCMM, 3000 Schritte; Minimierung: Methode PRCG, 3000 Schritte, Lösungsmittel: Wasser). Erkennbar sind die Wasserstoffbrücken zwischen Cyclopeptid und Sulfonat und eine geeignete Anordnung zur Ausbildung von aromatischen Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Einheiten in Dansylchromophor und Methylorange.

Aufgrund des zum Quenchen der Dansylemission in **69** notwendigen Überschusses von Methylorange konnte leider auch keine Zunahme der Fluoreszenz bei Zugabe von Sulfat zur Lösung des Gemisches aus **69** und 100 Äquivalenten **70** beobachtet werden, wodurch das System aus **69** und Methylorange für ein *indicator displacement assay* ungeeignet ist.

4.3. VERSUCHE ZUR SYNTHESE EINES CYCLOPEPTIDS MIT FLUORESCEIN-SUBSTITUENTEN

Ein Grund für die ausbleibende Änderung in dem Emissionsspektrum des Dansyl-substituierten Cyclopeptids **69** bei Anionenbindung könnte ein zu großer räumlicher Abstand zwischen Chromophor und Substrat im Komplex sein. Es wurde daher nach Alternativen gesucht, das Konzept der Entwicklung optischer Sensoren auf Basis substituierter Cyclopeptide zu realisieren. Ein vielversprechender Ansatz basiert auf der Modifizierung der Cyclopeptide mit Farbstoffmolekülen, die selbst anionische Gruppen tragen. Bei geeigneter Anbindung dieser Farbstoffe an das Cyclopeptid können diese Gruppen mit den NH-Protonen im Ring des Cyclopeptids wechselwirken, wodurch das gesamte Konjugat aus Cyclopeptid und Farbstoff in einer definierten Konformation stabilisiert wird. Bei Komplexierung eines Anions, das stärker mit dem Cyclopeptid wechselwirkt als die anionische Gruppe des Farbstoffs, wird jener aus der Bindungstasche verdrängt, was höchstwahrscheinlich zu einer signifikanten Änderung in seinem Anregungs- und/oder Emissionsspektrum führen sollte.

Ein geeigneter Chromophor, mit dem dieses Konzept realisiert werden kann, ist Fluorescein, das als Fluoresceinisothiocyanat (Isomer I) kommerziell erhältlich ist. Diese Verbindung enthält eine Carboxylgruppe, welche in deprotonierter Form an das Cyclopeptid binden kann. Gleichzeitig kann die Isothiocyanatgruppe zur Anbindung an eine Aminogruppe im Cyclopeptid unter Ausbildung eines Thioharnstoffs ausgenutzt werden.

Molecular Modelling Studien zeigten allerdings, dass eine Wechselwirkung der Carboxylatgruppe des Fluoresceins mit den NH-Gruppen des Cyclopeptidrings nur möglich ist, wenn sich ein Spacer geeigneter Länge zwischen Cyclopeptid und Farbstoff befindet. In Abbildung 34 ist die berechnete Struktur eines Cyclopeptidderivats gezeigt, in dem sich zwischen einem Fluorescein-Substituenten und einer Prolineinheit des Cyclopeptids ein Alaninbaustein befindet. Die Wechselwirkungen der Carboxylatgruppe des Farbstoffs mit den NH-Gruppen des Cyclopeptids ist eindeutig ersichtlich. Bei Bindung von Anionen an die NH-Gruppen des Cyclopeptidrings wird die Fluorescein-Carboxylatgruppe aus der Cyclopeptidbindungstasche verdrängt, wobei die Thioharnstoffgruppe die Substratbindung möglicherweise kooperativ durch Bildung von Wasserstoffbrücken zum gebundenen Anion unterstützen kann.¹⁴⁰ Zielverbindung war dementsprechend zunächst das substituierte Cyclopeptid **72**.

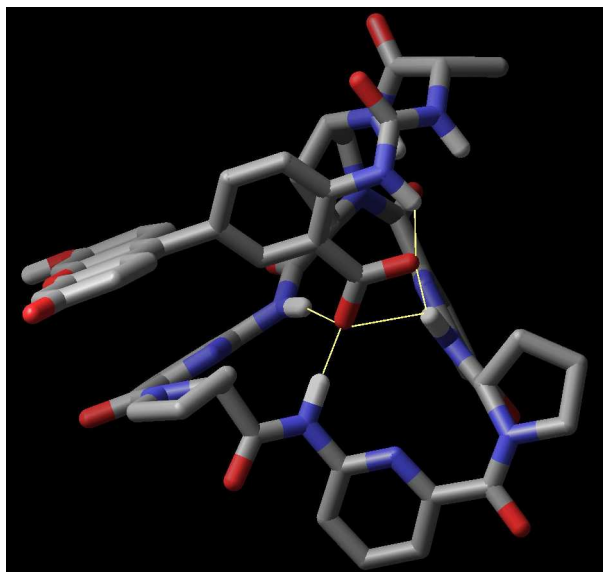
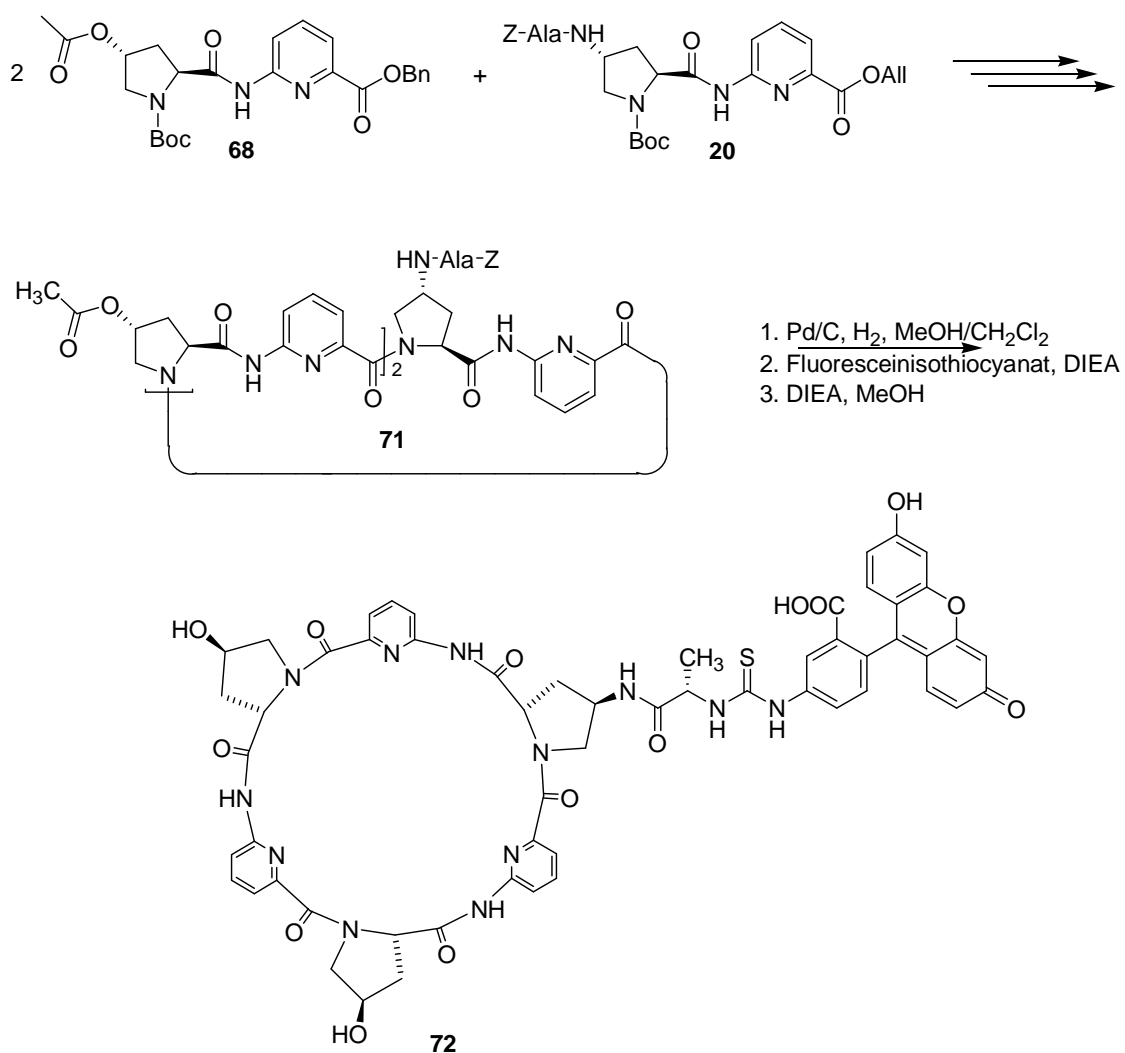


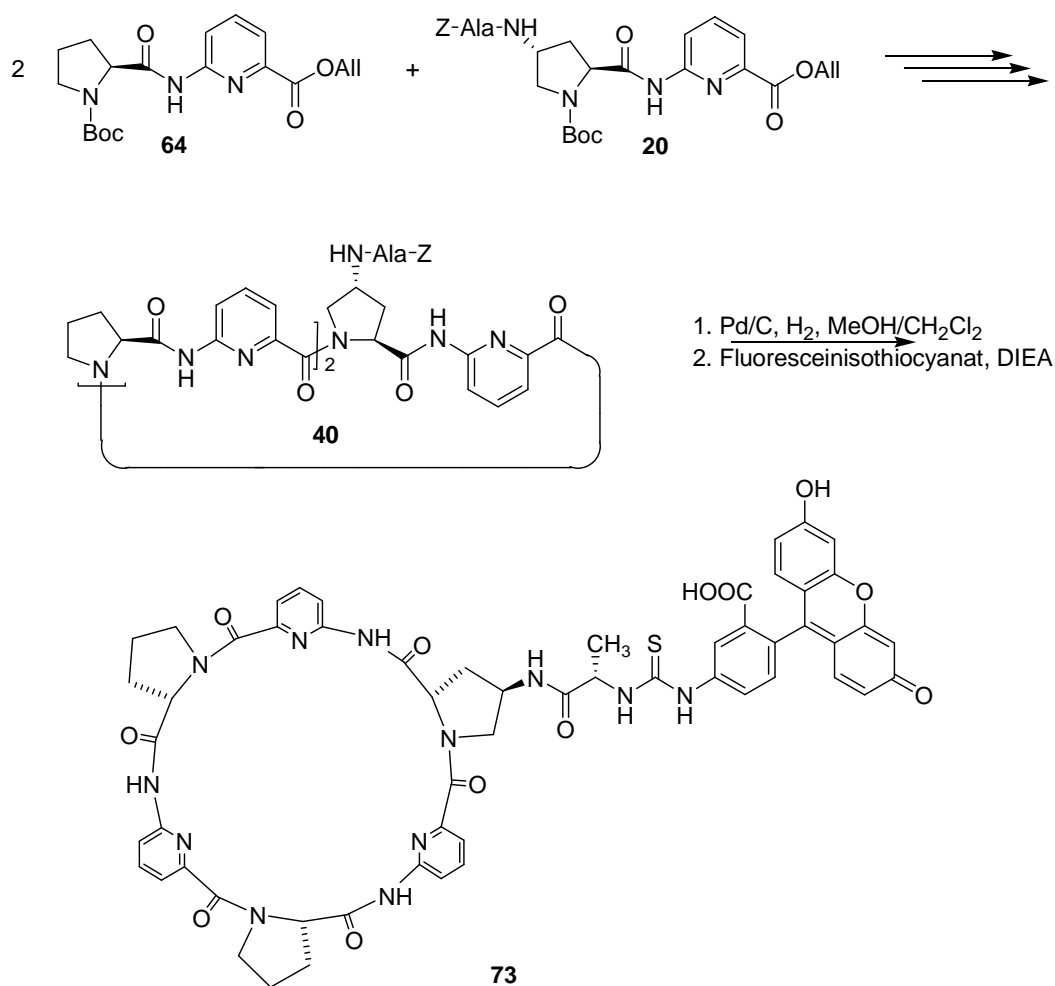
Abbildung 34. Intramolekulare Wechselwirkung in einem Cyclopeptid mit einem Fluoresceinsubstituenten (Macromodel 7.0, Konformationssuche: Kraftfeld Amber*, Methode MCMM, 3000 Schritte; Minimierung: Methode PRCG, 3000 Schritte, Lösungsmittel: Wasser).

Der Aufbau des zur Synthese des von **72** notwendigen Cyclopeptids **71** erfolgte analog zur Herstellung von **68**. Der einzige Unterschied bestand in der Verwendung des Z-Alaninhaltigen Dipeptids **20** als Baustein. Nach dem Z-Entschützen von **71** erfolgte die Umsetzung mit Fluoresceinisothiocyanat mit DIEA in DMF (Schema 19). In der entsprechenden Reaktionsmischung konnte das gewünschte Farbstoff-haltige Cyclopeptid zwar massenspektrometrisch nachgewiesen werden, eine Isolierung gelang aber nicht. Da das Massenspektrum der Mischung zudem schon Signale des Acetyl-entschützten Endprodukts **72** zeigte, wurde durch Zugabe von DIEA und Methanol zur Reaktionsmischung versucht, eine vollständige Entschützung und die Bildung eines einheitlichen Produkts zu erzielen. Auch unter diesen Bedingungen war eine chromatographische Isolation des Produkts aber nicht erfolgreich und auch der Versuch, die Einführung des Farbstoffs und Verseifung durch Anwesenheit von Methanol während der Kupplungsreaktion in einem Schritt durchzuführen, führte nicht zum gewünschten Erfolg.



Schema 19. Synthesestrategie zur Darstellung des Fluorescein-haltigen Cyclopeptids **72**.

Da die Schwierigkeiten bei der Synthese von **72** scheinbar auf die Anwesenheit der Hydroxyprolineinheiten zurückzuführen waren, wurde auch versucht ein analoges Cyclopeptid **73** mit Prolinuntereinheiten anstelle der Hydroxyprolineinheiten darzustellen. Die Synthese ausgehend von den Dipeptiduntereinheiten **20** und **64** ist in Schema 20 dargestellt.



Schema 20. Syntheschema zur Darstellung von Cyclopeptid **73**.

Nach dem Abspalten der Z-Schutzgruppe in Cyclopeptid **40** wurde das entstehende Amin erneut mit Fluoresceinisothiocyanat umgesetzt. Massenspektrometrisch konnte auch in diesem Fall das gewünschte Produkt nachgewiesen werden, eine Isolierung ist aber wiederum nicht gelungen. Im Dünnschichtchromatogramm der Reaktionsmischung zeigten sich bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 355 nm immer eine Reihe verschiedener fluoreszierender Verbindungen. Auch durch Isolation und Analyse der einzelnen Substanzen konnte jedoch nicht zugeordnet werden, bei welcher es sich um das Produkt handelte. Weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang wurden nicht durchgeführt.

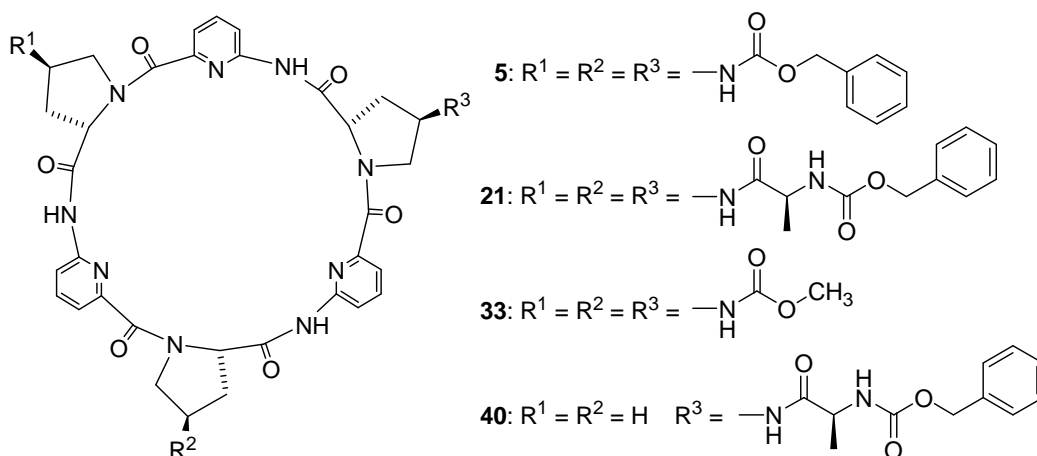
Trotz der synthetischen Schwierigkeiten stellen die Cyclopeptide **72** oder **73** aber aufgrund ihrer zu erwartenden interessanten Eigenschaften attraktive Zielverbindungen dar, weswegen ihre Synthese im Rahmen zukünftiger Arbeiten weiter verfolgt werden sollte.

C. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

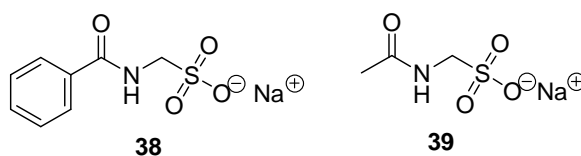
Ziel meiner Arbeit war es, neue Cyclopeptide auf Basis der in der Arbeitsgruppe um S. Kubik untersuchten Anionenrezeptoren zu entwickeln und hinsichtlich ihrer Rezeptor- und Sensoreigenschaften zu untersuchen. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Einfluss von Substituenten an den Prolinuntereinheiten auf die Bindungsaffinität und -selektivität.

Bei allen von mir synthetisierten Cyclopeptiden handelt es sich um Hexapeptide mit einer alternierenden Sequenz von 6-Aminopicolinsäure- und 4*R*-Amino-L-prolinuntereinheiten. Zur Darstellung dieser Verbindungen musste zunächst die Synthese eines geeignet geschützten 4*R*-Amino-L-prolinderivats aus 4*R*-Hydroxy-L-prolin erarbeitet werden. Nach systematischen Optimierungsarbeiten führte schließlich die doppelte Inversion am C(γ)-Atom des Edukts durch Mesylierung unter Mitsunobu-Bedingungen gefolgt von nucleophiler Substitution des entstehenden Mesylats mit Natriumazid und anschließender Reduktion zum Amin zum Erfolg.

Ausgehend von einem Dipeptid mit einer 6-Aminopicolinsäure- und einer an der primären Aminogruppe Z-geschützten 4*R*-Amino-L-prolinuntereinheit wurde das entsprechende cyclische Hexapeptid **5** nach Standardverfahren aufgebaut. Die weitere Derivatisierung des nach der hydrogenolytischen Z-Entschützung dieser Verbindung erhaltenen Triamins gelang allerdings nicht effizient, weswegen weitere substituierte Cyclopeptide auf einem sequentiellen Weg unter Verwendung von bereits funktionalisierten Dipeptiden hergestellt wurden. Im Rahmen dieser Dissertation wurden auf diese Weise folgende Cyclopeptide erstmalig synthetisiert und analysenrein erhalten:



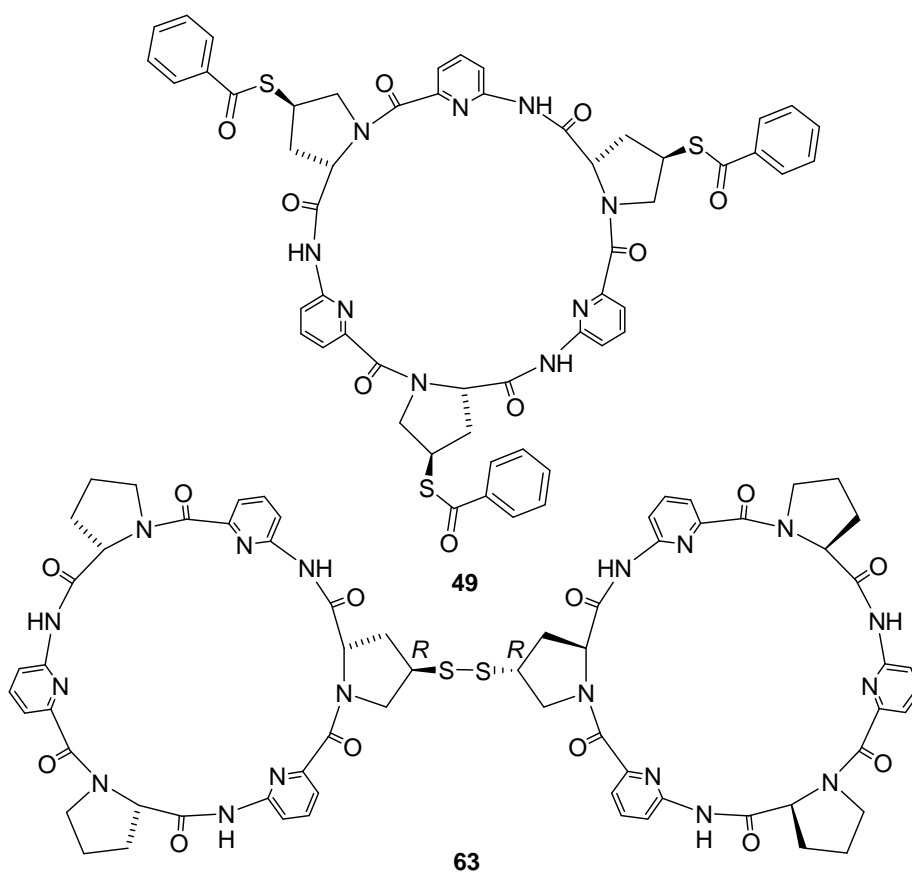
Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Bindungseigenschaften dieser Verbindungen in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Als Substrate wurden verschiedene Sulfonate und Acetat eingesetzt. In DMSO zeigte das unsubstituierte Cyclopeptid **1** mit $K_a = 9440 \text{ M}^{-1}$ eine unerwartet hohe Bindungsaffinität zum Sulfonat **38**. Die entsprechenden Komplexe der substituierten Cyclopeptiden **5** und **21** waren deutlich weniger stabil ($K_a = 2140$ bis 3200 M^{-1}). Untersuchungen mit der Referenzverbindung **39** zeigten, dass vermutlich Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Einheiten von Cyclopeptid **1** und Gast **38** für die Komplexstabilität verantwortlich sind. Diese Wechselwirkungen überwiegen scheinbar den Einfluss einer höheren Anzahl von Wasserstoffbrücken, wie sie in Komplexen von **5** oder **21** mit **38** möglich wären. Ein deutlicher Einfluss der Struktur der Substituenten auf die Bindungseigenschaften konnte in DMSO nicht nachgewiesen werden. Molecular Modelling Studien gaben Hinweise auf mögliche Komplexstrukturen.



Im Lösungsmittelgemisch 40 % Wasser/Methanol werden Sulfonat **38** und Tosylat vom substituierten Cyclopeptid **5** mit höherer Affinität ($K_a = 900 \text{ M}^{-1}$ bzw. 680 M^{-1}) gebunden als von **1** ($K_a = 290 \text{ M}^{-1}$ bzw. 150 M^{-1}). Mit **21** konnten aufgrund der Komplexität der NMR-Spektren in diesem Lösungsmittelgemisch keine NMR-Titrations durchgeführt werden. Untersuchungen zeigten, dass es sich bei der Ursache für die Signalaufspaltungen in den NMR-Spektren von **21** wahrscheinlich um ein langsames Konformerengleichgewicht handelt. Durch mikrokalorimetrische Messungen konnten auch für die Komplexe von **21** mit verschiedenen Gästen Stabilitätskonstanten erhalten und so ein Einfluss der Substituenten auf die Bindungsaffinität festgestellt werden. So lag mit dieser Methode die Bindungskonstante für den Komplex von **21** mit **38** mit $K_a = 720 \text{ M}^{-1}$ in der gleichen Größenordnung wie der Komplex von **5** mit **38** ($K_a = 900 \text{ M}^{-1}$). Die Komplexbildungen aller Cyclopeptid/Sulfonat-Komplexe sind enthalpisch bevorzugt. Im Falle von **21** war allerdings auch ein entropischer Vorteil bei der Sulfonatkomplexierung zu erkennen.

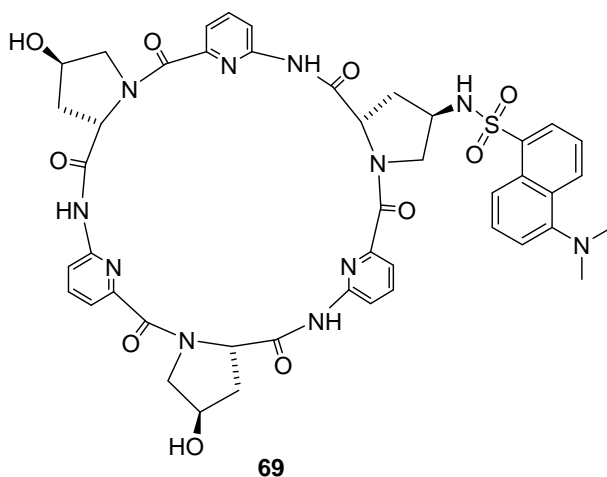
Bei der Komplexierung von Acetat in 5 % Wasser/DMSO wurden mit $K_a = 3890 \text{ M}^{-1}$ bzw. 4420 M^{-1} ähnliche Bindungskonstanten für die Komplexe der Cyclopeptide **1** und **5** gefunden. Die Bindungsaffinität von **21** zu Acetat liegt jedoch mit $K_a = 32030 \text{ M}^{-1}$ um eine Größenordnung höher. Molecular Modelling Studien zeigten, dass sich bei diesem Wirt die

Substituenten aufgrund ihrer Länge und Flexibilität um das Substrat herumlegen können und es so vollständig vom umgebenden Lösungsmittel abschirmen. Auch hier zeigt sich also ein deutlicher Effekt der Substituentenstruktur auf die Bindungseigenschaften der Cyclopeptide. Für zukünftige Untersuchungen stellt sich also die Frage, ob ein solcher Effekt auch in wässrigen Lösungsmittelsystemen erkennbar ist und wie lang die Substituenten sein müssen bzw. wie voluminös ein Substrat beschaffen sein darf, damit dieser Effekt auftritt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Struktur peripherer Substituenten um den Cyclopeptidhohlraum einen großen Einfluss auf Art der Wechselwirkung bei der Substratbindung hat, wie es anhand des Vergleichs der Komplexe der beiden Cyclopeptide **5** und **33** mit den Gästen **38** und **39**, die sich jeweils nur in ihrer aromatischen bzw. nichtaromatischen Schutzgruppe unterscheiden, und des Komplexes von **21** mit Acetat gezeigt werden konnte. Die Bindungseigenschaften der Cyclopeptide hängen zudem deutlich vom verwendeten Lösungsmittel ab.



Für den Einsatz der dynamischen kombinatorischen Chemie zur Optimierung der Bindungseigenschaften der Cyclopeptide wurde Verbindung **49** entwickelt, welche nach Entschützung die Nutzung des Disulfidaustauschs zur Generierung einer dynamischen

Rezeptorbibliothek erlaubt. Es gelang jedoch nicht, die Thiobenzoate vollständig zu hydrolysieren, so dass weitere Arbeiten zur Synthese des entsprechenden Trithiols notwendig sind. Allerdings wurde im Rahmen der Arbeit das Bis(cyclopeptid)disulfid **63** synthetisiert, das gegenwärtig von S. Otto an der University of Cambridge, U.K. in der dynamischen kombinatorischen Chemie zur Identifizierung neuer Anionenrezeptoren aus einfach verbrückten Bis(cyclopeptiden) eingesetzt wird.



Für die Entwicklung von Fluoreszenzsensoren auf der Basis der Cyclopeptide habe ich zunächst Cyclopeptid **69** synthetisiert. Systematische Untersuchungen zeigten jedoch, dass diese Verbindung weder direkt noch indirekt als Komplex mit Methylorange im Sinne eines *indicator displacement assays* die optische Detektion von Anionen erlaubt. Cyclopeptide mit einem Fluorescein-Substituenten, welcher über einen Alaninspacer an eine Prolinuntereinheit gebunden ist, sollten laut Molecular Modelling Studien günstigere Eigenschaften besitzen. Die Synthese dieser Verbindungen konnte allerdings nicht erfolgreich realisiert werden. Daher bedarf es in diesem Zusammenhang noch weiterer Arbeiten, um Cyclopeptide zu erhalten, die als optische Sensoren dienen können.

Trotz anfänglicher Schwierigkeiten bei den verschiedenen Synthesen ist es mir gelungen, geeignete Synthesestrategien zu entwickeln und viele neue, substituierte Cyclopeptide darzustellen. Die Untersuchungen zeigten eindeutig, dass die Substituenten entlang des Hohlraums der Cyclopeptide in wässrigen Lösungsmittelgemischen die Komplexbildung beeinflussen können und sie lieferten neue Erkenntnisse über die Rezeptoreigenschaften. Mit diesen Ergebnissen bietet sich eine geeignete Ausgangsposition für die Entwicklung weiterer Cyclopeptidderivate zur (selektiven) Erkennung komplexerer organischer Substrate z.B. von

Peptiden. Durch Wahl geeigneter Substituenten unter Berücksichtigung ihrer Flexibilität und strukturellen Komplexität sollte es möglich sein, die Rezeptoren optimal an die Substrate zuzuschneiden. Während meiner Arbeit habe ich also wichtige Grundlagen erarbeitet, auf die weitere Forschungsarbeiten in diesem Gebiet aufbauen können.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

1. ALLGEMEINES

1.1. APPARATIVES

¹ H-NMR-Spektroskopie	Bruker Avance DRX 500 (500 MHz)
	Bruker Avance DRX 200 (200 MHz)
	Varian VRX 300 (300 MHz)
	Bruker DPX 200 (200 MHz)
	Bruker DPX 400 (400 MHz)
	Bruker Avance 600 (600 MHz)
¹³ C-NMR-Spektroskopie	Bruker Avance DRX 500 (125 MHz)
	Bruker Avance 600 (151 MHz)
C,H,N-Analyse	Institut für Pharmazeutische Chemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Analytik-Abteilung des Fachbereichs Chemie Technische Universität Kaiserslautern
Dosierung	Hamilton, gasdichte Spritzen Infusors AG, Perfusor Precidor HT
Drehwertbestimmung	Perkin Elmer 241 MC Polarimeter
Dünnschichtchromatographie	Kieselgel 60 F ₂₅₄ auf Aluminiumträger (Merck)
	RP-8 F ₂₅₄ auf Glaträger (Merck)
Fluoreszenzspektrometer	JASCO FP-6200 Spektrofluorometer
HPLC	Dionex: P680 HPLC Pumpe, ASI-100 Autosampler, TCC-100 Säulenofen, UVD 170U UV/Vis Detektor, Acclaim®

	120 C18 5 μm 120 \AA 4.6x150 mm Säule; Chromeleon: Datensystem Version 6.7
IR	Bruker Vektor 22 FT-IR Perkin Elmer FT-IR Spectrometer, Spectrum 1000
Kristallstrukturen	Max-Planck-Institut für Kohlenforschung Mülheim an der Ruhr Bruker-AXS X ₈ Proteum Diffraktometer
Massenspektrometrie	Finnigen MAT 8200 (FAB) Bruker ultraflex TOF/TOF (MALDI/TOF) ESI: Universität Saarbrücken/Universität Cambridge
Mikrokalorimeter	MicroCal VP-TTC Mikrokalorimeter, MicroCal ThermoVac, MicroCal Origin 7.0
Molecular Modelling	MacroModel 9.0, Maestro 7.0 MacSpartan, Wavefunction Inc.
Säulenchromatographie	Kieselgelsäulen: Kieselgel 63-200 (60 \AA) von MP SiliTech Kieselgel 60 (230-400 Mesh ASTM) von Merck RP-Säulen: Lobar® Fertigsäule von Merck, Größe B (310-25) Lichroprep® RP-8 (40-63 μm)
Schmelzpunktbestimmung	Büchi B-510, Büchi Melting Point B-545 Wagner & Münz, Kupferblock

1.2. CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL

Acros	Natriumazid, 99 % Phosphoroxchlorid Tetrakis[triphenylphosphin]palladium(0) Triphenylphosphin, 99 % <i>p</i> -Toluolsulfonsäure p.A.
Aldrich	Aminomethansulfonsäure, 97 % Kaliumhexafluorophosphat, 98 % Methylsulfonsäure, wasserfrei Thiobenzoessäure, techn. 90 %
BASF	HCl konz. (38 %) 1,4-Dioxan Methanol
Berkel	Ethanol
Brenntag	Aceton Essigsäureethylester Methylenchlorid Toluol
Degussa-Hüls	Diethylether
Deutero	Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆
Eurisotop	Chloroform- <i>d</i> ₁ Deuteriumoxid Methanol- <i>d</i> ₄ Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆

Fluka	<p>6-Amino-2-picolin</p> <p><i>O</i>-(1H-Benzotriazol-1-yl)-<i>N,N,N',N'</i>-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU)</p> <p>Benzoylchlorid p.A.</p> <p>Benzylchlorformiat, > 95 %</p> <p>Celite® Filter Cel</p> <p>Di-<i>tert</i>-butyldicarbonat</p> <p>2,5-Dihydroxybenzoesäure</p> <p>5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonylchlorid, > 99 %</p> <p>Fluoresceinisothiocyanat Isomer I</p> <p>H-Hyp-OMe</p> <p>Kaliumhydrogensulfat p.A.</p> <p>Ligroin, 80-95 %</p> <p>Palladium auf Aktivkohle, 10 %</p> <p>Pyrrolidin p.A.</p>
J.T.Baker	<p>Hexan</p> <p>NaOH Plätzchen</p> <p>KOH Plätzchen</p> <p>Pentan</p> <p>Tetrahydrofuran</p>
Merck	<p>Acetonitril</p> <p>3-Brom-1-propen z.S.</p> <p>Chloroform-<i>d</i>₁</p> <p>Diisopropylazodicarboxylat z.S.</p> <p>Diisopropylethylamin z.S.</p> <p><i>N,N</i>-Dimethylformamid z.S.</p> <p>Essigsäureanhydrid p.A.</p> <p>Kaliumhydrogensulfat p.A.</p> <p>Kaliumpermanganat p.A.</p> <p>Natriumacetat p.A.</p> <p>Natriumcarbonat, wasserfrei</p> <p>Natriumchlorid p.A.</p>

	Natriumhydrogencarbonat, reinst
	Natriumiodid p.A.
	Natriumsulfat, wasserfrei p.A.
	Phosphorpentoxid (Sicapent mit Indicator)
	Salzsäure, Titrisol 1N
	Tetramethylsilan
	Triethylamin, 99 %
MP SiliTech	Kieselgel 63-200 (60 Å)
novabiochem	<i>O</i> -(1H-Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium- hexafluorophosphat (HBTU)
	Boc-Pro-OH
	H-Hyp-OH
Riedel-de-Haën	Morpholin
	Pyridin
	Trifluoressigsäure
VWR	Acetonitril, HPLC
	Chloroform
	Methylenchlorid
	Wasser, HPLC

Trockene Lösungsmittel wurden nach Standardmethoden hergestellt.

Für die Mitsunobu-Reaktion wurde Triethylamin über Calciumhydrid getrocknet und destilliert und Methansulfonsäure wurde frisch destilliert.

In den Peptidsynthesen wurden als Kupplungsreagenzien TBTU, HBTU und PyCloP verwendet. TBTU und HBTU sind kommerziell erhältlich. PyCloP wurde in zwei Stufen über Trispyrrolidinophosphinoxid nach den Methoden von Yvernault, Yvernault und Bollinger bzw. Coste, Frérot und Jovin synthetisiert.^{141,142}

Als Matrix für die MALDI/TOF-Massenspektrometrie wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet.

2. WIRT-GAST-EXPERIMENTE

2.1. NMR-EXPERIMENTE

a) Job-Plot⁶⁶⁻⁶⁸

Zur Bestimmung der Komplexstöchiometrien wurden Job-Plots aufgenommen. Dazu wurden jeweils zwei Stammlösungen angesetzt, je nach Cyclopeptid und Fragestellung in 40 % D₂O/Methanol-*d*₄, reinem DMSO-*d*₆ bzw. 5 % D₂O/DMSO-*d*₆. Die Konzentrationen betragen sowohl für die Wirt- als auch für die Gastlösung 1·10⁻³ mol·l⁻¹. Es wurden elf NMR-Proben (10 Proben wenn der Gast im ¹H-NMR keine Protonen zeigt) mit linear abnehmendem Molenbruch des Wirts von X = 1 bis 0 hergestellt, indem von der entsprechenden Stammlösung zwischen 1,0 und 0 ml in 0,1 ml Schritten in die NMR-Röhrchen gefüllt wurde. Mit der Gastlösung wurde anschließend jedes Röhrchen auf 1 ml aufgefüllt.

Für die Auswertung wurden die H(α)-Protonen des Rezeptors, im Falle von Benzoylaminomethansulfonat **38** als Gast die Signale der Methylengruppe bzw. im Falle von Acetat das der Methylgruppe herangezogen. Durch Auftragung von X·Δδ gegen den Molenbruch X der beobachteten Substanz in einem Graphen kann anhand des Maximums der Kurve auf die Komplexstöchiometrie geschlossen werden.

b) Wirt-Gast-Titrationen⁶⁹⁻⁷¹

Zur Bestimmung der Komplexstabilitätskonstanten wurden für jede Messung zwei Stammlösungen mit einem geeigneten Lösungsmittel angesetzt. Für die Messreihen in 40 % D₂O/Methanol-*d*₄ hatte die Rezeptorlösung eine Konzentration von 8,33·10⁻⁴ mol·l⁻¹ in deuteriertem Methanol, die Gastlösung wurde mit 3,75·10⁻² mol·l⁻¹ in deuteriertem Wasser angesetzt. Zunächst wurde in 11 NMR-Röhrchen jeweils 480 µl der Rezeptorstammlösung gegeben. Dann wurde in jedes Röhrchen steigende Volumina der Gastlösung gegeben, wobei die Zugabe in 20 µl Schritten von 0 bis 200 µl anstieg. Schließlich wurde jedes Röhrchen mit D₂O auf 800 µl aufgefüllt. Bei den Messungen in DMSO-*d*₆ wurden die Stammlösungen mit Konzentrationen von 1·10⁻³ mol·l⁻¹ für den Rezeptor und 5·10⁻³ mol·l⁻¹ für den Gast angesetzt. In die 11 NMR-Röhrchen wurde je 400 µl der Rezeptorlösung und zwischen 0 und 400 µl der Gastlösung in 40 µl Schritten ansteigend gefüllt. Dann wurden alle Proben mit DMSO-*d*₆ auf 800 µl aufgefüllt. Bei den Titrationen mit Acetat als Gast wurde die Rezeptorlösung mit einer

Konzentration von $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in $\text{DMSO-}d_6$ angesetzt, die Gastlösung hatte eine Konzentration von $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in 10 % $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-}d_6$. Das Befüllen der NMR Röhren erfolgte analog der Messungen in reinem $\text{DMSO-}d_6$, allerdings wurde beim Auffüllen der Röhren mit reinem Lösungsmittel 10 % $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-}d_6$ verwendet.

Die Titrations im Kapitel „Sensorentwicklung“ wurden in 50% $\text{D}_2\text{O}/\text{Methanol-}d_4$ durchgeführt. Die Stammlösungen wurden mit Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ für den Rezeptor in reinem $\text{Methanol-}d_4$ und $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ für den Gast in reinem D_2O angesetzt. In elf NMR-Röhren wurde je 400 μl der Rezeptorlösung und 0 bis 400 μl der Gastlösung in 40 μl Schritten ansteigend gefüllt. Alle Proben wurden dann mit D_2O auf 800 μl aufgefüllt.

Zur Auswertung wurden die Signale der $\text{H}(\alpha)$ -Protonen des Rezeptors verwendet. Durch Auftragen des Shifts der Signale $\Delta\delta$ gegen die Konzentration erhielt man Sättigungskurven, aus denen die Komplexstabilitätskonstanten unter Verwendung der $\Delta\delta_{\text{max}}$ -Werte mit Hilfe eines mathematischen Modells für einen 1:1 Komplex (nicht lineare Regression) mit dem Programm SigmaPlot2001, Version 7.0 ermittelt.

2.2. ISOTHERME TITRATIONSKALORIMETRIE

Für die mikrokolorimetrischen Messungen wurden die verwendeten Lösungsmittel Wasser und Methanol (HPLC grade) vor Verwendung sorgfältig entgast. Anschließend wurden Stammlösungen in 40 % Wasser/Methanol angesetzt, wobei die Konzentrationen $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ für die Rezeptorlösung bzw. $0,03 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ für die Gastlösungen betragen. Im Falle von Natriumsulfat besaß die Gastlösung aufgrund der niedrigeren Löslichkeit nur eine Konzentration von $0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Für eine Messung wurde die Zelle mit ca. 1,4 ml Rezeptorlösung befüllt. Für das Befüllen der Injektionsspritze wurden etwa 300 μl Gastlösung benötigt. Die Referenzzelle wurde mit reinem 40 % Wasser/Methanol befüllt. In der Regel wurden bei jeder Messung 40 Injektionen mit jeweils 5 μl (0,5 $\mu\text{l}/\text{sec}$) durchgeführt. Die Zeit zwischen den Injektionen war abhängig davon, wie schnell sich das thermodynamische Gleichgewicht wieder eingestellt hatte und lag zwischen 180 und 360 Sekunden, abhängig vom Gast.

Zur Auswertung wurde jeweils die Verdünnungswärme bei der Titration des Gasts in das reine Lösungsmittelgemisch berücksichtigt. Die ermittelten Werte wurden von der eigentlichen Messung subtrahiert. Die Auswertung erfolgte mit MicroCal Origin 7.0.

2.3. FLUORESZENZMESSUNGEN

Bei allen Messungen wurde als Anregungswellenlänge 350 nm verwendet. Die Emission wurde im Wellenlängenbereich von 300 bis 700 nm verfolgt. Die Bandbreite betrug 5 nm (Sensitivity high) bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 250 nm/min.

Das optimale Lösungsmittelgemisch wurde durch Messung des Emissionsspektrums von **69** bei verschiedenen H₂O/Methanol-Verhältnissen ermittelt. Dazu wurde eine $1 \cdot 10^{-4}$ molare Lösung des Cyclopeptids **69** in reinem Methanol hergestellt. Jeweils 0,5 ml dieser Lösung wurden mit verschiedenen Volumina Wasser und Methanol aufgefüllt, so dass acht Proben mit den Wasseranteilen von 10, 25, 50, 60, 70, 80, 90 und 95 % vermessen werden konnten. Es zeigte sich, dass bei einem Wasseranteil von bis zu 50 % die Intensität der Emissionsbande bei 466 nm zuverlässig bestimmt werden kann. Bei höherem Wasseranteil wird der Messfehler aufgrund der geringen Bandenintensität zu groß.

Für die Messungen zur Änderung der Fluoreszenzintensität bei Gastzugabe wurden drei Stammlösungen angesetzt. Die Rezeptorlösung besaß eine Konzentration von $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, und die zwei Gastlösungen einmal $1,25 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ und einmal $1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Es wurden neun Proben mit jeweils 0,5 ml Rezeptorlösung und der entsprechenden Gastlösung von 0 bis 1000 Äquivalenten (nicht linear) hergestellt. Die Proben wurden dann mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel auf 5 ml aufgefüllt und vermessen.

Die Messungen zur Fluoreszenzlöschung mit Methylorange **70** als Gast wurden analog durchgeführt. Die Konzentrationen der Methylorange-Stammlösungen betragen allerdings $3,125 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bzw. $1,25 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ und es wurden zehn Proben mit 0 bis 100 Äquivalenten (nicht linear) Gast hergestellt.

Die Komplexstabilitätskonstanten wurden unter Verwendung von I/I_0 mit Hilfe eines mathematischen Modells für einen 1:1 Komplex (nicht linearen Regression) mit dem Programm SigmaPlot2001, Version 7.0 ermittelt.

3. ALLGEMEINE ARBEITSWEISEN

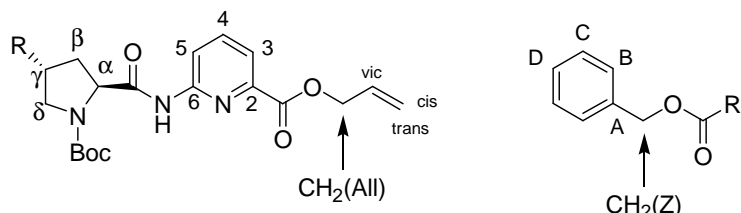
Abspalten der Boc-Schutzgruppe mit HCl in Dioxan. Zu 1 mmol Boc-geschütztem Peptid in 15 ml trockenem Dioxan wurden über einen Zeitraum von 1 h unter Eiskühlung 30 ml 6 N HCl in Dioxan getropft. Anschließend wurde noch 2 h (4 h bei Hexapeptiden) in der Kälte gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur unter 40°C entfernt. Der Rückstand wurde mit trockenem Diethylether angerieben, filtriert und im Exsikkator über P₄O₁₀ unter Vakuum getrocknet.

Entschützen des Allylesters. Ein Schlenkkolben mit Allyl-geschütztem Peptid wurde dreimal sekuriert, wobei auf das Ausheizen verzichtet wurde, um zu verhindern, dass die thermolabile Boc-Schutzgruppe abgespalten wurde. Im Stickstoffgegenstrom wurde zu 1 mmol Peptid, gelöst in 20 ml entgastem THF p.A., eine Spatelspitze des ebenfalls sekurierten Katalysators Tetrakis[triphenylphosphin]palladium(0) gegeben, gefolgt von 3 Äquivalenten Morpholin. Eine Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion erfolgte nach 5 Minuten mittels Dünnschichtchromatographie. Bei nicht vollständigem Umsatz wurde erneut eine Spatelspitze Katalysator hinzugegeben. Nach weiteren 30 Minuten wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester (im Falle der Hexapeptide wurde Methylenchlorid verwendet) aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit 3 %iger KHSO₄-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde erst am Rotationsverdampfer und anschließend im Ölpumpenvakuum entfernt.

Abspalten der Z-Schutzgruppe unter Wasserstoffatmosphäre. Zu 1 mmol Z-geschütztem Peptid in 40 ml Methylenchlorid/Methanol (1:1) wurden 50 mg Pd/C (10 %) gegeben. Um bei der Reaktion Nebenreaktionen der entstehenden freien Aminogruppe zu vermeiden, können bei Bedarf 1 Äquivalent 1 N Salzsäure pro Aminogruppe hinzugegeben werden. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck gerührt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat wurde im Vakuum eingengt. Nach dem Trocknen im Ölpumpenvakuum wurde der Rückstand ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt.

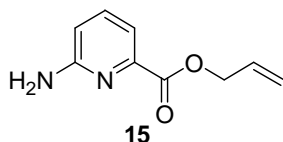
4. SYNTHESSEN

Die in den NMR-Spektren verwendeten Zuordnungen beziehen sich auf die Angaben in der folgenden Abbildung.



Dabei ist die Zuordnung bei der hier abgebildeten Z-Schutzgruppe stellvertretend für alle Aromaten. Weitere hier nicht gekennzeichnete Protonen und Kohlenstoffatome sind in der Spektreninterpretation eindeutig gekennzeichnet.

4.1. SYNTHESE VON 6-AMINOPICOLINSÄUREALLYLESTER



Darstellung von *N*-Acetyl-2-amino-6-picolin.¹⁴³ Zu 27,0 g (250 mmol) 2-Amino-6-picolin in 125 ml Chloroform wurden 35,0 ml (375 mmol) Essigsäureanhydrid gegeben. Die Lösung wurde für 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung vorsichtig zweimal mit 10 %iger Na₂CO₃-Lösung und dann dreimal mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde aus Petrolether (60/80)/ Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 30,90 g (82 % d. Th.)

Darstellung von *N*-Acetyl-6-aminopicolinsäure.¹⁴⁴ 20,0 g (130 mmol) *N*-Acetyl-2-amino-6-picolin wurden in 200 ml Wasser suspendiert und auf 75°C erhitzt. Bei etwa 50°C ging das Edukt in Lösung. Zur Lösung wurden portionsweise 50,0 g (310 mol) Kaliumpermanganat

über 60 Minuten hinzugefügt, wobei 80°C nicht überschritten werden sollten. Anschließend wurde die Lösung noch 3 h bei 75°C gerührt und dann heiß über Celite abfiltriert. Unter Eiskühlung wurde das Filtrat mit konz. HCl auf pH 4-5 eingestellt, wobei das Produkt weiß ausfiel. Nach Absaugen des Produktes wurde dieses ohne weiteres Trocknen sofort weiterverwendet.

Darstellung von 6-Aminopicolinsäure.¹⁴⁵ Die gesamte noch feuchte *N*-Acetyl-6-aminopicolinsäure wurde in 150 ml 10 %iger NaOH gelöst und 4 h unter Rückfluss erhitzt. Unter Eiskühlung wurde mit konz. HCl der pH-Wert auf 4-5 gebracht. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert, mit wenig Eiswasser, zweimal mit Aceton und einmal mit Diethylether gewaschen und anschließend im Exsikkator über P₄O₁₀ im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 9,50 g (53 % d. Th.)

Darstellung von 6-Aminopicolinsäureallylester 15.⁵⁵ Zu 6,9 g (50 mmol) 6-Aminopicolinsäure und 8,4 g (100 mmol) NaHCO₃ wurden nach Suspendierung in 300 ml DMF p.A. 13,1 ml (150 mmol) 3-Brom-1-propen gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum einkondensiert. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen, dreimal mit 10 %iger Na₂CO₃-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Hexan/Essigsäureethylester (1:1) gereinigt. Nach Zugabe eines Impfkristalls des Produkts kristallisierte die hellgelbe Substanz aus.

Ausbeute 4,90 g (55 % d. Th.)

Smp. 72-73°C

Massenspektrum EI (m/z, rel. Int.): 177,8 (21,1 %) [M⁺]

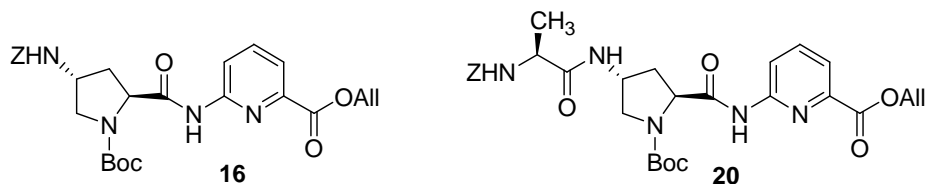
¹H-NMR [500 MHz, CDCl₃, 25°C] δ 4,78 (s, 2H, -NH₂), 4,89 (d, ³J = 5,7 Hz, 2H, CH₂(All)), 5,31 (dd, ²J = 1,3 Hz, ³J_{cis} = 10,4 Hz, 1H, H(cis)), 5,43 (dd, ²J

= 1,3 Hz, $^3J_{\text{trans}} = 17,2$ Hz, 1H, H(trans)), 6,07 (m, 1H, H(vic)), 6,69 (dd, $^3J = 8,2$ Hz, $^4J = 0,9$ Hz, 1H, H(3)), 7,51 (dd, $^3J = 7,3$ Hz, $^4J = 0,9$ Hz, 1H, H(5)), 7,56 (t, $^3J = 8,2$ Hz, $^3J = 7,3$ Hz, 1H, H(4))

IR (Film) cm^{-1} 3462 (m), 3316 (m), 3200 (m), 3087 (w), 2945 (w), 1728 (s), 1627 (s), 1564 (w), 1427 (s), 1370 (m), 1261 (s), 1186 (m), 1149 (m), 1099 (m), 1062 (w), 988 (m), 823 (w), 766 (m)

C, H, N	ber	C: 60,66 %	H: 5,66 %	N: 15,72 %	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$
	gef	C: 60,60 %	H: 5,72 %	N: 15,47 %	$F_w: 178,19$

4.2. SYNTHESE DER DIPEPTIDE BOC-[(Z-APRO)-APA]-OALL UND BOC-[(Z-ALA-APRO)-APA]-OALL



a) Syntheseroute analog Schema 1⁵⁵

Darstellung von (4R)-N-Boc-4-Hydroxy-L-prolin 7.¹⁴⁶ Eine Suspension von 6,55 g (50 mmol) H-Hyp-OH **6** in 50 ml Wasser und 100 ml Dioxan wurde unter Eiskühlung mit 7,0 ml (50 mmol) Triethylamin auf einen pH-Wert von 9-10 eingestellt. Anschließend wurden unter Eiskühlung über einen Zeitraum von 1 h 12,0 g (55 mmol) Boc₂O in 100 ml Dioxan zur Suspension getropft, die danach noch 4 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Verbliebene Kristalle wurden abgesaugt. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis auf 50 ml eingengt. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit Diethylether gewaschen. Die organische Phase wurde verworfen. Die wässrige Phase wurde mit etwa 7 g in wenig Wasser gelöstem KHSO₄ angesäuert und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mit einem Impfkristall des Produkts zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 9,88 g (85,5 % d. Th.)

¹H-NMR [300 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] δ [ppm] 1,37 (s, 9H, tBu), 1,93 (m, 1H, H(β)), 2,11 (m, 1H, H(β)), 3,17 (s, b, H₂O, -COOH, -OH), 3,25 (d, ²J = 12,3 Hz, 1H, H(δ)), 3,40 (dd, ²J = 11,1 Hz, ³J = 4,6 Hz, 1H, H(δ)), 4,16 (t, ³J = 7,51 Hz, 1H, H(α)), 4,26 (m, 1H, H(γ))

Darstellung von *N*-Boc-5-Aza-2-oxa-3-oxo-bicyclo[2.2.1]heptan 8.¹⁴⁷ Zu einer Lösung von 2,31 g (10 mmol) (4*R*)-1-Boc-4-Hydroxy-*L*-prolin **7** und 3,63 g (15 mmol) Triphenylphosphin in 40 ml trockenem THF wurden unter Eiskühlung 2,94 ml (15 mmol) DiPrAD gegeben. Nach 30 Minuten Rühren in der Kälte war die Reaktion beendet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde sofort säulenchromatographisch mit Hexan/Essigsäureethylester (1:1) gereinigt, enthielt aber auch danach geringe Mengen aus DiPrAD gebildetes Diisopropyldicarbamat.

Ausbeute: 1,69 g

¹H-NMR [300 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] δ [ppm] 1,41 (s, 9H, tBu), 2,17 (d, ²J = 12,8 Hz, 1H, H(β)), 2,17 (d, ²J = 11,0 Hz, 1H, H(β)), 3,23 (d, ²J = 11,7 Hz, 1H, H(δ)), 3,50 (dd, ²J = 10,9 Hz, ³J = 1,3 Hz, 1H, H(δ)) 4,42 (m, 1H, H(α)), 5,17 (m, 1H, H(γ))

Darstellung von (4*S*)-*N*-Boc-4-Hydroxy-*L*-prolinmethylester 9.¹⁴⁸ 3,78 g (17,7 mmol) verunreinigtes *N*-Boc-5-aza-2-oxa-3-oxo-bicyclo[2.2.1]heptan **8** und 4,27 g (65,7 mmol) Natriumazid wurden in 370 ml trockenem Methanol gelöst. Die Lösung wurde für 4 h bei 40°C gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde sofort säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (2:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man das Produkt als weißen Feststoff.

Ausbeute: 2,69 g (55 % d. Th., nach 2 Stufen)

¹H-NMR [300MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] δ [ppm] 1,36 (s, 9H, tBu), 1,83 (m, 1H, H(β)), 2,35 (m, 1H, H(β)), 3,12 (dd, ²J = 11,0 Hz, ³J = 4,4 Hz, 1H, H(δ)) 3,56 (dd, ²J = 11,0 Hz, ³J = 5,7 Hz, 1H, H(δ)), 3,63 (s, 3H, -CH₃) 4,23 (m, 2H, H(α) + H(γ)), 4,65 (d, ²J = 3,9 Hz, 1H, -OH)

Darstellung von (4S)-N-Boc-4-[(p-Toluolsulfonyl)oxy]-L-prolinmethylester 10.⁶⁰ Zu einer Lösung aus 2,69 g (11,1 mmol) (4S)-N-Boc-4-Hydroxy-L-prolinmethylester **9** in 15 ml trockenem Methylenchlorid wurden nacheinander 10,47 g (54,9 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und 10,7 ml (131,8 mmol) Pyridin gegeben. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und dann am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen, dreimal mit 10 %iger Na₂CO₃-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und erneut eingengt. Auf einer Kieselgelsäule wurde der Rückstand mit Hexan/Essigsäureethylester (2:1; 1:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man das Produkt als weißen Feststoff.

Ausbeute: 3,84 g (88 % d. Th.)

¹H-NMR [500 MHz, CDCl₃, 25°C] δ [ppm] 1,42 + 1,46 (2 s, 9H, tBu), 2,47 (s, 3H, -CH₃), 3,63 (m, 2H, H(β)), 3,70 + 3,71 (2 s, 3H, -OCH₃), 4,34 + 4,45 (2 m, 1H, H(α)), 5,07 (m, 1H, H(γ)) 7,37 (t, ³J = 7,6 Hz, 2H, ArH(C)), 7,79 (dd, ³J = 7,9 Hz, ⁴J = 4,4 Hz, 2H, ArH(B))

Darstellung von (4R)-N-Boc-4-Azido-L-prolinmethylester 11.⁶⁰ Zu einer Lösung aus 3,94 g (9,6 mmol) (4S)-N-Boc-4-[(p-Toluolsulfonyl)oxy]-L-prolinmethylester **10** in 200 ml DMF p.A. wurden 3,13 g (48,1 mmol) Natriumazid gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei 80°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Hexan/Essigsäureethylester (1:1) gereinigt. Nach einigen Tagen kristallisierte das Produkt aus.

Ausbeute: 2,17 g (84 % d. Th.)

¹H-NMR [300MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] δ [ppm] 1,37 (s, 9H, tBu), 2,16 (m, 1H, H(β)), 2,32 (m, 1H, H(β)), 3,42 (ddd, ³J = 11,6 Hz, ⁴J = 3,1 Hz, ⁴J = 1,3 Hz, 1H, H(δ)), 3,56 (dd, ³J = 11,5 Hz, ⁴J = 5,3 Hz, 1H, H(δ)), 3,66 (s, 3H, -CH₃), 4,28 (m, 2H, H(α) + H(γ))

Darstellung von (4R)-N-Boc-4-Amino-L-prolinmethylester 12. Zu 1,80 g (6,7 mmol) (4R)-N-Boc-4-Azido-L-prolinmethylester **11** in 170 ml Methanol wurden 300 mg 10 % Pd/C gegeben. Die Lösung wurde 7 h bei Normaldruck unter H₂-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde erneut im Vakuum entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der erhaltene Feststoff wurde ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt.

Darstellung von (4R)-N-Boc-4-(Z-Amino)-L-prolinmethylester 13. Der nach der Hydrierung als Rohprodukt erhaltene (4R)-N-Boc-4-Amino-L-prolinmethylester **12** (6,7 mmol) wurde in 130 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und mit 1,8 ml (10,1 mmol) DIEA versetzt. Unter Eiskühlung erfolgte Zugabe von 5,0 ml (13,4 mmol) ZCl (45 % in Toluol). Nach weiteren 10 Minuten wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Hexan/Essigsäureethylester (2:1;1:2) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man das klare, ölige Produkt.

Ausbeute: 1,73 g (68 % d. Th.)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ - 20,9 (c = 2) Methanol

Massenspektrum FAB (m/z, rel. Int.): 379,3 (3,2 %) [M+H]⁺, 401,2 (8,3 %) [M+Na]⁺

¹H-NMR [300 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] δ [ppm] 1,35 (s, 9H, tBu), 2,14 (m, 2H, H(β)), 3,22 (dd, ²J = 10,7 Hz, ³J = 5,0 Hz, 1H, H(δ)) 3,56 (m, 1H, H(δ)), 3,65 (s, 3H, -CH₃), 4,09 (m, 1H, H(γ)), 4,30 (m, 1H, H(α)), 5,03 (s, 2H, CH₂(Z)), 7,33 (m, 5H, -Ph)

IR (Film) cm⁻¹ 3326 (m), 2978 (m), 1699 (s), 1533 (m), 1456 (m), 1403 (s), 1368 (m), 1258 (m), 1209 (s), 1160 (s), 1130 (m), 1083 (w), 1027 (w), 985 (w), 895(w), 858 (w), 756 (m)

C, H, N	ber	C: 60,30 %	H: 6,93 %	N: 7,40 %	$C_{19}H_{26}N_2O_6$
	gef	C: 60,26 %	H: 6,85 %	N: 7,11 %	$F_w: 378,43$

Darstellung von (4R)-N-Boc-4-Z-Amino-L-prolin 14. Unter Eiskühlung wurden zu 1,7 g (4,5 mmol) (4R)-N-Boc-4-Amino-L-prolinmethylester **13** gelöst in 70 ml Methanol 11,2 ml (11,2 mmol) 1N NaOH gegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Unter Eiskühlung wurde die Lösung mit 1N HCl neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und das Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und das entstandene Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter eingesetzt. Entstandenes NaCl störte bei der folgenden Umsetzung nicht.

Darstellung des Dipeptids Boc-[(Z-Apro)-Apa]-OAll 16. Das nach Verseifen als Rohprodukt erhaltene (4R)-N-Boc-4-Z-Amino-L-prolin **14** (4,5 mmol), 0,73 g (4,1 mmol) 6-Aminopicolinsäureallylester **15** und 2,59 g (6,1 mmol) PyCloP wurden in 85 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Dazu wurden 2,13 ml (12,3 mmol) DIEA getropft. Die Lösung wurde 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Hexan/Essigsäureethylester (1:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloses Harz erhalten.

Ausbeute: 1,82 g (85 % d. Th.)

Smp. 153 – 155 °C

$[\alpha]_D^{25}$ - 5,5 (c = 2) DMF

Massenspektrum FAB (m/z, rel. Int.): 524,6 (5,3 %) $[M+H]^+$, 547,6 (12,6 %) $[M+Na]^+$

1H -NMR [300 MHz, -DMSO- d_6 , 100°C] δ [ppm] 1,33 (s, 9H, tBu), 2,16 (m, 2H, H(β)), 3,23 (dd, $^2J = 10,6$ Hz, $^3J = 5,9$ Hz, 1H, H(δ)), 3,68 (dd, $^2J = 10,6$ Hz, $^3J = 7,0$ Hz, 1H, H(δ)), 4,18 (m, 1H, H(γ)), 4,57 (dd, $^3J_{trans} = 8,2$ Hz, $^3J_{cis} = 4,6$ Hz, 1H, H(α)), 4,82 (d, $^3J = 5,5$ Hz, 2H, $CH_2(All)$),

5,04 (s, 2H, CH₂(Z)), 5,28 (d, ³J_{cis} = 10,4 Hz, 1H, H(cis)), 5,40 (d, ³J_{trans} = 17,4 Hz, 1H, H(trans)), 6,02 (m, 1H, H(vic)), 7,19 (d, J = 6,0 Hz, 1H, NH(Z)), 7,33 (m, 5H, -Ph), 7,75 (d, ³J = 7,5 Hz, 1H, H(3)), 7,94 (t, ³J = 8,0 Hz, 1H, H(4)), 8,25 (d, ³J = 8,4 Hz, 1H, H(5)), 10,49 (s, 1H, -NH-)

IR (KBr) cm⁻¹ 3316 (m), 2977 (w), 1699 (s), 1579 (m), 1534 (m), 1456 (m), 1403 (m), 1305 (m), 1248 (m), 1164 (m), 1082 (w), 989 (w), 769 (m), 698 (w)

C, H, N	ber	C: 61,82 %	H: 6,15 %	N: 10,68 %	C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₇
	gef	C: 61,78 %	H: 6,15 %	N: 10,48 %	F _w : 524,57

b) Synthese des Dipeptids 20 analog Schema 4

Darstellung von (4R)-N-Boc-4-(Z-alanyl-)amino-L-prolinmethylester 19. Zu 3,34 g (12,4 mmol) (4R)-N-Boc-4-Azido-L-prolinmethylester **11** in 300 ml Methanol wurden 500 mg 10 % Pd/C gegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei Normaldruck unter H₂-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde erneut im Vakuum entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Substanz wurde ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt. Der gesamte getrocknete Rückstand der Hydrierung (12,4 mmol), 3,32 g (14,9 mmol) Z-Ala-OH und 7,84 g (18,6 mmol) PyCloP wurden in 150 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und mit 6,5 ml (37,2 mmol) DIEA versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Hexan/Essigsäureethylester (3:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als farbloses Harz erhalten werden.

Ausbeute: 3,74 g (67 % d. Th. über 2 Stufen)

Smp. Schmelzbereich 48-58°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 449,2 [M+H]⁺, 472,6 [M+Na]⁺, 488,3 [M+K]⁺

¹H-NMR [300 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] δ [ppm] 1,21 (d, ³J = 7,0 Hz, 3H, AlaCH₃), 1,37 (s, 9H, tBu), 2,09 (m, 2H, H(β)), 3,19 (dd, ²J = 10,9 Hz, ³J = 5,0 Hz, 1H, H(δ)), 3,57 (dd, ²J = 10,7 Hz, ³J = 6,6 Hz, 1H, H(δ)), 3,66 (s, 3H, -OCH₃), 4,02 (m, 1H, AproH(γ)), 4,27 (m, 2H, AlaH(α) + AproH(α)), 5,02 (s, 2H, CH₂(Z)), 6,09 (s, b, 1H, AlaNH), 7,33 (m, 5H, ZPh), 7,84 (s, b, 1H, AproNH)

IR [KBr] cm⁻¹ 3320 (m), 2980 (m), 1705 (s), 1537 (s), 1455 (m), 1401 (s), 1248 (s), 1207 (s), 1158 (s), 1126 (m), 1067 (m), 1026 (m), 894 (w), 856 (w), 773 (w), 740 (w), 698 (m)

C, H, N	ber	C: 58,78 %	H: 6,95 %	N: 9,35 %	$C_{22}H_{31}N_3O_7$
	gef	C: 58,90 %	H: 6,83 %	N: 9,31 %	$M_w: 449,50$

Umsetzung von 19 zum Dipeptid Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apa]-OAll 20. Zu 1,47 g (3,3 mmol) (4*R*)-*N*-Boc-4-(*Z*-alanyl-)amino-*L*-prolinmethylester **19** in 50 ml Methanol wurden unter Eiskühlung 8,2 ml 1 N Natronlauge gegeben. Die Reaktionslösung wurde anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Unter Eiskühlung wurde die Lösung mit 1 N Salzsäure neutralisiert. Das Methanol wurde im Vakuum enternt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Der Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet. Ohne weitere Aufreinigung wurde der Rückstand zusammen mit 0,49 g (2,75 mmol) 6-Aminopicolinsäureallylester **15** und 1,74 g (4,13 mmol) PyCloP in 30 ml Methylenchlorid gelöst. Nach Zugabe von 1,43 ml (8,25 mmol) DIEA wurde die Reaktionsmischung 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (3:1) gereinigt. Das Produkt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels als farbloses Harz erhalten.

Ausbeute: 0,43 g (22 % d. Th. über 2 Stufen)

Smp. Erweichen ab 64°C, flüssig bei 130°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 595,9 $[M+H]^+$, 617,9 $[M+Na]^+$, 633,9 $[M+K]^+$

1H -NMR [600 MHz, DMSO- d_6 , 100 °C] δ [ppm] 1,24 (d, $^3J = 5,4$ Hz, 3H, AlaCH₃), 1,36 (s, 9H, tBu), 2,16 (m, 2H, AproH(β)), 3,22 (m, AproH(δ)), 3,69 (m, 1H, AproH(δ)), 4,06 (m, 1H, AproH(γ)), 4,33 (m, 1H, AlaH(α)), 4,59 (m, 1H, ProH(α)), 4,84 (s, 2H, CH₂(All)), 5,05 (s, 2H, CH₂(Z)), 5,29 (d, $^3J_{cis} = 10,0$ Hz, 1H, H(cis)), 5,41 (d, $^3J_{trans} = 16,1$ Hz, 1H, H(trans)), 6,04 (m, 1H, H(vic)), 6,76 (m, 1H, AproNH), 7,29 + 7,34 (2 s, 5H, ZPh), 7,71 (s, 1H, AlaNH), 7,76 (d, $^3J = 5,4$ Hz, 1H, ApaH(3)), 7,95 (t, $^3J = 7,8$ Hz 1H, ApaH(4)), 8,26 (d, $^3J = 7,9$ Hz, 1H, ApaH(5)), 10,45 (s, 1H, -NH-)

IR [KBr] cm^{-1} 3316 (m), 2976 (m), 1718 (s), 1578 (s), 1542 (s), 1458 (s),
1400 (s), 1304 (s) 1260 (s), 1163 (s), 800 (m), 769 (m), 697 (m)

C, H, N ber C: 57,46 % H: 6,87 % N: 10,15 %
gef C: 57,21 % H: 6,70 % N: 10,11 % M_w : 689,76
 $\text{C}_{30}\text{H}_{73}\text{N}_5\text{O}_8 \cdot \text{C}_3\text{H}_6\text{O} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

c) Syntheseroute analog Schema 5

Darstellung von (4S)-N-Boc-4-[(p-Toluolsulfonyl)oxy]-L-prolin 22. Zu 4,89 g (12,5 mmol) (4S)-N-Boc-4-[(p-Toluolsulfonyl)oxy]-L-prolinmethylester **10** in 190 ml Methanol wurden unter Eiskühlung 31,3 ml 1 N Natronlauge getropft. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 1N Salzsäure neutralisiert. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, eingengt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Produkt wurde ohne zusätzliche Reinigung weiter eingesetzt.

Darstellung von Boc-[(Ts-Hyp-)Apa]-OAll 23. Das nach der Verseifung als Rohprodukt erhaltene (4S)-N-Boc-4-[(p-Toluolsulfonyl)oxy]-L-prolin (12,5 mmol) wurde zusammen mit 1,71 g (9,6 mmol) 6-Aminopicolinsäureallylester **15** und 6,07 g (14,4 mmol) PyCloP in 110 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Nach Zugabe von 5,0 ml (28,8 mmol) DIEA wurde die Lösung für 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittel bei Raumtemperatur wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (1:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt als farbloses Harz erhalten.

Ausbeute: 4,35 g (64 % d. Th. über 2 Stufen)

Smp. Erweichen ab 42°C, flüssig bei 97°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 546,0 [M+H]⁺, 568,0 [M+Na]⁺, 584,9 [M+K]⁺

¹H-NMR [500 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 1,42 (s, b, 9 H, tBu), 2,35 (s, 3H, -CH₃), 2,62 (m, 1H, H(β)), 2,62 + 2,65 (s, 1H, H(β)), 3,69 (s, b, 2H, H(δ)), 4,42 + 4,51 (s, b, 1H, H(α)), 4,86 + 4,88 (s, b, 2H, CH₂(All)), 5,19 (s, b, 1H, H(γ)), 5,31 (dd, ²J = 1,3 Hz, ³J_{cis} = 10,7 Hz, 1H, H(cis)), 5,44 (dd, ²J = 1,3 Hz, ³J_{cis} = 17,0 Hz, 1H, H(trans)), 6,04 (m, 1H, H(vic)), 7,16 (d, ³J = 7,6 Hz, 2H, H(C)), 7,67 (d, ³J = 8,2 Hz, 2H, H(B)), 7,85, (m, 2H, H(3)+H(4)), 8,37 (d, 1H, H(5)), 8,63 + 8,79 (s, 1H, -NH-)

IR [KBr] cm^{-1} 3399 (w), 3286 (w), 2979 (w), 1702 (s), 1578 (m), 1528 (m), 1458 (s), 1367 (s), 1400 (s), 1302 (s), 1247 (m), 1176 (s), 1097 (m), 900 (m), 768 (m)

C, H, N	ber	C: 57,24 %	H: 5,73 %	N: 7,70 %	$\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$
	gef	C: 56,97 %	H: 5,78 %	N: 7,55 %	M_w : 545,61

Darstellung von Boc-[(Azido-Pro)-Apa]-OAll 24. 4,14 g (7,6 mmol) Boc-[(Ts-Hyp)-Apa]-OAll **23** und 2,47 g (38,0 mmol) Natriumazid wurden in 170 ml DMF p.A. gelöst. Die Lösung wurde für 4 Stunden bei 80°C gerührt. Nach dem Abkondensieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (1:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels kristallisierte das Produkt aus.

Ausbeute: 2,17 g (69 % d. Th.)

Smp. 101-108°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 416,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 438,9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 454,9 $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ [600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 100 °C] δ [ppm] 1,37 (s, 9H, tBu), 2,25 (m, 1H, ProH(β)), 2,40 (m, 1H, ProH(β)), 3,51 (m, 1H, ProH(δ)), 3,66 (m, 1H, ProH(δ)), 4,34 (m, 1H, ProH(γ)), 4,63 (m, 1H, ProH(α)), 4,86 (d, $^3J = 4,1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{All})$), 5,31 (d, $^3J_{\text{cis}} = 9,7$ Hz, 1H, H(cis)), 5,44 (d, $^3J_{\text{trans}} = 17,3$ Hz, 1H, H(trans)), 6,06 (m, 1H, H(vic)), 7,78 (d, $^3J = 7,3$ Hz, 1H, ApaH(3)), 7,98 (t, $^3J = 7,9$ Hz, 1H, ApaH(4)), 8,27 (d, $^3J = 8,2$ Hz, 1H, ApaH(5)), 10,53 (s, 1H, -NH-)

IR [KBr] cm^{-1} 3198 (m), 3119 (m), 3052 (m), 2974 (m), 2885 (w), 2108 (s), 1718 (s), 1673 (s), 1579 (s), 1543 (s), 1457 (s), 1424 (s), 1380 (s), 1368 (s), 1316 (s), 1271 (s), 1257 (s), 1197 (s), 1145 (s), 1079 (m), 1027 (w), 988 (m), 918 (m), 896 (m), 858 (w), 830 (w), 775 (s), 740 (w)

C, H, N	ber	C: 54,80 %	H: 5,81 %	N: 20,18 %	$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_5$
	gef	C: 55,01 %	H: 6,00 %	N: 19,88 %	M_w : 416,44

Darstellung von Boc-[Apro-Apa]-OAll 25.⁶⁰ 1,86 g (4,5 mmol) Boc-[(Azido-Pro)-Apa]-OAll **24** wurden zusammen mit 2,62 g (10,0 mmol) Triphenylphosphin in 30 ml THF gelöst. Nach Zugabe von 180 μ l (10,0 mmol) destilliertem Wasser wurde die Lösung für 6 Stunden refluxiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Methylchlorid/Methanol (10:1) gereinigt. Das Produkt konnte auch nach mehrfacher chromatographischer Aufreinigung nicht analysenrein erhalten werden.

Ausbeute: 1,00 g (57 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 391,0 [M+H]⁺, 413,0 [M+Na]⁺, 429,0 [M+K]⁺

¹H-NMR [600 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] δ [ppm] 1,35 (s, 9H, tBu), 2,02 (m, 2H, ProH(β)), 2,83 (1H, ProH(δ) + H₂O), 3,06 (m, 1H, ProH(δ)), 3,56 (m, 1H, ProH(γ)), 4,57 (dd, ³J = 5,6 Hz, ³J = 8,1 Hz, 1H, ProH(α)), 4,84 (dt, ³J = 5,5 Hz, ⁴J_{cis} = 1,2 Hz, ⁴J_{trans} = 1,2 Hz, 2H, CH₂(All)), 5,29 (d, ³J_{cis} = 10,4 Hz, 1H, H(cis)), 5,41 (d, ³J_{trans} = 17,3 Hz, 1H, H(trans)), 6,06 (m, 1H, H(vic)), 7,75 (d, ³J = 7,4 Hz, 1H, ApaH(3)), 8,26 (t, ³J = 7,9 Hz 1H, ApaH(4)), 8,27 (d, ³J = 8,3 Hz, 1H, ApaH(5)), 10,37 (s, 1H, -NH-)

Darstellung von Boc-[(Z-Apro)-Apa]-OAll 16. In 50 ml trockenem Methylchlorid wurden 0,93 g (2,4 mmol) Boc-[Apro-Apa]-OAll **25** gelöst. Nach Zugabe von 0,62 ml (3,8 mmol) DIEA wurden unter Eiskühlung tropfenweise 0,67 ml (4,8 mmol) Benzylchlorformiat zugefügt. Die Lösung wurde weitere 10 Minuten bei 0°C gerührt und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Pentan (1:1) gereinigt.

Ausbeute 1,02 g (82 % d. Th.)

Die physikalischen Eigenschaften des so erhaltenen Produkts unterscheiden sich nicht von denen des auf anderem Weg erhaltenen (siehe Seite 104).

Darstellung von Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apa]-OAll 20. 0,70 g (1,8 mmol) Boc-[Apro-Apa]-OAll 25, 0,48 g (2,2 mmol) Z-Ala-OH und 1,02 g (2,7 mmol) HBTU wurden in 20 ml DMF p.A. gelöst. Nach Zugabe von 0,94 ml (5,4 mmol) DIEA wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel einkondensiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (3:1) gereinigt.

Ausbeute: 1,00 g (93 % d. Th.)

Die physikalischen Eigenschaften des so erhaltenen Produkts unterscheiden sich nicht von denen des auf anderem Weg erhaltenen (siehe Seite 107).

d) Syntheseroute analog Schema 6

Darstellung des Dipeptids Boc-[Hyp-Apa]-OAll 26. Zu einer Lösung aus 2,25 g (9,75 mmol) Boc-Hyp-OH **7**, 1,34 g (7,5 mmol) 6-Aminopicolinsäureallylester **15**, 4,74 g (11,25 mmol) PyCloP in 85 ml trockenem Methylenchlorid wurden 3,9 ml (22,5 mmol) DIEA gegeben. Die Mischung wurde für 1 Woche bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Pentan (3:1) gereinigt. Auch nach mehrfacher chromatographischer Reinigen konnte das Produkt nicht analysenrein erhalten werden.

Ausbeute: 1,79 g (61 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 392,0 [M+H]⁺, 414,0 [M+Na]⁺

¹H-NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] 1,34 (s, 9H, tBu), 1,99 (m, 1H, H(β)), 2,16 (m, 1H, H(β)), 3,32 (d, ³J = 11,0 Hz, 1H, H(δ)), 3,51 (dd, ²J = 4,9 Hz, ³J = 11,2 Hz, 1H, H(δ)), 4,32 (m, 1H, H(γ)), 4,57 (t, ³J = 7,7 Hz, 1H, H(α)), 4,70 (s, b, 1H, -OH), 4,84 (d, ³J = 6,1 Hz, 2H, CH₂(All)), 5,29 (dd, ²J = 1,4 Hz, ³J_{cis} = 10,4 Hz, 1H, H(cis)), 5,41 (dd, ²J = 1,6 Hz, ³J_{trans} = 17,2 Hz, 1H, H(trans)), 6,04 (m, 1H, H(vic)), 7,75 (d, ³J = 7,4 Hz, 1H, H(3)), 7,95 (t, ³J = 7,8 Hz, 1H, H(4)), 8,27 (d, ³J = 8,2 Hz, 1H, H(5)), 10,45 (s, 1H, -NH-)

Darstellung des Dipeptids Boc-[(Ms-Hyp)-Apa]-OAll 27. 0,94 g (3,6 mmol) Triphenylphosphin und 155 µl (2,4 mmol) frisch destillierte Methansulfonsäure wurden in 5 ml trockenem Toluol vorgelegt. Unter Eiskühlung wurden nacheinander 109 µl (0,8 mmol) trockenes Triethylamin und 0,78 g (2 mmol) Boc-[Hyp-Apa]-OH **26**, suspendiert in 5 ml trockenem Toluol, zugegeben. Danach wurden 775 µl (4 mmol) DiPrAD bis zur Gelbfärbung zugefügt. Beim Erhitzen auf etwa 60°C löste sich das Dipeptid. Die Lösung wurde 6 Stunden bei 90°C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (3:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als farbloses Harz erhalten werden.

Ausbeute:	0,62 g (61 % d. Th.)				
Smp.	Erweichen bei 40-48°C				
Massenspektrum	MALDI/TOF (m/z): 471,0 [M+H] ⁺ , 492,7 [M+Na] ⁺ , 508,4 [M+K] ⁺				
¹ H-NMR	[600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 25°C] δ [ppm] 1,29 + 1,42 (2 s, 9H, tBu), 2,19 + 2,21 (2 m, 1H, ProH(β)), 2,72 (m, 1H, H(β)), 3,19 + 3,21 (2 s, 3H, -CH ₃), 3,54 + 3,56 (2 d, ³ J = 3,2 Hz, 1H, ProH(δ)), 3,83 (m, 1H, ProH(δ)), 4,51 + 4,56 (2 m, 1H, ProH(α)), 4,85 (d, ³ J = 5,3 Hz, 2H, CH ₂ (All)), 5,23 (m, 1H, ProH(γ)), 5,30 (d, ³ J _{cis} = 12,6 Hz, 1H, H(cis)), 5,42 (d, ³ J _{trans} = 17,3 Hz, 1H, H(trans)), 6,05 (m, 1H, H(vic)), 8,72 (d, 1H, ApaH(3)), 8,02 (m, 1H, ApaH(4)), 8,30 + 8,34 (2 d, ³ J = 7,3 Hz bzw. 8,2 Hz, 1H, ApaH(5)), 10,89 + 10,94 (2 s, 1H, -NH-)				
IR	[KBr] cm ⁻¹ 3331 (m), 2980 (m), 1702 (s), 1579 (s), 1534 (s), 1457 (s), 1366 (s), 1247 (s), 1168 (s), 1080 (m), 1050 (m), 960 (s), 903 (s), 829 (m), 768 (s)				
C, H, N	ber	C: 51,16 %	H: 5,80 %	N: 8,95 %	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₈ S
	gef	C: 51,39 %	H: 5,98 %	N: 8,78 %	M _w : 469,51

Darstellung von Boc-[(Azido-Pro)-Apa]-OAll 24. 2,75 g (5,9 mmol) Boc-[(Ms-Hyp)-Apa]-OAll **27** und 1,90 g (29,3 mmol) Natriumazid wurden in 120 ml DMF p.A. gelöst. Die Lösung wurde für 4 Stunden bei 80°C gerührt. Nach dem Abkondensieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Pentan (1:1) gereinigt.

Ausbeute: 1,72 g (71 % d. Th.)

Die physikalischen Eigenschaften des so erhaltenen Produkts unterscheiden sich nicht von denen des auf anderem Weg erhaltenen (siehe Seite 110).

e) Syntheseroute analog Schema 7

Darstellung von (4R)-N-Boc-4-Hydroxy-L-prolinmethylester 29.¹⁴⁹ 4,54 g (25,0 mmol) H-Hyp-OMe **28** wurden in 75 ml Dioxan/Wasser (2:1) gelöst. Unter Eiskühlung wurden 5,23 ml (37,5 mmol) Triethylamin und 6,00 g (27,5 mmol) Boc₂O hinzugefügt. Nach zwei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ml Essigsäureethylester und 25 ml Wasser aufgenommen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige noch zweimal mit je 25 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit 12 ml 0,5 N Salzsäure, zweimal mit je 12 ml Wasser, mit 12 ml 5 %iger Na₂CO₃-Lösung, zweimal mit je 12 ml Wasser und einmal mit 12 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 6,04 g (99 % d. Th.)

Darstellung von (4S)-N-Boc-4-[(Methylsulfonyl)oxy]-L-prolinmethylester 30.^{55,61,62} In einem Schlenkkolben wurden 8,09 g (30,9 mmol) Triphenylphosphin vorgelegt und ohne Ausheizen sekuriert. Das Triphenylphosphin wurde in 17 ml trockenem Toluol gelöst und 1,33 ml (20,6 mmol) Methansulfonsäure wurden zugefügt. Unter Eiskühlung wurden nacheinander 0,96 ml (6,9 mmol) frisch getrocknetes Triethylamin, 3,75 g (15,3 mmol) (4R)-N-Boc-4-Hydroxy-L-prolinmethylester **29** in 20 ml trockenem Toluol und etwa 6,6 ml (34 mmol) DiPrAD bis zum Bestehenbleiben der Gelbfärbung hinzugegeben. Anschließend wurde für 4 Stunden bei 80°C gerührt. War nach 3 Stunden dünnschichtchromatographisch noch Startmaterial nachweisbar, wurden ein Äquivalent Triphenylphosphin und ein Äquivalent DiPrAD nachdosiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Methylenchlorid aufgenommen und die Lösung dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Pentan (1:1) gereinigt.

Ausbeute: 3,34 g (67 % d. Th.)

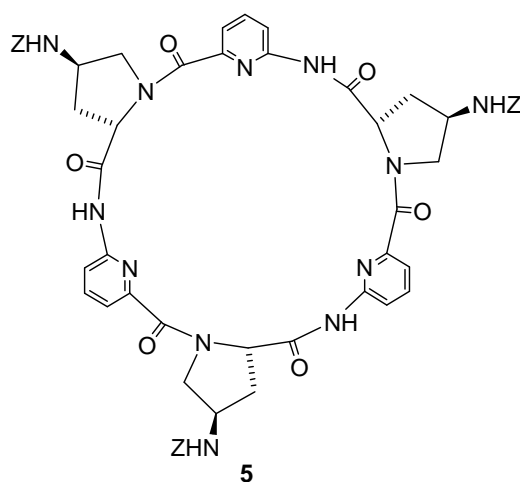
Darstellung von (4S)-N-Boc-4-[(Methylsulfonyl)oxy]-L-prolin 31. 3,11 g (9,6 mmol) (4S)-N-Boc-4-[(Methylsulfonyl)oxy]-L-prolinmethylester **30** wurden in 140 ml Methanol gelöst. Unter Eiskühlung wurden 28,9 ml 1 N Natronlauge zugetropft. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Unter erneuter Eiskühlung wurde der pH-Wert mit 1 N Salzsäure auf 6-7 eingestellt. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen eingengt. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion eingesetzt.

Ausbeute: 2,78 g (94 % d. Th.)

Darstellung von Boc-[(Ms-Hyp)-Apa]-OAll 27. 2,78 g (9,0 mmol) (4S)-1-Boc-4-[(Methylsulfonyl)oxy]-L-prolin **31**, 1,23 g (6,9 mmol) 6-Aminopicolinsäureallylester **15** und 5,69 g (13,5 mmol) PyCloP wurden in 80 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Nach Zugabe von 4,69 ml (27,0 mmol) DIEA wurde die Lösung sieben Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/ Pentan (3:1) gereinigt.

Ausbeute: 2,75 g (61 % d. Th.)

Die physikalischen Eigenschaften des so erhaltenen Produkts unterscheiden sich nicht von denen des auf anderem Weg erhaltenen (siehe Seite 113).

4.3. SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS *CYCLO*{[(Z-APRO)-APA]₃}a) Darstellung des Tetrapeptids Boc-[(Z-Apro)-Apa]₂-OAll⁵⁵

Allyl-Entschützung. 0,63 g (1,2 mmol) Boc-[(Z-Apro)-Apa]-OAll **16** wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. 0,63 g (1,2 mmol) Boc-[(Z-Apro)-Apa]-OAll **16** wurden in 15 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 30 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe umgesetzt.

Kupplung. Zum erhaltenen Allyl-entschützten Dipeptid, dem erhaltenen Boc-entschützten Dipeptid und 0,61 g (1,44 mmol) PyCloP in 40 ml trockenem Methylenchlorid wurden bei Raumtemperatur 0,91 ml (5,28 mmol) DIEA getropft. Die Lösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (4:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man das Produkt als weißen Feststoff.

Ausbeute: 0,76 g (71 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 891,3 [M+H]⁺, 913,4 [M+Na]⁺, 929,4 [M+K]⁺

b) Darstellung des Hexapeptids Boc-[(Z-Apro)-Apa]₃-OAll⁵⁵

Allyl-Entschützung. 0,45 g (0,85 mmol) Boc-[(Z-Apro)-Apa]-OAll **16** wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. 0,76 g (0,85 mmol) Boc-[(Z-Apro)-Apa]₂-OAll wurden in 15 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 30 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe umgesetzt.

Kupplung. Zum erhaltenen Allyl-entschützten Dipeptid, dem bei der Boc-Entschützung erhaltenen Tetrapeptid und 0,33 g (1,02 mmol) TBTU in 25 ml DMF p.A. wurden bei Raumtemperatur 0,62 ml (3,57 mmol) DIEA getropft. Die Lösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde sie auf 300 ml Wasser gegeben und der pH-Wert mit 1 N HCl auf 4 eingestellt. Die Suspension wurde 10 Minuten gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit reichlich Wasser nachgewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Methylenchlorid/Methanol (20:1) gereinigt. Das Produkt konnte nach dem Entfernen des Lösungsmittels als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 0,60 g (56 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 1257,6 [M+H]⁺, 1279,6 [M+Na]⁺, 1295,6 [M+K]⁺

c) Cyclisierung zum Cyclohexapeptid *cyclo*{[(Z-Apro)-Apa]₃} 5⁵⁵

Allyl-Entschützung. 0,60 g (0,48 mmol) Boc-[(Z-Apro)-Apa]₃-OAll wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. Das gesamte allyl-entschützte Hexapeptid Boc-[(Z-Apro)-Apa]₃-OH wurde in 15 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 30 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe umgesetzt.

Cyclisierung. Nach dreimaligem Sekurieren von 0,77 g (2,40 mmol) TBTU wurde das Kupplungsreagenz in 150 ml entgastem DMF p.A. gelöst. Nach der Zugabe von 0,20 ml (1,15 mmol) DIEA wurde bei 80°C mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 3 ½ Stunden eine Lösung aus dem erhaltenen vollständig entschützten Hexapeptid H-[(Z-Apro)-Apa]₃-OH und 0,50 ml (2,88 mmol) DIEA in 30 ml entgastem DMF p.A. getropft. Nach vollendeter Zugabe wurde der pH-Wert mit 0,50 ml DIEA auf pH 9 eingestellt und es wurde eine weitere Stunde bei 80°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde auf einer Kieselgelsäule mit Aceton als Laufmittel vorgereinigt. Eine weitere Reinigung erfolgte mittels RP₈-Säulenchromatographie mit Wasser/Dioxan (10:1, 5:1, 3:2, 2:3). Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen und auf Wasser gegossen. Das ausgefallene, leicht gelbliche Produkt wurde abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,23 g (44 % d. Th.)

Smp. Erweichen ab 170°C, geschmolzen ab 253°C

$[\alpha]_D^{25}$ - 298,1 (c = 2) DMF

Massenspektrum FAB (m/z, rel. Int.): 1099,2 (2,9 %) [M]⁺, 1100,2 (2,7 %)[M+H]⁺

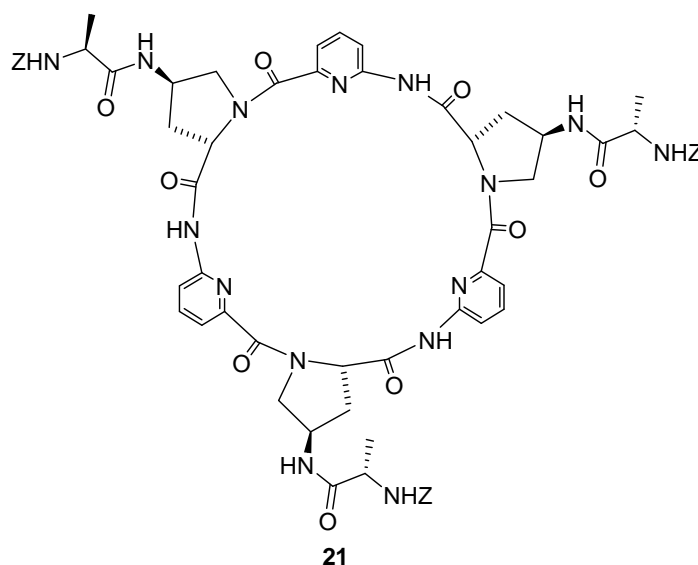
¹H-NMR [500 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 2,23 (m, 3H, AproH(β)), 2,59 (m, 3H, AproH(β)), 3,51 (m, 3H, AproH(δ)), 3,92 (m, 3H, AproH(δ)), 4,05 (m, 3H, AproH(γ)), 5,04 (d, ²J = 12,0 Hz, 3H, CH₂(Z)), 5,09 (d, ²J =

12,0 Hz, 3H, CH₂(Z)), 5,74 (m, 3H, AproH(α)), 7,22 (d, ³J = 7,6 Hz, 3H, ApaH(3)), 7,37 (m, 15H, -Ph), 7,48 (d, ³J = 7,6 Hz, 3 H, ApaH(5)), 7,76 (t, ³J = 8,2 Hz, 6H, ApaH(4) + AproNH), 9,58 (s, b, 3H, -NH-)

¹³C-NMR [125 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 38,2 (AproC(β)), 48,2 (AproC(γ)), 52,7 (AproC(δ)), 60,8 (AproC(α)), 65,9 (CH₂(Z)), 116,6 (ApaC(3)), 120,6 (ApaC(5)), 128,8 (-Ph, C(o)+C(m)+C(p)), 137,2 (-Ph, C(1)), 139,5 (ApaC(4)), 148,7 (ApaC(2)), 151,7 (ApaC(6)), 156,2 (ZCO), 166,2 (ApaCO), 171,2 (AproCO)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3298 (m), 3034 (w), 2954 (w), 2365 (w), 1707 (s), 1630 (m), 1575 (s), 1527 (s), 1464 (s), 1400 (s), 1302 (m), 1262 (m), 1183 (m), 1156 (m), 1080 (m), 1026 (m), 896 (w), 823 (w), 759 (m)

C, H, N: ber C: 61,30 % H: 5,19 % N: 14,66 %
 gef C: 61,26 % H: 4,93 % N: 14,60 % M_w: 1146,19
 C₅₇H₅₄N₁₂O₁₂ · ½ C₃H₆O · H₂O

4.4. SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS *CYCLO*{[(Z-ALA-APRO)-APA]₃}a) Darstellung des Tetrapeptids Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apa]₂-OAll

Allyl-Entschützung. 0,86 g (1,45 mmol) des Dipeptids Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apa]-OAll **20** wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. 0,86 g (1,45 mmol) des Dipeptids Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apa]-OAll **20** wurden in 40 ml trockenem Dioxan mit 80 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Kupplung. Die entschützten Dipeptide wurden zusammen mit 0,56 g (1,74 mmol) TBTU in 40 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 1,11 ml (6,38 mmol) DIEA wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Methylchlorid/Methanol (10:1) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1,51 g (> 99 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 1055,1 [M+Na]⁺, 955,1 [(M-Boc)+Na]⁺

b) Darstellung des Hexapeptids Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apa]₃-OAll

Allyl-Entschützung. 0,86 g (1,45 mmol) des Dipeptids Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apa]-OAll **21** wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. Das gesamte Tetrapeptid Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apa]₂-OAll (1,45 mmol) wurden in 40 ml trockenem Dioxan mit 80 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Kupplung. Das entschützte Dipeptid, das entschützte Tetrapeptid und 0,56 g (1,74 mmol) TBTU wurden in 40 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 1,11 mmol (6,38 mmol) DIEA wurde die Lösung 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 400 ml dest. H₂O gegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl auf 4 eingestellt. Der ausgefallene Feststoff wurde im Exsikkator über P₂O₁₀ getrocknet und anschließend säulenchromatographisch mit Methylenchlorid/Methanol (10:1) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als leicht bräunlicher Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1,53 g (72 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 1470,3 [M+H]⁺, 1492,1 [M+Na]⁺, 1508,0 [M+K]⁺

c) Cyclisierung zum Cyclohexapeptid *cyclo*{[(Z-Ala-Apro)-Apa]₃} 21

Allyl-Entschützung. 1,53 g (1,04 mmol) Hexapeptid Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apa]₃-OAll wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. Das Allyl-entschützte Hexapeptid Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apa]₃-OH wurde in 30 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 60 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Cyclisierung. 0,83 g (2,6 mmol) TBTU wurde nach dreimaligem Sekurieren in 200 ml entgastem DMF gelöst. Dazu wurden 0,27 ml (1,56 mmol) DIEA gegeben. Zu dieser Lösung wurde bei 80°C eine Lösung des vollentschützten Hexapeptids und 1,08 ml (6,24 mmol) DIEA in 40 ml entgastem DMF mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 4 Stunden getropft. Nachdem der pH-Wert überprüft und mit DIEA auf > 9 eingestellt wurde, wurde die Lösung noch eine weitere Stunde bei 80°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit Aceton als Laufmittel vorgereinigt. Zur weiteren Reinigung wurde der ölige Rückstand über eine RP₁₈-Säule mit Wasser/Dioxan (10:1, 5:1, 2:1; 1:1) gereinigt. Der immer noch leicht gelbe Feststoff wurde in Aceton gelöst und auf Wasser gegeben, wobei das Produkt weiß ausfiel. Der Feststoff wurde abfiltriert und im Exsikkator über P₂O₄ getrocknet.

Ausbeute: 388 mg (28 % d. Th.)

Smp. Zersetzung > 167°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 1313,0 [M+H]⁺, 1335,0 [M+Na]⁺, 1351,0 [M+K]⁺

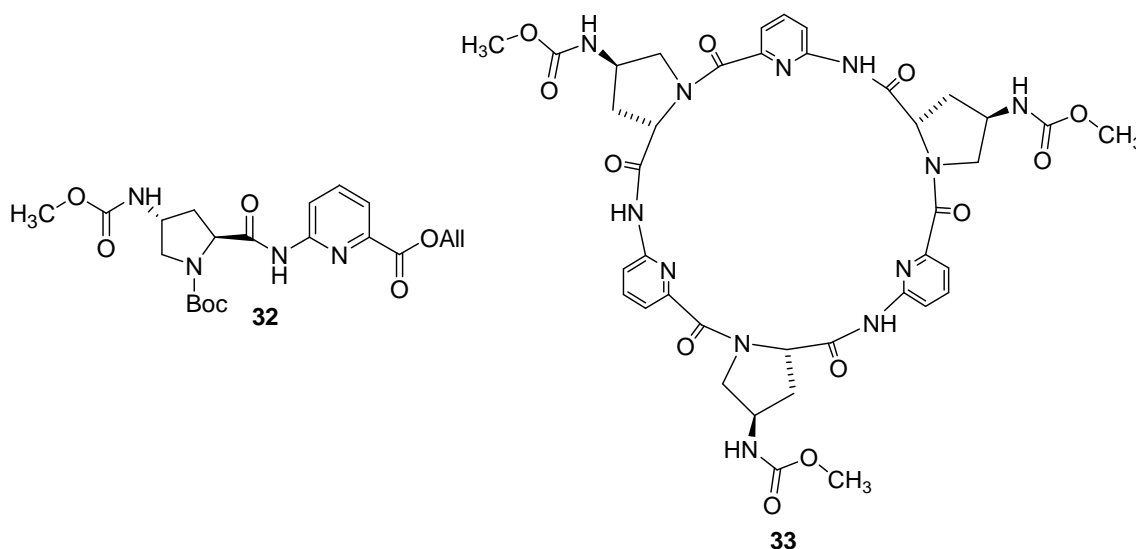
¹H-NMR [600 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 1,21 (d, ³J = 7,0 Hz, 9H, AlaCH₃), 2,21 (m, 3H, AproH(β)), 2,45 (m, 3H, AproH(β)), 3,42 (m, 3H, AproH(δ)), 3,95 (m, 3H, AproH(δ)), 4,06 (m, 3H, AproH(γ)), 4,22 (m, 3H, AlaH(α)), 5,00 (dd, ²J = 12,6 Hz, ³J = 22,9 Hz, 6H, CH₂(Z)), 5,97 (s, b, 3H, AproH(α)), 7,29 + 7,33 (m, 15H, PhH + AlaNH), 7,45 (d, ³J = 7,7 Hz, 3H, ApaH(3)), 7,51 (d, ³J = 7,6 Hz, 3H, ApaH(5)), 7,76 (t, ³J =

8,0 Hz, 3H, ApaH(4)), 8,34 (d, $^3J = 6,7$ Hz, 3H, AproNH), 9,94 (s, b, 3H, -NH-)

$^{13}\text{C-NMR}$ [151 MHz, DMSO- d_6 , 25°C] δ [ppm] 18,4 (AlaCH₃), 37,8 (AproC(β)), 45,8 (AproC(γ)), 49,9 (AlaC(α)), 52,7 (AproC(δ)), 60,5 (AproC(α)), 65,4 (CH₂(Z)), 116,4 (ApaC(3)), 120,0 (ApaC(5)), 127,1 (PhC(D)), 127,8 (PhC(B)), 128,3 (PhC(C)), 137,0 (PhC(A)), 139,2 (ApaC(4)), 148,5 (ApaC(2)), 151,1 (ApaC(6)), 155,7 (ZCO), 165,7 (ApaCO), 171,2 (AproCO), 172,8 (AlaCO)

IR [KBr] cm^{-1} 3301 (m), 3035 (w), 2981 (w), 1706 (s), 1574 (s), 1533 (s), 1464 (s), 1400 (s), 1337 (m), 1337 (m), 1301 (m), 1245 (m), 1182 (m), 1157 (m), 1068 (m), 1027 (w), 823 (w), 759 (m), 698 (m)

C, H, N
 ber C: 57,26 % H: 5,61 % N: 15,18 %
 gef C: 56,98 % H: 5,36 % N: 14,93 % M_w : 1384,43
 $\text{C}_{66}\text{H}_{69}\text{N}_{15}\text{O}_{15} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

4.5. SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS *CYCLO*{[(MeOCO-Apro)-Apa]₃}

Darstellung von Boc-[(MeOCO-Apro)-Apa]-OAll 32. Unter Eiskühlung wurden zu einer Lösung aus 0,75 g (1,92 mmol) Boc-[Apro-Apa]-OAll **25** in 40 ml trockenem Methylenchlorid nacheinander 501 μ l (2,88 mmol) DIEA und 296 μ l (3,84 mmol) Chlorameisensäuremethylester hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Pentan (2:1) gereinigt. Das Produkt konnte nach Entfernen des Lösungsmittels als farbloses Harz erhalten werden.

Ausbeute: 0,44 g (51 % d. Th.)

Smp. Schmelzbereich 61-78°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 449,3 [M+H]⁺, 471,3 [M+Na]⁺, 487,3 [M+K]⁺

¹H-NMR [600 MHz, DMSO-*d*₆, 100 °C] δ [ppm] 1,36 (s, 9H, tBu), 2,19 (m, 2H, H(β)), 3,25 (dd, ²J = 10,6 Hz, ³J = 5,9 Hz, 1H, H(δ)), 3,57 (s, 3H, -CH₃), 3,69 (dd, ²J = 10,5 Hz, ³J = 7,1 Hz, 1H, H(δ)), 4,18 (m, 1H, H(γ)), 4,59 (dd, ³J_{trans} = 8,4 Hz, ³J_{cis} = 4,6 Hz, 1H, H(α)), 4,84 (d, ³J = 5,6 Hz, 2H, CH₂(All)), 5,04 (s, 2H, CH₂(Z)), 5,29 (dd, ²J = 1,3 Hz, ³J_{cis} = 10,4 Hz, 1H, H(cis)), 5,41 (d, ²J = 1,3 Hz, ³J_{trans} = 17,2 Hz, 1H, H(trans)), 6,05 (m,

1H, H(vic)), 6,86 (s, 1H, NH(Apro)), 7,75 (d, $^3J_{H(3)H(4)} = 7,3$ Hz, 1H, H(3)), 7,94 (t, $^3J = 8,0$ Hz, 1H, H(4)), 8,25 (d, $^3J_{H(5)H(4)} = 8,2$ Hz, 1H, H(5)), 10,30 (s, 1H, -NH-)

IR [KBr] cm^{-1} 3331 (s), 2978 (m), 1701 (s), 1580 (m), 1535 (s), 1455 (s), 1403 (s), 1305 (s), 1247 (m), 1162 (s), 1080 (m), 987 (w), 768 (m)

C, H, N
ber C: 56,16 % H: 6,43 % N: 11,91 %
gef C: 55,95 % H: 6,37 % N: 12,01 % M_w : 470,50
 $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7 \cdot 0,25$ Essigsäureethylester

a) Darstellung des Tetrapeptids Boc-[(MeOCO-Apro)-Apa]₂-OAll

Allyl-Entschützung. 0,51 g (1,14 mmol) Boc-[(MeOCO-Apro)-Apa]-OAll **32** wurden entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Allyl-Entschützung umgesetzt.

Boc-Entschützung. 0,51 g (1,14 mmol) Boc-[(MeOCO-Apro)-Apa]-OAll **32** wurden in 12 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 24 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung der Boc-Schutzgruppe umgesetzt.

Kupplung. Die entschützten Dipeptide wurden mit 0,58 g (1,37 mmol) PyCloP in 35 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Nach Zugabe von 0,87 ml (5,02 mmol) DIEA wurde die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Pentan (5:1) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 0,67 g (80 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 739,5 [M+H]⁺, 761,5 [M+Na]⁺, 777,5 [M+K]⁺

b) Darstellung des Hexapeptids Boc-[(MeOCO-Apro)-Apa]₃-OAll

Allyl-Entschützung. 0,34 g (0,76 mmol) Dipeptid Boc-[(MeOCO-Apro)-Apa]-OAll **32** wurden in 10 ml entgastem THF gelöst und entsprechend der Vorschrift zur Allyl-Entschützung umgesetzt.

Boc-Entschützung. Die 0,56 g (0,76 mmol) Boc-[(MeOCO-Apro)-Apa]₂-OAll wurden in 10 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 20 ml 6 N HCl in Dioxan analog der Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Kupplung. Das Allyl-entschützte Dipeptid, das Boc-entschützte Tetrapeptid und 0,29 g (0,91 mmol) TBTU wurden in 25 ml DMF p.A. gelöst. Nach Zugabe von 0,55 ml (3,19 mmol) DIEA wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 2 Stunden gerührt und anschließend auf 300 ml Wasser gegossen. Der pH Wert wurde mit 1 N Salzsäure auf 4 eingestellt. Nach 10 Minuten Rühren wurde der Feststoff abgesaugt und getrocknet. Der braune Feststoff wurde säulenchromatographisch mit Methylenchlorid/Methanol (15:1) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 0,24 g (31 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 1029,6 [M+H]⁺, 1051,6 [M+Na]⁺, 1067,6 [M+K]⁺

c) Cyclisierung zum Cyclohexapeptid *cyclo*{[(MeOCO-Apro)-Apa]₃} 33

Allyl-Entschützung. 0,24 g (0,23 mmol) Boc-[(MeOCO-Apro)-Apa]₃-OAll wurden analog der Vorschrift zur Allyl-Entschützung umgesetzt.

Boc-Entschützung. Das Allyl-entschützte Hexapeptid wurde in 10 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 20 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Cyclisierung. Zu einer Lösung aus 0,37 g (1,15 mmol) TBTU, 96 µl (0,55 mmol) DIEA und 50 ml entgastem DMF p.A. wurde bei 80°C mittels eines Perfusors über einen Zeitraum von 60 Minuten eine Lösung aus dem vollentschützten Hexapeptid und 240 µl (1,38 mmol) DIEA in 10 ml entgastem DMF p.A. getropft. Nach vollständiger Zugabe wurde der pH Wert durch Zugabe von 0,5 ml DIEA auf >9 eingestellt und eine weitere Stunde bei 80°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abkondensiert. Der Rückstand wurde über eine Acetonsäule und anschließend über eine RP₁₈-Säule mit Wasser/Dioxan (10:1, 5:1, 2:1, 1:1) gereinigt. Der vorher gelbliche Feststoff kristallisierte aus Methanol/Wasser als farblose Nadeln.

Ausbeute: 64 mg (32 % d. Th.)

Smp. Schmelzbereich 210-224°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 871,7 [M+H]⁺, 893,5 [M+Na]⁺, 909,9[M+K]⁺

¹H-NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 2,18 (m, 3H, AproH(β)), 2,59 (m, 3H, AproH(β)), 3,49 (m, 3H, AproH(δ)), 3,57 (s, 9H, -CH₃), 3,92 (dd, ²J = 11,9 Hz, ³J = 6,1 Hz, 3H, AproH(δ)), 3,99 (m, 3H, AproH(γ)), 5,62 (m, 3H, AproH(α)), 7,22 (d, ³J = 8,2 Hz, 3H, ApaH(3)), 7,44 (d, ³J = 7,1 Hz, 3 H, ApaH(5)), 7,60(d, ³J = 3,7 Hz, 3H, AproNH), 7,74 (t, ³J = 7,9 Hz, 3H, ApaH(4)), 9,70 (s, 3H, -NH-)

¹³C-NMR [151 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 38,3 (AproC(β)), 48,3 (AproC(γ)), 51,9 (-CH₃) 52,8 (AproC(δ)), 60,8 (AproC(α)), 116,5 (ApaC(3)), 120,4

(ApaC(5)), 139,6 (ApaC(4)), 148,9 (ApaC(2)), 152,0 (ApaC(6)), 157,0 (MeOCO), 166,5 (ApaCO), 171,2 (AproCO)

IR (KBr) cm^{-1} 3267 (m), 2949 (w), 1717 (s), 1634 (s), 1575 (s), 1539 (s), 1464 (s), 1419 (s), 1398 (s), 1357 (m), 1294 (m), 1237 (m), 1185 (m), 1165 (m), 1080 (m), 1061 (m), 990 (w), 879 (w), 824 (w), 765 (m)

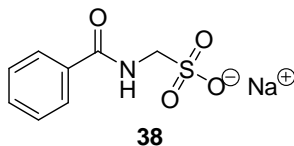
C, H, N ber C: 50,42 % H: 5,36 % N: 17,86 %
 gef C: 50,11 % H: 5,09 % N: 17,97 % M_w : 940,89
 $\text{C}_{39}\text{H}_{42}\text{N}_{12}\text{O}_{12} \cdot 0,5 \text{ MeOH} \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$

Kristallstrukturdaten von **33** (Form I, Abbildung 11): $[\text{C}_{39}\text{H}_{42}\text{N}_{12}\text{O}_{12}] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, aus 1,4-Dioxan/Wasser, $M_r = 996.96$, farblose Prismen, Kristallgröße: $0,11 \times 0,13 \times 0,22 \text{ mm}^3$; $a = 9,7761(3)$, $b = 22,7147(6)$, $c = 10,2712(3) \text{ \AA}$, $\beta = 92,188(1)^\circ$, $U = 2279,2(1) \text{ \AA}^3$, $T = 100 \text{ K}$, monoklin, Raumgruppe $P2_1$ (No. 4), $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1,45 \text{ g cm}^{-3}$, $F(000) = 1052$, Bruker-AXS X₈ Proteum Diffraktometer, $\lambda(\text{Cu } K_\alpha) = 1,54178 \text{ \AA}$, $\mu = 1,00 \text{ mm}^{-1}$, 70416 gemessene und 7391 unabhängige Reflexe ($R_{\text{int}} = 0,03$), 7356 mit $I > 2\sigma(I)$, $\theta_{\text{max}} = 63,7^\circ$, $T_{\text{min}} = 0,5354$ $T_{\text{max}} = 0,7517$ (SADABS), direkte Methode (SHELXS-97) und Methode der kleinsten Fehlerquadrate (SHELXL-97) auf F_o^2 -Basis, Programme von G. Sheldrick, Universität Göttingen, 1997. Chebyshev-Typ Wichtung, 666 Parameter, 1 Einschränkung. Der Kristall enthält 7 Wassermoleküle pro Cyclopeptid. Eines der Wassermoleküle ist gleichmäßig fehlgeordnet über zwei Positionen. Die verbesserte Belegung von O19A und O19B ist 0,149(5). Das Wasser O18 hat eine verbesserte Belegung von 0,336(7). Wasserstoffatome konnten an drei Wassermolekülen (O13, O14 und O15) lokalisiert und ihre Positionen und isotropen ADP konnten verfeinert werden. Die Wasserstoffatome am Cyclopeptid wurden mittels eines riding model-Verfahrens berechnet und verfeinert. Flack-Parameter 0.01(10), $R_1 = 0.0290$ ($I > 2\sigma(I)$), $wR_2 = 0.0771$ (alle Daten), $\Delta\rho_{\text{max/min}} = 0.597/-0.157 \text{ e\AA}^{-3}$

Kristallstrukturdaten für **33** (Form II): $[\text{C}_{39}\text{H}_{42}\text{N}_{12}\text{O}_{12}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, aus 1,4-Dioxan/Wasser, $M_r = 978,94$, farblose Blättchen, Kristallgröße: $0,03 \times 0,18 \times 0,51 \text{ mm}^3$; $a = 9,8329(3)$, $b = 10,1315(3)$, $c = 12,9284(4) \text{ \AA}$, $\alpha = 91,266(1)$, $\beta = 108,716(1)$, $\gamma = 92,410(1)^\circ$, $U = 1217,9(1) \text{ \AA}^3$, $T = 100 \text{ K}$, triklin, Raumgruppe $P1$ (No. 1), $Z = 1$, $\rho_{\text{calcd}} = 1,34 \text{ g cm}^{-3}$, $F(000) = 516$, Bruker-AXS X₈ Proteum Diffraktometer, $\lambda(\text{Cu } K_\alpha) = 1,54178 \text{ \AA}$, $\mu = 0,911 \text{ mm}^{-1}$, 26289

gemessene und 7182 unabhängige Reflexe ($R_{\text{int}} = 0,03$), 6867 mit $I > 2\sigma(I)$, $\theta_{\text{max}} = 63,5^\circ$, ersichtliches $T_{\text{min/max}} = 0,72511$ (*SADABS*), direkte Methode (*SHELXS-97*) und Methode der kleinsten Fehlerquadrate (*SHELXL-97*) auf F_o^2 -Basis, Programme von G. Sheldrick, Universität Göttingen, 1997. Chebyshev-Typ Wichtung, 625 Parameter, 3 Einschränkungen. Der Carbonylsauerstoff O5 des Cyclopeptids ist über zwei Positionen (0,5:0,5) fehlgeordnet genauso wie eine der Methylcarbamatgruppen (N12, C38, O12, C39) und drei der sechs eingelagerten Lösungsmittelwassermoleküle (O15, O17, O18). Der höchste Peak in der abschließenden Differenz-Fourier-Synthese ist 3,07 Å von O12A, 3,21 Å von O17A und 2,55 Å von O16 und könnte daher ein siebtes Wassermolekül sein. Versuche, dieses als solches zu verfeinern, resultierten in einer Bewegung des Sauerstoffatom in die Nähe der fehlgeordneten Methylcarbamatgruppe und erneutem Erscheinen des höchsten Signals an seiner anfänglichen Position. Wo es sinnvoll erschien, wurden die Wasserstoffatome unter Verwendung eines riding model-Verfahrens berechnet und verfeinert. Wegen der geringen Größe des Kristalls (Dicke 30 µm) wurden die Intensitätsdaten mit einem signifikanten Signal/Rausch-Verhältnis mit einer Auflösung von 0,86 Å aufgenommen. Flack-Parameter 0,0(2), $R_1 = 0,0634$ ($I > 2\sigma(I)$), $wR_2 = 0,1742$ (alle Daten), $\Delta\rho_{\text{max/min}} = 0,647/-0,402 \text{ eÅ}^{-3}$.

4.6. SYNTHESE DER GÄSTE

a) Natrium-*N*-benzoylaminomethansulfonat⁶⁵

In einer Mischung aus 10 ml Wasser und 10 ml Ethanol wurden 2,13 g (19,2 mmol) Aminomethansulfonsäure und 2,04 g (19,2 mmol) Natriumcarbonat gelöst. Dazu wurde tropfenweise Benzoylchlorid getropft und anschließend wurde die Lösung für 30 Minuten bei 50°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Der Rückstand wurde mit kaltem Ethanol gewaschen und anschließend aus Wasser umkristallisiert. Der Rückstand wurde mit kaltem Wasser, kaltem Ethanol und Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,08 g (24 % d. Th.)

Smp. 263-266°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 237,6 [M+H]⁺, 259,7 [M+Na]⁺

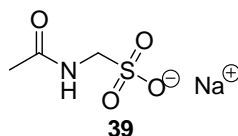
¹H-NMR [400 MHz, D₂O, 25°C] δ [ppm] 4,58 (s, 2H, -CH₂-), 7,53 (t, ³J_{H(C)H(D)} = 7,5 Hz, ³J_{H(B)H(C)} = 7,2 Hz 2H, PhH(C)), 7,62 (t, ³J_{H(B)H(C)} = 7,2 Hz, 2H, PhH(B)), 7,81 (d, ³J_{H(C)H(D)} = 7,5 Hz, 2H, PhH(D))

¹³C-NMR [151 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 56,3 (-CH₂-), 127,6 (PhC(C)), 129,2 (PhC(B)), 132,8 (PhC(A)), 133,5 (PhC(D)), 170,6 (CO)

IR [KBr] cm⁻¹ 3542 8 (m), 3428 8 (m, b), 3388 (s), 3064 (w), 1645 (s), 1644 (s), 1601 (m), 1581 (m), 1545 (s), 1492 (m), 1403 (m), 1329 (m), 1295 (m), 1247 (m), 1199 (s), 1179 (s), 1044 (s), 957 (w), 803 (w), 712 (s), 692 (s)

C, H, N	ber	C: 35,87 %	H: 4,01 %	N: 4,65 %	$C_8H_8NNaO_4S \cdot H_2O$
	gef	C: 35,95 %	H: 3,79 %	N: 4,68 %	$M_w: 255,22$

b) Natrium-*N*-acetylaminothiomethansulfonat



In 20 ml Wasser wurden 1,92 g (17,3 mmol) Aminomethansulfonsäure und 0,69 g (17,3 mmol) Natriumhydroxid gelöst. Nach Zugabe von 1,90 ml (19,0 mmol) Essigsäureanhydrid wurde die Lösung 30 Minuten bei 60°C gerührt. Nach Zugabe von 20 ml Ethanol wurde die Lösung abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der ölige Rückstand wurde mit Ethanol angerieben und abfiltriert. Das Produkt wurde aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 1,77 g (58 % d. Th.)

Smp. Zersetzung > 254°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 176,6 [M+H]⁺, 198,6 [M+Na]⁺

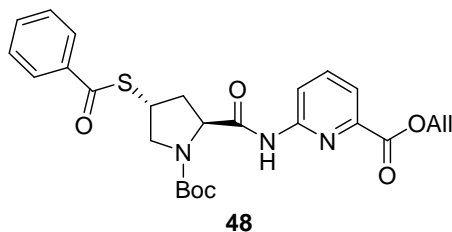
¹H-NMR [400 MHz, D₂O, 25°C] δ [ppm] 2,03 (s, 3H, -CH₃), 4,35 (s, 2H, -CH₂-)

¹³C-NMR [100 MHz, D₂O, 25°C] δ [ppm] 22,1 (-CH₃), 55,6 (-CH₂-), 174,1 (CO)

IR [KBr] cm⁻¹ 3328 (s), 3085 (w), 1645 (s), 1553 (s), 1418 (m), 1381 (m), 1322 (m), 1212 (s), 1060 (s), 1014 (m), 851 (w), 781 (m), 729 (m), 720 (m), 646 (s), 623 (s)

C, H, N	ber	C: 20,57 %	H: 3,45 %	N: 8,00 %	$C_3H_6NNaO_4S$
	gef	C: 20,27 %	H: 3,62 %	N: 7,84 %	$M_w: 175,14$

4.7. SYNTHESE DES DIPEPTIDS Boc-[(TB-Pro)-Apa]-OAll



Darstellung des Dipeptids Boc-[(TB-Pro)-Apa]-OAll 48. 4,21 g (9,00 mmol) Boc-[(Ms-Hyp)-Apa]-OAll **27** und 3,73 g (27,00 mmol) Kaliumcarbonat wurden in 180 ml DMF p.A. suspendiert. Nach Zugabe von 3,74 ml (28,8 mmol) Thiobenzoesäure wurde die Suspension fünf Stunden bei 80°C gerührt. Nach dem Abkondensieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (1:1) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als farbloses Harz erhalten werden.

Ausbeute: 2,66 g (58 % d. Th.)

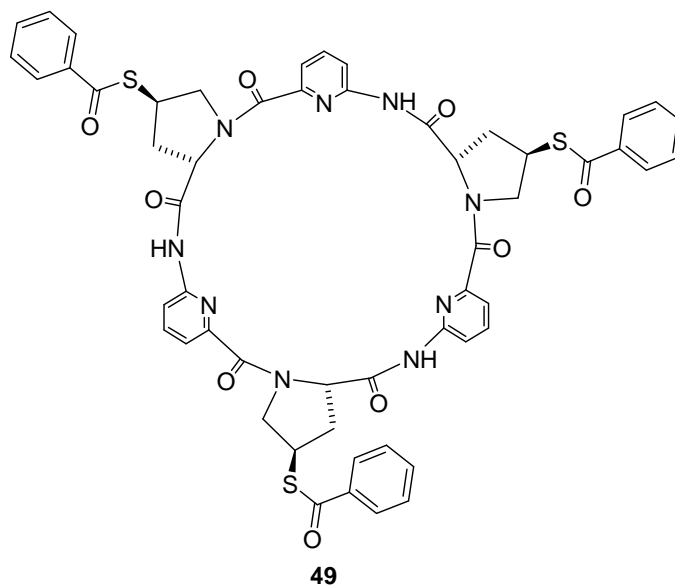
Smp. Erweichen 50-59°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 512,3 [M+H]⁺, 534,1 [M+Na]⁺, 550,1 [M+K]⁺

¹H-NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] δ [ppm] 1,36 (s, 9H, tBu), 2,43 (m, 2H, H(β)), 3,47 (dd, ²J = 11,4 Hz, ³J = 5,5 Hz, 1H, H(δ)), 3,98 (dd, ²J = 11,2 Hz, ³J = 6,9 Hz, 1H, H(δ)), 4,26 (m, 1H, H(γ)), 4,69 (dd, ³J = 5,3 Hz, ³J = 8,1 Hz, 1H, H(α)), 4,84 (d, ³J = 5,5 Hz, 2H, -CH₂(all-)), 5,28 (d, ³J_{cis} = 10,2 Hz, 1H, H(cis)), 5,42 (d, ³J_{trans} = 17,2 Hz, 1H, H(trans)), 6,05 (m, 1H, H(vic)), 7,55 (t, ³J = 7,8 Hz, 2H, H(C)), 7,68 (t, ³J = 7,5 Hz, 1H, H(D)), 7,77 (d, ³J = 7,5 Hz, 1H, H(3)), 7,90 (d, ³J = 7,9 Hz, 1H, H(B)), 7,97 (t, ³J = 8,0 Hz, 1H, H(4)), 8,29 (d, ³J = 7,8 Hz, 1H, H(5)), 10,57 (s, 1H, -NH-)

IR [KBr] cm⁻¹ 3288 (m), 3063 (m), 2977 (m) 2934 (m), 1703 (s), 1667 (s), 1580 (s), 1535 (s), 1455 (s), 1396 (s), 1367 (s), 1303 (s), 1245 (m), 1207 (m), 1159 (s), 983 (w), 908 (m), 827 (w), 768 (m), 688 (m)

C, H, N	ber	C: 61,04 %	H: 5,71 %	N: 8,21 %	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O ₆ S
	gef	C: 60,75 %	H: 5,52 %	N: 8,07 %	M _w : 511,59

4.8. SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS *CYCLO*{[(TB-Pro)-Apa]₃}a) Darstellung des Tetrapeptids Boc-[(TB-Pro)-Apa]₂-OAll

Allyl-Entschützung. 0,72 g (1,41 mmol) Boc-[(TB-Pro)-Apa]-OAll **48** wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. 0,72 g (1,41 mmol) Boc-[(TB-Pro)-Apa]-OAll **48** wurden in 40 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 80 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Kupplung. Zum erhaltenen Allyl-entschützten Dipeptid, dem erhaltenen Boc-entschützten Dipeptid und 0,71 g (1,69 mmol) PyCloP in 50 ml trockenem Methylenchlorid wurden bei Raumtemperatur 1,08 ml (6,20 mmol) DIEA getropft. Die Lösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Pentan (1:1) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1,01 g (83 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 865,1 [M+H]⁺, 887,1 [M+Na]⁺, 903,1 [M+K]⁺

b) Darstellung des Hexapeptids Boc-[(TB-Pro)-Apa]₃-OAll

Allyl-Entschützung. 0,60 g (1,17 mmol) Boc-[(TB-Pro)-Apa]-OAll **48** wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. 1,01 g (1,17 mmol) Boc-[(TB-Pro)-Apa]₂-OAll wurden in 20 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 40 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Kupplung. Zum erhaltenen Allyl-entschützten Dipeptid, dem bei der Boc-Entschützung erhaltenen Tetrapeptid und 0,53 g (1,4 mmol) HBTU in 30 ml DMF p.A. wurden bei Raumtemperatur 0,85 ml (4,91 mmol) DIEA getropft. Die Lösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde sie auf 300 ml Wasser gegeben und der pH-Wert mit 1 N HCl auf 4 eingestellt. Die Suspension wurde 10 Minuten gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit reichlich Wasser nachgewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Methylenchlorid/Methanol (10:1) gereinigt. Das Produkt konnte nach dem Entfernen des Lösungsmittels als leicht bräunlicher Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1,70 g (>99 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 1217,9 [M+H]⁺, 1239,9 [M+Na]⁺, 1255,9 [M+K]⁺

c) Cyclisierung zum Cyclohexapeptid *cyclo*{[(TB-Pro)-Apa]₃} 49

Allyl-Entschützung. 0,67 g (0,55 mmol) Boc-[(TB-Pro)-Apa]₃-OAll wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. Das gesamte allyl-entschützte Hexapeptid Boc-[(TB-Pro)-Apa]₃-OH wurde in 6 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 12 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe umgesetzt.

Cyclisierung. Nach dreimaligem Sekurieren von 0,52 g (1,38 mmol) HBTU wurde das Kupplungsreagenz in 100 ml entgastem DMF p.A. gelöst. Nach der Zugabe von 0,14 ml (0,83 mmol) DIEA wurde bei 80°C mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 2 Stunden eine Lösung aus dem vollständig entschützten Hexapeptid H-[(TB)Pro-Apa]₃-OH und 0,57 ml (3,28 mmol) DIEA in 20 ml entgastem DMF p.A. getropft. Nach vollendeter Zugabe wurde der pH-Wert mit 0,50 ml DIEA auf pH 9 eingestellt und es wurde eine weitere Stunde bei 80°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde auf einer Kieselgelsäule mit Aceton als Laufmittel vorgereinigt. Eine weitere Reinigung erfolgte mittels RP₁₈-Säulenchromatographie mit Wasser/Dioxan (10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2). Der schwach gelbe Feststoff wurde erneut über eine Kieselgelsäule mit Aceton gereinigt. Anschließend wurde er in wenig Methanol gelöst und mit Wasser ausgefällt. Der jetzt weiße Feststoff wurde abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 191 mg (33 % d. Th.)

Smp. Zersetzungsbereich 161-190°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 1059,9 [M+H]⁺, 1081,9 [M+Na]⁺, 1079,9 [M+K]⁺

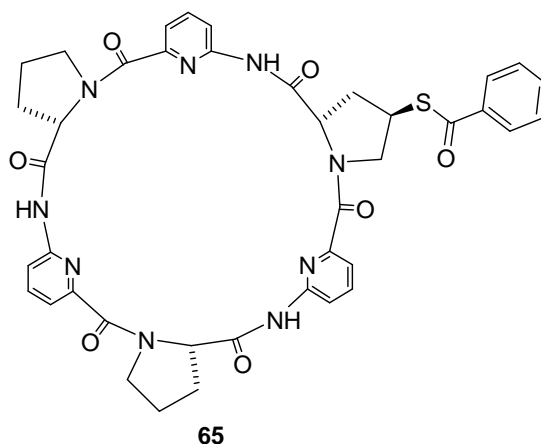
¹H-NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 2,61 (m, 3H, ProH(β)), 2,80 (m, 3H, ProH(β)), 3,67 (m, 3H, ProH(δ)), 4,20 (m, 6H, ProH(δ) + ProH(γ)), 5,68 (m, 3H, ProH(α)), 7,24 (d, ³J = 8,2 Hz, 3H, ApaH(3)), 7,48 (d, 3H, ³J = 7,5 Hz, 3H, ApaH(5)), 7,56 (t, ³J = 7,8 Hz, 6H, PhH(C)), 7,71 (t, ³J =

7,5 Hz, 3H, PhH(D)), 7,77 (t, $^3J = 7,8$ Hz, 3H, ApaH(4)), 7,92 (d, 6H, $^3J = 7,1$ Hz, 6H, PhH(B)), 9,69 (s, 3H, -NH-)

$^{13}\text{C-NMR}$ [151 MHz, DMSO- d_6 , 25°C] δ [ppm] 38,1 (ProC(β) + ProC(γ)), 53,4 (ProC(δ)), 60,9 (ProC(α)), 116,3 (ApaC(3)), 120,0 (ApaC(5)), 126,9 (PhC(B)), 129,2 (PhC(C)), 134,3 (PhC(D)), 136,0 (ApaC(4)), 139,2 (PhC(A)), 148,5 (ApaC(2)), 151,3 (ApaC(6)), 166,2 (ApaCO), 170,2 (AproCO), 190,6 (PhCO)

IR [KBr] cm^{-1} 3266 (w), 3059 (w), 2926 (w), 1708 (m), 1663 (s), 1575 (s), 1523 (m), 1462 (s), 1398 (s), 1299 (m), 1207 (s), 1175 (m), 1079 (w), 999 (w), 909 (s), 822 (w), 760 (m), 689 (s), 648 (m)

C, H, N
ber C: 59,02 % H: 4,68 % N: 11,26 %
gef C: 59,04 % H: 4,74 % N: 11,04 % M_w : 1119,27
 $\text{C}_{54}\text{H}_{45}\text{N}_9\text{O}_9\text{S}_3 \cdot \text{MeOH} \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$

4.9. SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS *CYCLO*{[PRO-APA]₂-[(TB-PRO)-APA]}

a) Synthese des Dipeptids Boc-[Pro-Apa]-OAll 64.

1,94 g (9,0 mmol) Boc-Pro-OH **7**, 1,34 g (7,5 mmol) 6-Aminopicolinsäureallylester **15** und 4,74 g (11,3 mmol) PyCloP wurden in 85 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Nach Zugabe von 3,91 ml DIEA wurde die Lösung für 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Pentan (1:1) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1,62 g (93 % d. Th.)

Smp. Schmelzbereich 108-122°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 375,9 [M+H]⁺, 397,9 [M+Na]⁺, 413,9 [M+K]⁺

¹H-NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] δ [ppm] 1,36 (s, 9H, tBu), 1,83 (m, 1H, ProH(γ)), 1,93 (m, 2H, ProH(γ)+ProH(β)), 2,22 (m, 1H, ProH(β)), 3,42 (m, 2H, ProH(δ)), 4,49 (dd, ²J = 2,3 Hz, ²J = 8,3 Hz, 1H, ProH(α)), 4,85 (d, ³J = 3,4 Hz, 2H, CH₂(All)), 5,30 (d, ³J_{cis} = 10,5 Hz, 1H, H(cis)), 5,43 (d, ³J_{trans} = 17,3 Hz, 1H, H(trans)), 6,05 (m, 1H, H(vic)), 7,77 (d, ³J = 7,7 Hz, ApaH(3)), 7,96 (t, ³J = 7,9 Hz, 1H, ApaH(4)), 8,28 (d, ³J = 8,5 Hz, 1H, ApaH(5)), 10,43 (s, 1H, -NH-)

IR [KBr] cm^{-1} 3196 (w), 3050 (w), 1975 (w), 2878 (w), 1747 (s), 1712 (s), 1665 (s), 1582 (s), 1453 (s), 1424 (s), 1362 (w), 1306 (s), 1238 (m), 1203 (m), 1163 (s), 1146 (s), 978 (w), 925 (w), 774 (w)

C, H, N	ber	C: 60,97 %	H: 6,71 %	N: 11,19 %	$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5$
	gef	C: 60,86 %	H: 6,88 %	N: 11,05 %	$M_w: 375,42$

b) Synthese des Tetrapeptids Boc-[Pro-Apa]₂-OAll.

Allyl-Entschützung. 1,2 g (3,2 mmol) Boc-[Pro-Apa]-OAll **64** wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. 1,2 g (3,2 mmol) Boc-[Pro-Apa]-OAll **64** wurden in 75 ml trockenem Dioxan mit 150 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Kupplung. Die entschützten Dipeptide wurden zusammen mit 1,62 g (3,84 mmol) PyCloP in 70 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Nach Zugabe von 2,45 ml (14,08 mmol) DIEA wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Pentan (3:1) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1,80 g (95 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 593,0 [M+H]⁺, 615,0 [M+Na]⁺

c) Synthese des Hexapeptids Boc-[Pro-Apa]₂-[(TB-Pro)-Apa]-OAll.

Allyl-Entschützung. 1,80 g (3,04 mmol) Tetrapeptid Boc-[Pro-Apa]₂-OAll wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. 1,55 g (3,04 mmol) Boc-[(TB-Pro)-Apa]-OAll **48** wurden in 50 ml trockenem Dioxan mit 100 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Kupplung. Das entschützte Tetrapeptid, das entschützte Dipeptid und 1,17 g (3,65 mmol) TBTU wurden in 100 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 2,22 ml (12,77 mol) DIEA wurde die Lösung 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 1 l Wasser gegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl auf 4 eingestellt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert und im Vakuum über P₂O₄ getrocknet.

Ausbeute: 2,78 g (> 99 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 946,2 [M+H]⁺, 968,1 [M+Na]⁺, 984,1 [M+K]⁺

d) Cyclisierung zum Cyclopeptid *cyclo*{[Pro-Apa]₂-[(TB-Pro)-Apa]} 65

Allyl-Entschützung. 1,00 g (1,00 mmol) des erhaltenen Boc-[Pro-Apa]₂-[(TB-Pro)-Apa]-OAll wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Entschützung von Allylestern umgesetzt.

Boc-Entschützung. Das Allyl-entschützte Hexapeptid wurden in 15 ml trockenem Dioxan mit 30 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Cyclisierung zu 65. 2,41 g (7,50 mmol) TBTU wurde nach dreimaligem Sekurieren in 250 ml entgastem DMF gelöst. Dazu wurden 0,63 ml (3,60 mmol) DIEA gegeben. Zu dieser Lösung wurde bei 80°C eine Lösung des vollentschützten Hexapeptids und 1,56 ml (9,00 mmol) DIEA in 50 ml entgastem DMF mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 5 Stunden getropft. Nachdem der pH-Wert überprüft und mit DIEA auf > 9 eingestellt wurde, wurde die Lösung noch eine weitere Stunde bei 80°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit Aceton als Laufmittel vorgereinigt. Zur weiteren Reinigung wurde der ölige Rückstand über eine RP₁₈-Säule mit Wasser/Dioxan (10:1, 5:1, 2:1; 1:1) gereinigt. Der immer noch leicht gelbe Feststoff wurde in Aceton gelöst und auf Wasser gegeben, wobei das Produkt weiß ausfiel. Der Feststoff wurde abfiltriert und im Exsikkator über P₂O₄ getrocknet.

Ausbeute: 544 mg (46 % d. Th.)

Smp. Erweichen 197 – 216°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 788,2 [M+H]⁺, 810,2 [M+Na]⁺, 826,2 [M+K]⁺

¹H-NMR [600 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 1,82 (m, 4H, ProH(γ)), 2,03 (m, 2H, ProH(β)), 2,55 (m, 3H, ProH(β) + HypH(β)), 2,88 (m, 1H, HypH(β)), 3,56 (m, 2H, ProH(δ)), 3,69 (m, 3H, ProH(δ) + Hyp(δ)), 4,17 (m, 1H, HypH(δ)), 4,22 (m, 1H, HypH(γ)), 5,53 (m, 1H, ProH(α)), 5,64 (m, 2H, ProH(α)), 7,20 (m, 3H, ApaH(3)), 7,41 (d, ³J = 7,7 Hz, 1H, ApaH(5)), 7,43 (d, ³J = 7,7 Hz, 1H, ApaH(5)), 7,47 d, ³J = 7,7 Hz, 1H, ApaH(5)), 7,59 (t, ³J = 7,7 Hz, 3H, PhH(C)), 7,73 (m, 4H, ApaH(4) + PhH(D)), 7,95

(d, $^3J = 8,5$ Hz, 2H, PhH(B)), 9,54 (s, 1H, -NH-), 9,55 (s, 1H, -NH-), 9,74 (s, 1H, -NH-)

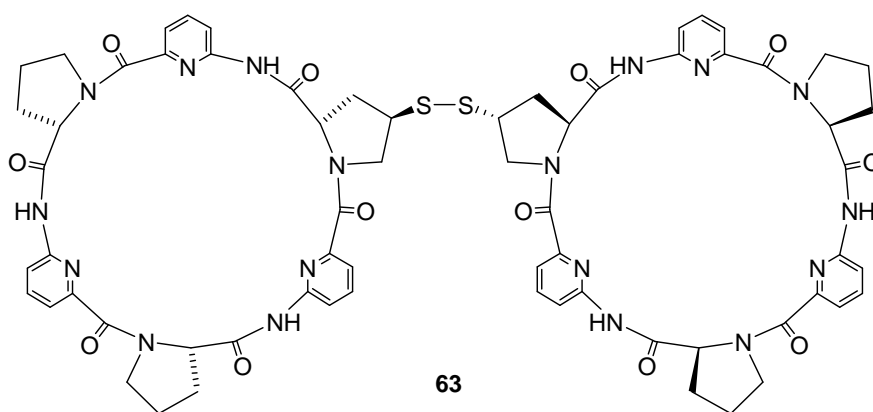
$^{13}\text{C-NMR}$ [151 MHz, DMSO- d_6 , 25°C] δ [ppm] 22,4 + 22,4 (ProC(γ)), 32,4 + 32,6 (ProC(β)), 38,2 (HypC(β)), 48,0 + 48,1 (ProC(δ)), 53,5 (HypC(δ)), 60,7 + 61,5 + 61,6 (ProC(α) + HypC(α)), 66,3 (HypC(γ)), 115,5 + 115,9 + 116,5 (ApaC(3)), 119,7 + 120,0 (ApaC(5)), 126,9 (PhC(B)), 129,3 (PhC(C)), 134,3 (PhC(D)), 136,0 (PhC(A)), 139,0 (ApaC(4)), 148,5 + 148,5 (ApaC(2)), 151,5 + 151,7 + 152,0 (ApaC(6)), 165,7 + 166,0 + 166,2 (ApaCO), 170,0 + 170,9 + 171,3 (HypCO + ProCO), 190,6 (PhCO)

IR [KBr] cm^{-1} 3461 (w), 3384 (w), 3253 (w), 2966 (w), 1700 (s), 1663 (s), 1623 (s), 1573 (s), 1533 (s), 1464 (s), 1419 (s), 1394 (s), 1296 (m), 1204 (m), 1157 (m), 1081 (w), 989 (w), 907 (m), 823 (w), 760 (m), 689 (m)

C, H, N
ber C: 57,07 % H: 5,15 % N: 14,97 %
gef C: 57,31 % H: 5,09 % N: 15,02 % M_w : 841,84
 $\text{C}_{40}\text{H}_{37}\text{N}_9\text{O}_7\text{S} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$

4.10. SYNTHESE DER BIS(CYCLOPEPTIDE) (*CYCLO*{[PRO-APA]₂[-S-PRO]-APA}]₂ UND (*CYCLO*{[-S-PRO]-APA]₃)₂

Versuch zur Verseifung und Oxidation von *cyclo*{[(TB-Pro)-Apa]₃} **49 zu Bis(cyclopeptid) (*cyclo*{[-S-Pro)-Apa]₃)₂ **53**.** Das *cyclo*{[(TB-Pro)-Apa]₃} **49** wurden in wenig trockenem Methanol suspendiert. Es erfolgte Zugabe von trockenem 1,4-Dioxan bis zur vollständigen Lösung des Cyclopeptids. Nach dem Zufügen von 12 Äquivalenten DIEA wurde die Lösung für bis zu 20 Tage bei Raumtemperatur z.T. unter Sauerstoffatmosphäre gerührt. Die Verseifung und Oxidation wurde massenspektrometrisch verfolgt. Das gewünschte Produkt konnte allerdings nicht isoliert werden.



Verseifung und Oxidation von *cyclo*{[Pro-Apa]₂[(TB-Pro)-Apa]} 65 zu Bis(cyclopeptid) (*cyclo*{[Pro-Apa]₂[(*-S-Pro*)-Apa]}₂ 63. 320 mg (0,41 mmol) *cyclo*{[Pro-Apa]₂[(TB-)Pro-Apa]} 65 wurden in 30 ml trockenem Methanol gelöst. Nach Zugabe von 282 μ l (1,62 mmol) DIEA wurde die Lösung für 3 Tage unter Sauerstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand über eine RP₁₈-Säule mit Dioxan/Wasser (10:1, 5:1, 2:1, 1:1) gereinigt. Es wurde sowohl das reine Bis(cyclopeptid) erhalten als auch Mischfraktionen von Bis(cyclopeptid) 63 und dem monomeren Cyclopeptidthiol 66.

Ausbeute: reines Bis(cyclopeptid): 45 mg (16 % d. Th.)
Mischfraktion: 203 mg

Smp. > 250°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 1365,5 [M+H]⁺, 1387,5 [M+Na]⁺, 1403,4 [M+K]⁺

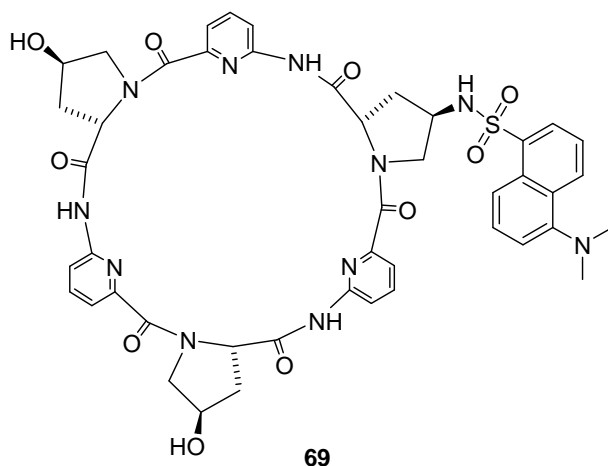
¹H-NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 1,83 (m, 8H, ProH(γ)) 2,03 (m, 4H, ProH(β)), 2,54 (m, 6H, ProH(β) + HypH(β)), 2,92 (m, 2H, HypH(β)), 3,57 + 3,68 + 3,82 (m, 12H, ProH(δ) + HypH(δ)), 4,02 (m, 2H, HypH(γ)), 5,53 (m, 2H, HypH(α)), 5,59 + 5,66 (m, 4H, ProH(α)), 7,19 (m, 6H, ApaH(3)), 7,42 (m, 6H, ApaH(4)), 7,73 (m, 6H, ApaH(5)), 9,57 + 9,59 + 9,76 (s, 6 H, -NH-)

¹³C-NMR [151 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 22,4 + 22,5 (ProC(γ)), 32,4 + 32,6 (ProC(β)), 37,3 (HypC(β)), 44,5 (HypC(γ)), 48,0 + 48,2 (ProC(δ)), 53,0 (HypC(δ)), 60,6 + 61,5 + 61,6 (ProC(α) + HypC(α)), 115,6 + 115,9 +

116,7 (ApaC(3)), 119,7 + 120,1 (ApaC(5)), 139,0 + 139,1 (ApaC(4)),
148,5 + 148,5 (ApaC(2)), 151,7 + 152,0 (ApaC(6)), 165,7 + 166,1 +
166,4 (ApaCO), 170,1 + 170,9 + 171,3 (ProCO + HypCO)

IR [KBr] cm^{-1} 3384 (w), 3260 (w), 2964 (w), 2873 (w), 1704 (s), 1635 (s),
1574 (s), 1518 (s), 1460 (s), 1394 (s), 1339 (m), 1296 (m), 1255 (m),
1154 (m), 1079 (w), 990 (w), 819 (m), 759 (m)

C, H, N ber C: 53,80 % H: 5,20 % N: 17,11 %
gef C: 53,97 % H: 5,02 % N: 16,88 % M_w : 1473,57
 $\text{C}_{66}\text{H}_{64}\text{N}_{18}\text{O}_{12}\text{S}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

4.11. SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS $CYCLO\{[HYP-APA]_2-[(DANSYL-APRO)-APA]\}$ **a) Darstellung des Dipeptids Boc-[Hyp-Apa]-OBn.⁵¹**

Zu 1,71 g (7,5 mmol) 6-Aminopicolinsäurebenzylester, 2,61 g (11,3 mmol) (4*R*)-*N*-Boc-4-Hydroxy-*L*-prolin **7** und 4,74 g (11,3 mmol) PyCloP in 85 ml trockenem Methylenchlorid wurden bei Raumtemperatur 3,9 ml (22,6 mmol) DIEA getropft. Die Lösung wurde 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (3:1) vorgereinigt. Sobald das Produkt eluierte, wurde auf reinen Essigsäureethylester umgestellt. Alle Fraktionen, die Produkt enthielten, wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in etwa 100 ml Methylenchlorid aufgenommen und in etwa 800 ml Diethylether eingetrofft. Nach 10 Minuten Rühren wurde der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde erneut säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (15:1) gereinigt.

Ausbeute: 2,50 g (75 % d. Th.)

b) Darstellung des acetylierten Dipeptids Boc-[(Ac-Hyp)-Apa]-OBn 67.⁵¹

Nach der Zugabe von 770 μl (4,4 mmol) DIEA zu 1,30 g (2,9 mmol) Dipeptid Boc-[Hyp-Apa]-OBn in 12 ml Essigsäureanhydrid wurde die erhaltene Lösung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Unter Eiskühlung wurde das überschüssige Essigsäureanhydrid mit 60 ml Wasser hydrolysiert und die Lösung noch 1 h weiter gerührt. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit Wasser, zweimal mit 10 %iger Na_2CO_3 -Lösung und noch dreimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (1:1) gereinigt. Das Rohprodukt wurde mit Wasser angerieben, abfiltriert und im Exsikkator unter Vakuum über P_2O_{10} getrocknet.

Ausbeute: 1,27 g (91 % d. Th.)

c) Darstellung des Tetrapeptids Boc-[(Ac-Hyp)-Apa]₂-OBn

Benzyl-Entschützung. 0,60 mg (1,24 mmol) Boc-[(Ac-Hyp)-Apa]-OBn **67** wurden in 50 ml Dioxan/Wasser (9:1) nach der allgemeinen Vorschrift umgesetzt.

Boc-Entschützung. 0,60 mg (1,42 mmol) Boc-[(Ac-Hyp)-Apa]-OBn **67** wurden in 10 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 20 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe umgesetzt.

Kupplung. Zum erhaltenen Benzyl-entschützten Dipeptid Boc-[(Ac-Hyp)-Apa]-OH, dem erhaltenen Boc-entschützten H-[(Ac-Hyp)-Apa]-OBn und 0,63 g (1,29 mmol) PyCloP in 40 ml trockenem Methylenchlorid wurden bei Raumtemperatur 0,95 ml (5,46 mmol) DIEA getropft. Die Lösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, und der Rückstand säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester/Hexan (5:1) gereinigt.

Ausbeute: 0,81 g (87 % d. Th.)

d) Darstellung des Hexapeptids Boc-[(Ac-Hyp)-Apa]₂-[(Z-Apro)-Apa]-OAll

Benzyl-Entschützung. 0,81 g (1,07 mmol) Boc-[(Ac-Hyp)-Apa]₂-OBn wurden in 50 ml Dioxan/Wasser (9:1) nach der allgemeinen Vorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 0,71 g (99 % d. Th.)

Boc-Entschützung. 0,56 mg (1,07 mmol) Boc-[(Z-Apro)-Apa]-OAll **16** wurden in 10 ml trockenem Dioxan gelöst und mit 20 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe umgesetzt.

Ausbeute: 0,52 g (98 % d. Th.)

Kupplung. Zum erhaltenen Benzyl-entschützten Tetrapeptid, dem bei der Boc-Entschützung erhaltenen Dipeptid und 0,38 g (1,18 mmol) TBTU in 30 ml DMF p.A. wurden bei Raumtemperatur 0,78 ml (4,49 mmol) DIEA getropft. Die Lösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend auf 300 ml Wasser gegeben. Mit 1 N HCl wurde der pH-Wert auf pH 4 eingestellt. Die Suspension wurde 10 Minuten gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit reichlich Wasser nachgewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Methylchlorid/Methanol (20:1) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 0,85 g (74 % d. Th.)

e) Cyclisierung zum Cyclohexapeptid *cyclo*{[(Ac-Hyp)-Apa]₂-[(Z-Apro)-Apa]} 68

Allyl-Entschützung. 0,85 g (0,79 mmol) Boc-[(Ac-Hyp)-Apa]₂-[(Z-Apro)-Apa]-OAll wurden entsprechend der allgemeinen Vorschrift zum Abspalten der Allyl-Schutzgruppe entschützt.

Boc-Entschützung. 0,83 g Allyl-entschütztes Hexapeptid Boc-[(Ac-Hyp)-Apa]₂-[(Z-Apro)-Apa]-OH wurden in 20 ml trockenem Dioxan suspendiert und entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe umgesetzt.

Cyclisierung. Nach dreimaligem Sekurieren von 1,27 g (3,95 mmol) TBTU wurde das Kupplungsreagenz in 200 ml entgastem DMF p.A. gelöst. Nach der Zugabe von 0,33 ml (1,90 mmol) DIEA wurde bei 80°C mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 4 Stunden eine Lösung aus dem vollständig entschützten Hexapeptid H-[(Ac)Hyp-Apa]₂-(Z)Apro-Apa-OH und 0,83 ml (4,75 mmol) DIEA in 40 ml entgastem DMF p.A. getropft. Nach vollendeter Zugabe wurde der pH-Wert mit 0,50 ml DIEA auf pH 9 eingestellt und es wurde eine weitere Stunde bei 80°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde auf einer Kieselgelsäule mit Aceton als Laufmittel vorgereinigt. Eine weitere Reinigung erfolgte mittels RP₈-Säulenchromatographie mit Wasser/Dioxan (Gradient: 10:1, 6:1, 3:1, 1,5:1, 1:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als gelblicher Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 0,32 g (44 % d. Th.)

Smp. Erweichen ab 180°C, geschmolzen ab 240°C

$[\alpha]_D^{25}$ - 398,6 (c = 2) DMF

Massenspektrum FAB (m/z, rel. Int.): 917,0 (10,0 %) [M+H]⁺, 939,0 (10,4 %) [M+Na⁺]

¹H-NMR [500 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ 2,09 (Aceton), 2,11 (s, 3H, AcetylCH₃), 2,12 (s, 3H, AcetylCH₃), 2,22 (m, 2H, HypH(β)), 2,35 (m, 1H, AproH(β)), 2,59 (m, 1H, AproH(β)), 2,80 (m, 2H, HypH(β)), 3,42 (m, 1H, AproH(δ)), 3,71 (m, b, 1H, HypH(δ)), 3,74 (m, b, 1H, HypH(δ)),

3,81 (m, 1H, HypH(δ)), 3,84 (m, 1H, HypH(δ)), 4,00 (m, 1H, AproH(δ)), 4,06 (m, 1H, AproH(γ)), 5,05 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H, CH₂(Z)), 5,09 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H, CH₂(Z)), 5,31 (m, 2H, HypH(γ)), 5,49 (m, 1H, AproH(α)), 5,69 (m, 1H, HypH(α)), 5,77 (m, b, 1H, HypH(α)), 7,13 (d, $^3J = 8,2$ Hz, 1H, ApaH(3)), 7,18 (d, $^3J = 8,2$ Hz, 1H, ApaH(3)), 7,25 (d, $^3J = 8,2$ Hz, 1H, ApaH(3)), 7,37 (m, 5H, PhenylH), 7,44 (dd, $^3J = 7,6$ Hz, $^3J = 2,5$ Hz, 2H, ApaH(5)), 7,49 (d, $^3J = 7,6$ Hz, 1H, ApaH(5)), 7,70 (m, 4H, ApaH(4) + NH(Z)), 9,71 (s, 1H, -NH-), 9,76 (s, 1H, -NH-), 9,81 (s, 1H, -NH-)

¹³C-NMR [125 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ 21,3 + 21,4 (AcetylCH₃), 37,99 + 38,1 (HypC(β) + AproC(β)), 47,9 (AproC(γ)), 52,3 (AproC(δ)), 54,1 + 54,3 (HypC(δ)), 60,7 + 60,9 + 61,0 (HypC(α) + AproC(α)), 65,9 (CH₂(Z)), 71,4 + 71,6 (HypC(γ)), 116,6 + 116,8 (ApaC(3)), 120,1 + 120,3 (ApaC(5)), 128,3 + 128,3 + 128,8 (ZC(B) + ZC(C) + ZC(D)), 137,2 (ZC(A)), 139,3 + 139,4 + 139,5 (ApaC(4)), 148,7 + 148,7 + 148,9 (ApaC(2)), 151,6 + 151,7 + 152,1 (ApaC(6)), 156,2 (ZCO), 166,4 + 166,8 (ApaCO), 171,4 + 170,5 (HypCO + AproCO), 170,9 + 171,2 (COCH₃)

IR (KBr) cm⁻¹ 3400 (w), 2958 (w), 1707 (s), 1637 (s), 1575 (s), 1534 (s), 1466 (s), 1422 (s), 1401 (s), 1301 (m), 1245 (s), 1158 (m), 1063 (m), 995 (w), 903 (w), 824 (w), 761 (m)

C, H, N
ber C: 58,49 % H: 5,05 % N: 14,67 %
gef C: 58,51 % H: 4,91 % N: 14,49 % F_w: 954,95
C₄₅H₄₄N₁₀O₁₂ · ½ C₃H₆O · ½ H₂O

f) Z-Entschützung des Cyclopeptids *cyclo*{[(Ac-Hyp)-Apa]₂-[(Z-Apro)-Apa]}. 339 mg (0,37 mmol) Cyclopeptid *cyclo*{[(Ac-Hyp)-Apa]₂-[(Z-Apro)-Apa]} **68** wurden analog der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Z-Schutzgruppe unter Zusatz von einem Äquivalent Salzsäure umgesetzt.

g) Ankuppeln des Dansylfarbstoffs zum Cyclopeptid *cyclo*{[(Ac-Hyp)-Apa]₂-[(Dansyl-Apro)-Apa]}. Das Rohprodukt der Z-Entschützung wurde mit 110 mg (0,41 mmol) Dansylchlorid in trockenem Methylenchlorid gelöst. Nach Zugabe von 161 µl (0,93 mmol) DIEA ließ man die Lösung 5 Tage bei Raumtemperatur rühren. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Vorreinigung mit einer Kieselgelsäule mit Aceton als Eluens wurde das Produkt nach chromatographischer Reinigung mittels einer RP₈-Säule mit Wasser/Dioxan (10:1, 5:1, 2:1, 1:1) als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 154 mg (41 % d. Th.)

Smp. Schmelzbereich: 196-225°C

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ - 399,8 (c = 1) DMF

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 1016,4 [M+H]⁺, 1038,4 [M+Na]⁺, 1054,3 [M+K]⁺

¹H-NMR [500 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 2,11 (s, 6H, AcCH₃), 2,21 (m, 4H, ProH(β)), 2,60 (m, 2H, ProH(β)), 2,78 (m, 1H, ProH(β)), 3,21 (m, 1H, ProH(δ)), 3,61 (m, 1H, ProH(δ)), 3,70 (m, 3H, 2 ProH(δ) + ProH(γ)), 3,81 (m, 2H, ProH(δ)), 5,29 (m, 2H, ProH(γ)), 5,47 (m, 1H, ProH(α)), 5,63 (m, 1H, ProH(α)), 5,70 (m, 1H, ProH(α)), 7,11 (d, ³J = 8,2 Hz, 1H, ApaH(5)), 7,14 (d, ³J = 8,1 Hz, 2H, ApaH(5)), 7,23 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, (AproNH)), 7,36 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, ApaH(3)), 7,42 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, ApaH(3)), 7,47 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, ApaH(3)), 7,56 (t, ³J = 7,9 Hz, ³J = 8,2 Hz, 1H, DansylH), 7,61 (t, ³J = 7,3 Hz, ³J = 8,5 Hz, 1H, DansylH), 7,72 (m, 3H, ApaH(4)), 8,14 (d, ³J = 2,2 Hz, 1H, DansylH), 8,30 (d, ³J = 8,5 Hz, 1H, DansylH), 8,45 (t, ³J = 6,3 Hz, ³J = 8,2 Hz, 2H, DansylH), 9,64 (s, 1H, -NH-), 9,68 (s, 1H, -NH-), 9,76 (s, 1H, -NH-)

^{13}C -NMR	[125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , 25°C] δ [ppm] 21,3 + 21,4 (AcCH ₃), 38,0 + 38,1 + 38,4 (HypC(β) + AproC(β)), 45,4 (DansylCH ₃), 49,7 (AproC(γ)), 52,4 (AproC(δ)), 54,1 + 54,3 (HypC(δ)), 60,6 + 60,8 + 60,9 (HypC(α) + AproC(α)), 71,4 + 71,6 (HypC(γ)), 115,5 (DansylC), 116,4 + 116,6 + 116,8 (ApaC(3)), 119,2 + 120,1 + 120,2 (ApaC(5)), 124,1 + 128,3 + 129,0 + 129,3 + 129,4 + 130,2 + 135,9 (DansylC), 139,4 + 139,5 (ApaC(4)), 148,7 + 148,7 + 148,7 (ApaC(2)), 151,5 + 151,7 + 151,8 + 152,0 (ApaC(6) + DansylC), 166,3 + 166,4 + 166,8 (ApaCO), 170,4 + 170,5 + 170,5 + 170,8 + 171,0 (HypCO + AproCO + AcCO)
IR	[KBr] cm ⁻¹ 3256 (w), 1742 (s), 1707 (s), 1638 (s), 1575 (s), 1527 (m), 1464 (s), 1400 (s), 1303 (m), 1241 (s), 1145 (m), 1063 (m), 1016 (w), 906 (w), 823 (w), 792 (w), 760 (w)
C, H, N	ber C: 56,91 % H: 4,97 % N: 14,90 % gef C: 57,11 % H: 4,89 % N: 14,77 % M _w : 1034.08 $\text{C}_{49}\text{H}_{49}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$

h) Entfernen der Acetylgruppen zum Cyclopeptid *cyclo*{[Hyp-Apa]₂-[(Dansyl-Apro)-Apa]} 69. Das gesamte Cyclopeptid der vorherigen Reaktion (154 mg, 0,17 mmol) wurde in 30 ml Methylenchlorid/Methanol (1:1) gelöst, mit 53 µl (0,30 mmol) DIEA versetzt und 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Aceton gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als gelber, kristalliner Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 98 mg (69 % d. Th.)

Smp. Schmelzbereich 224-246°C

$[\alpha]_D^{25}$ -454,5 (c = 1) DMF

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 932,3 [M+H]⁺, 954,3 [M+Na]⁺, 970,3 [M+K]⁺

¹H-NMR [500 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 1,95 (m, 2H, ProH(β)), 2,09 (m, 1H, ProH(β)), 2,50 (m, 2H, ProH(β)), 2,59 (m, 1H, ProH(β)), 2,81 (s, 6H, DansylCH₃), 3,28 (m, 1H, ProH(δ)), 3,59 (s, 1H, -OH), 3,61 (s, 1H, -OH), 3,63 (m, 4H, 3 ProH(δ) + ProH(γ)), 4,34 (m, 2H, ProH(δ)), 5,26 (m, 2H, ProH(γ)), 5,54 (m, 1H, ProH(α)), 5,62 (m, 2H, ProH(α)), 7,07 (d, ³J = 8,2 Hz, 1H, ApaH(5)), 7,10 (d, ³J = 8,2 Hz, 1H, ApaH(5)), 7,13 (d, ³J = 8,2 Hz, 1H, ApaH(5)), 7,22 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, AproNH), 7,37 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, ApaH(3)), 7,39 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, ApaH(3)), 7,43 (d, ³J = 7,6 Hz, 1H, ApaH(3)), 7,57 (t, ³J = 8,2 Hz, 1H, DansylH), 7,60 (t, ³J = 7,5 Hz, ³J = 8,2 Hz, 1H, DansylH), 7,71 (m, 3H, ApaH(4)), 8,14 (d, ³J = 6,3 Hz, 1H, DansylH), 8,30 (d, ³J = 8,9 Hz, 1H, DansylH), 8,46 (d, ³J = 8,2 Hz, 1H, DansylH), 8,48 (d, ³J = 5,7 Hz, 1H, DansylH), 9,53 (s, 1H, -NH-), 9,59 (s, 1H, -NH-), 9,62 (s, 1H, -NH-)

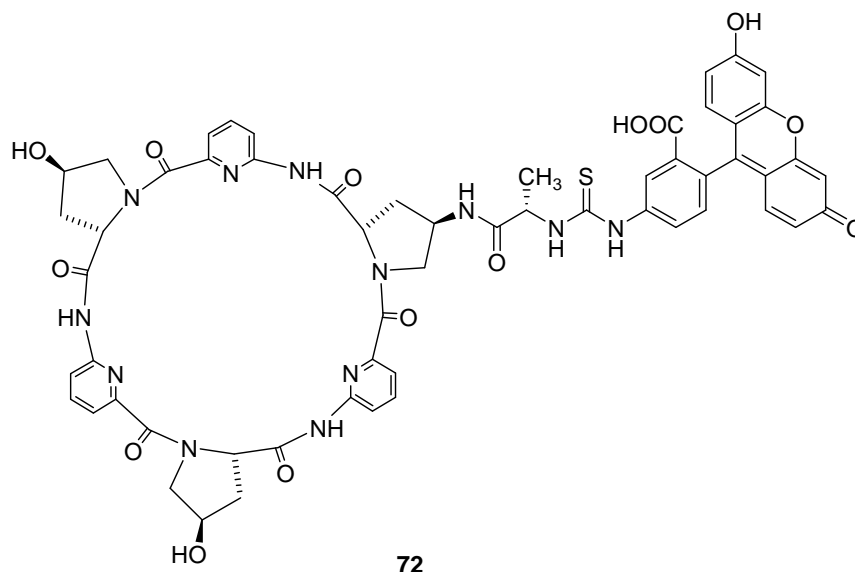
¹³C-NMR [125 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 38,47 (AproC(β)), 41,0 (HypC(β)), 45,4 (DansylCH₃), 49,9 (AproC(γ)), 52,7 (AproC(δ)), 56,8 + 56,9 (HypC(δ)), 60,6 (AproC(α)), 61,1 + 61,2 (HypC(α)), 67,2 + 67,4 (HypC(γ)), 115,5 (DansylC), 116,3 + 116,5 + 116,8 (ApaC(3)), 119,2 +

120,1 + 120,2 + 120,2 (ApaC(5) + DansylC), 124,1 + 128,3 + 129,0 + 129,3 + 129,4 + 130,+ 135,9 (DansylC), 139,3 + 139,3 + 139,4 (ApaC(4)), 148,6 +148,7 (ApaC(2)), 151,6 + 151,8 + 152,2 + 152,3 (ApaC(6) + DansylC), 166,2 + 166,4 + 166,5 (ApaCO), 170,9 + 171,5 + 171,5 (HypCO + AproCO)

IR [KBr] cm^{-1} 3370 (m), 3250 (m), 1701 (m), 1627 (s), 1574 (s), 1535 (s), 1466 (s), 1428 (s), 1402 (s), 1302 (m), 1145 (m), 1081 (m), 995 (w), 824 (w), 793 (w), 762 (m), 627 (m)

C, H, N
ber C: 55,84 % H: 5,10 % N: 15,92 %
gef C: 55,97 % H: 4,90 % N: 16,04 % M_w : 968,02
 $\text{C}_{45}\text{H}_{45}\text{N}_{11}\text{O}_{10}\text{S} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

4.12. VERSUCHE ZUR SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS *CYCLO*{[HYP-APA]₂-[(FLUORESCHEIN-ALA-APRO)-APA]}



a) Darstellung des Hexapeptids Boc-[Hyp-APA]₂-[(Z-Ala-Apro)-Apro]-OAll

Benzyl-Entschützung. 1,74 g (2,30 mmol) des Tetrapeptids Boc-[(Ac-Hyp)-Apro]₂-OBn wurden in 100 ml 1,4-Dioxan/Wasser (9:1) gelöst. Nach Zugabe von 130 mg Pd/C (10 %) wurde die Lösung über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck gerührt. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators über Celite wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand im Exsikkator getrocknet.

Boc-Entschützung. 1,37 g (2,3 mmol) des Dipeptids Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apro]-OAll **20** wurden in 25 ml trockenem Dioxan mit 50 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Kupplung. Das Benzyl-entschützte Tetrapeptid und das Boc-entschützte Dipeptid wurden zusammen mit 0,89 g (2,76 mmol) TBTU in 60 ml DMF p.A. gelöst. Nach Zugabe von 1,76 ml (10,12 mmol) DIEA wurde die Lösung zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde sie auf 700 ml Wasser gegossen. Der pH-Wert wurde mit 1 N Salzsäure auf etwa 4 eingestellt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 1,98 g (75 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 1146,6 [M+H]⁺, 1168,5 [M+Na]⁺, 1184,5 [M+K]⁺

b) Cyclisierung zum Cyclopeptid *cyclo*{[(Ac-Hyp)-Apa]₂-[(Z-Ala-Apro)-Apa]} 71

Allyl-Entschützung. 1,98 g (1,73 mmol) Boc-[(Ac-Hyp)-Apa]₂-[(Z-Ala-Apro)-Apa]-OAll wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Allyl-Entschützung umgesetzt.

Boc-Entschützung. Das gesamte Allyl-entschützte Hexapeptid wurde anschließend analog der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Cyclisierung. Nach dreimaligem Sekurieren von 1,62 g (5,05 mmol) HBTU wurde das Kupplungsreagenz in 200 ml entgastem DMF p.A. gelöst. Nach der Zugabe von 0,26 ml (1,52 mmol) DIEA wurde bei 80°C mit Hilfe eines Perfusors über einen Zeitraum von 4 Stunden eine Lösung aus 1,00 g (1,01 mmol) vollständig entschützten Hexapeptid H-[Hyp-Apa]₂-[(Z-Ala-)Apro-Apa]-OH und 1,05 ml (6,06 mmol) DIEA in 40 ml entgastem DMF p.A. zugetropft. Nach vollendeter Zugabe wurde der pH-Wert mit 0,50 ml DIEA auf pH 9 eingestellt und es wurde eine weitere Stunde bei 80°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde auf einer Kieselgelsäule mit Aceton als Laufmittel vorgereinigt. Eine weitere Reinigung erfolgte mittels RP₈-Säulenchromatographie mit Wasser/Dioxan (10:1, 5:1, 2:1, 1:1). Der resultierende, schwach gelbe Feststoff wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 147 mg (31 % d. Th.)

Smp. Schmelzbereich 173-197°C

$[\alpha]_D^{25}$ 349,2 (c = 1) DMF

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 988,3 [M+H]⁺, 1010,2 [M+Na]⁺, 1026,2 [M+K]⁺

¹H-NMR [500 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 1,21 (d, ³J = 6,9 Hz, 3H, AlaCH₃), 2,08 (s, 3H, AcetylCH₃), 2,10 (s, 3H, AcetylCH₃), 2,22 (m, 3H, HypH(β) + AproH(β)), 2,32 (m, 1H, AproH(β)), 2,73 (m, 1H, HypH(β)), 2,79 (m, 1H, HypH(β)), 3,35 (H₂O + AproH(δ) + AlaH(α)), 3,58 (m, 1H, AproH(δ)), 3,69 (m, 1H, HypH(δ)), 3,72 (m, 1H, HypH(δ)), 3,79 (m, 1H, HypH(δ)), 3,82 (m, 1H, HypH(δ)), 4,00 (m, 1H, HypH(γ)), 4,06 (m, 1H,

HypH(γ), 4,24 (m, 1H, AproH(γ)), 5,01 (dd, $^2J = 12,3$ Hz, $^2J = 22,4$ Hz, 2H, CH₂(Z)), 5,52 (m, 1H, HypH(α)), 5,61 (m, 1H, HypH(α)), 5,72 (m, 1H, AproH(α)), 7,13 (d, $^3J = 8,1$ Hz, 1H, ApaH(3)), 7,15 (d, $^3J = 8,2$ Hz, 1H, ApaH(3)), 7,22 (d, $^3J = 8,2$ Hz, 1H, ApaH(3)), 7,34 (m, 5H, PhH), 7,44 (m, 4H, ApaH(4) + AproNH), 7,75 (m, 3H, ApaH(5)), 8,31 (d, $^2J = 6,9$ Hz, 1H, AlaNH), 9,71 (s, 1H, -NH-), 9,73 (s, 1H, -NH-), 9,78 (s, 1H, -NH-)

¹³C-NMR [125 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] 18,7 (AlaCH₃), 21,3 + 21,4 (AcetylCH₃), 37,9 + 38,0 + 38,1 (HypC(β) + AproC(β)), 46,0 (AproC(γ)), 50,3 (AproC(δ)), 54,1 + 54,2 (HypC(δ)), 60,7 + 60,9 + 61,0 (HypC(α) + AproC(α)), 65,7 (CH₂(Z)), 66,7 (AlaC(α)), 71,4 + 71,6 (HypC(γ)), 116,5 + 116,7 (ApaC(3)), 120,1 + 120,2 + 120,3 (ApaC(5)), 128,1 + 128,2 + 128,7 (ZC(2) + ZC(3) + ZC(4)), 137,3 (ZC(1)), 139,4 + 139,5 (ApaC(4)), 148,6 + 148,7 + 148,9 (ApaC(2)), 151,7 + 151,8 + 151,9 (ApaC(6)), 156,0 (ZCO), 166,5 + 166,5 + 166,7 (ApaCO), 170,4 + 170,5 + 170,6 (HypCO + AproCO), 170,8 + 171,2 (AcetylCO), 173,0 (AlaCO)

IR [KBr] cm⁻¹ 3450 (m), 3250 (m), 1703 (s), 1628 (s), 1574 (s), 1541 (s), 1467 (s), 1426 (s), 1402 (s), 1301 (m), 1250 (s), 1065 (m), 1019 (w), 994 (w), 824 (w), 762 (m)

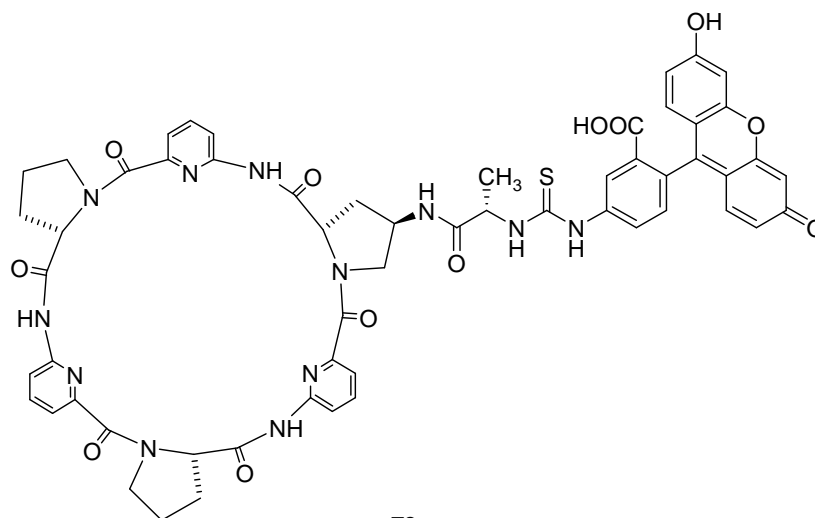
C, H, N
ber C: 54,39 % H: 5,42 % N: 14,53 %
gef C: 54,19 % H: 5,24 % N: 14,49 % M_w: 1060,04
C₄₈H₄₉N₁₁O₁₃ · 4 H₂O

c) Ankuppeln des Fluoresceinfarbstoffs

Z-Entschützung. 95 mg (0,10 mmol) vom Cyclopeptid *cyclo*{[(Ac-Hyp)-Apa]₂-(Z-Apro)-Apa}**72** wurden analog der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Z-Schutzgruppe ohne Zugabe von Salzsäure umgesetzt.

Versuche zum Ankuppeln des Farbstoffs und Abspalten der Acetylgruppen zur Darstellung von 72. Das Z-entschützte Cyclopeptid und 67 mg (0,16 mmol) Fluoresceinisothiocyanat wurden in 5 ml DMF z.S. nach Zugabe von 90 µl (0,52 mmol) DIEA über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von 5 ml Methanol und 210 µl (0,21 mmol) 1 N Natronlauge wurde die Lösung fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Umsetzung wurde massenspektrometrisch verfolgt. Weitere Zugabe von Natronlauge und längere Reaktionszeiten änderten wenig am Umsatz. Das Produkt konnte auch nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung oder Umkristallisation nicht analysenrein erhalten werden.

4.13. VERSUCHE ZUR SYNTHESE DES CYCLOPEPTIDS $CYCLO\{[PRO-APA]_2-[(FLUORESC EIN-ALA-APRO)-APA]\}$



73

a) Synthese des Hexapeptids Boc-[Pro-Apa]₂-[(Z-Ala-Apro)-Apa]-OAll.

Allyl-Entschützung. 1,09 g (1,84 mmol) Tetrapeptid Boc-[Pro-Apa]₂-OAll (Darstellung siehe 4.9) wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Allyl-Entschützung umgesetzt.

Boc-Entschützung. 1,09 g (1,84 mmol) Dipeptid Boc-[(Z-Ala-Apro)-Apa]-OAll **20** wurden in 15 ml trockenem Dioxan mit 30 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Kupplung. Das Allyl-entschützte Tetrapeptid und das Boc-entschützte Dipeptid wurden anschließend zusammen mit 0,84 g (2,21 mmol) TBTU in 60 ml DMF z.S. gelöst und nach Zugabe von 1,34 ml (7,73 mmol) DIEA zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf 600 ml Wasser gegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl auf 4 eingestellt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Exsikkator über P₄O₁₀ getrocknet. Der trockene Feststoff wurde dann säulenchromatographisch mit Methylchlorid/Methanol (10:1) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1,03 g (54 % d. Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 1030,0 [M+H]⁺, 1052,0 [M+Na]⁺, 1067,9 [M+K]⁺

b) Synthese des Cyclopeptids *cyclo*{[Pro-Apa]₂-[(Z-Ala-Apro)-Apa]} 40.

Allyl-Entschützung. 0,50 g (0,50 mmol) des Hexapeptids Boc-[Pro-Apa]₂-[(Z-Ala-Apro)-Apa]-OAll wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift Allyl-entschützt.

Boc-Entschützung. Das Allyl-entschützte Hexapeptid wurden in 10 ml trockenem Dioxan mit 20 ml 6 N HCl in Dioxan nach der allgemeinen Vorschrift zur Boc-Entschützung umgesetzt.

Cyclisierung. Nach dreimaligem Sekurieren, wobei auf das Ausheizen verzichtet wurde, wurden 0,47 g (1,25 mmol) HBTU in 100 ml DMF z.S. gelöst und mit 0,13 ml (0,75 mmol) DIEA versetzt. Bei 80°C wurde ein Lösung aus dem vollentschützten Hexapeptid und 0,52 ml (3,00 mmol) DIEA in 20 ml DMF über einen Zeitraum von zwei Stunden mittels eines Perfusors hinzugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit 0,5 ml DIEA auf > 9 eingestellt und eine weitere Stunde bei 80°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Aceton vorgereinigt. Eine weitere Reinigung erfolgte mittels RP₈-Säulenchromatographie mit Wasser/Dioxan (10:1, 5:1, 2:1, 1:1). Das gelbliche Produkt wurde in wenig Methanol aufgenommen, in Wasser ausgefällt, abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 79 mg (18 % d. Th.)

Smp. Erweichen ab 141°C, Zersetzung > 185°C

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): 872,1 [M+H]⁺, 894,0 [M+Na]⁺, 910,0 [M+K]⁺

¹H-NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C] δ [ppm] 1,21 (d, ³J = 6,9 Hz, 3H, AlaCH₃), 1,83 (m, 4H, ProH(γ)), 1,97 (m, 1H, ProH(β)), 2,05 (m, 1H, ProH(β)), 2,26 (m, 1H, AproH(β)), 2,54 (m, 3H, ProH(β) + AproH(β)), 3,44 (m, 1H, AproH(δ)) 3,58 (m, 2H, ProH(δ)), 3,69 (m, 2H, ProH(δ)), 3,95 (m, 1H, AproH(δ)), 4,08 (m, 1H, AproH(γ)) 4,24 (m, 1H, AlaH(α)), 5,01 (dd, ²J = 12,3 Hz, ²J = 17,9 Hz, 2H, CH₂(Z)), 5,55 (m, 1H, AproH(α)), 5,62 (m, 1H, ProH(α)), 5,67 (m, 1H, ProH(α)), 7,16 (t, ³J = 8,5 Hz, ³J = 10,2 Hz, 2H, ApaH(3)), 7,23 (d, ³J = 8,6 Hz, 1H, ApaH(3)), 7,34 (m, 5H,

PhH), 7,44 (m, 4H, ApaH(4) + AproNH), 7,73 (m, 3H, ApaH(5)), 8,34 (d, $^2J = 6,8$ Hz, 1H, AlaNH), 9,44 (s, 1H, -NH-), 9,53 (s, 1H, -NH-), 9,68 (s, 1H, -NH-)

$^{13}\text{C-NMR}$ [151 MHz, DMSO- d_6 , 25°C] δ [ppm] 18,9 (AlaCH₃), 22,8 (ProC(γ)), 32,9 + 33,0 (ProC(β)), 38,3 (AproC(β)), 46,4 (AproC(γ)), 48,5 + 48,6 (ProC(δ)), 50,4 (AproC(δ)), 60,9 (AproC(α)), 61,9 + 62,0 (ProC(α)), 65,9 (AlaC(α) + CH₂(Z)), 116,2 + 116,3 + 117,0 (ApaC(3)), 120,2 + 120,2 + 120,6 (ApaC(5)), 128,3 + 128,3 + 128,8 (ZC(2) + ZC(3) + ZC(4)), 137,4 (ZC(1)), 139,4 + 139,5 + 139,6 (ApaC(4)), 148,8 + 149,9 (ApaC(2)), 152,1 + 152,4 (ApaC(6)), 156,2 (ZCO), 166,1 + 166,4 + 166,5 (ApaCO), 171,2 + 171,4 + 171,7 (ProCO + AproCO), 173,2 (AlaCO)

IR [KBr] cm^{-1} 3282 (m), 2978 (w), 1706 (s), 1625 (s), 1574 (s), 1534 (s), 1466 (s), 1426 (s), 1400 (s), 1343 (m), 1300 (s), 1256 (m), 1158 (m), 1084 (w), 993 (w), 822 (w), 761 (m)

C, H, N
 ber C: 54,95 % H: 5,76 % N: 16,02 %
 gef C: 55,10 % H: 5,76 % N: 15,99 % M_w : 961,99
 $\text{C}_{44}\text{H}_{45}\text{N}_{11}\text{O}_9 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

c) Versuche zum Einführen des Farbstoffs.

Z-Entschützung des Cyclopeptids. 44 mg (0,05 mmol) Cyclopeptid *cyclo*{[Pro-Apa]₂-[(Z-Ala-Apro)-Apa]} **40** wurden analog der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Z-Schutzgruppe ohne Zugabe von Salzsäure umgesetzt.

Ankuppeln von Fluoresceinisothiocyanat zum Cyclopeptid *cyclo*{[Pro-Apa]₂-[(Fluorescein-Ala-Apro)-Apa]} **73.** Das entschützte Cyclopeptid wurde zusammen mit 29 mg (0,075 mmol) Fluoresceinisothiocyanat in 5 ml DMF z.S. gelöst. Nach Zugabe von 17 µl (0,10 mmol) DIEA wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Eine DC-Kontrolle zeigte allerdings eine Vielfalt an Produkten an. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Methylenchlorid/Methanol (10:1) vorgereinigt. Anschließend wurde versucht, das Produkt mittels RP₈-Säulenchromatographie mit Wasser/Dioxan (10:1, 5:1, 2:1, 1:1) zu trennen. Jedoch konnte auf diese Weise kein sauberes Produkt isoliert werden.

E. LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Ac-	Acetyl-
H-Ala-OH (Ala-)	L-Alanin (L-Alanyl-)
All-	Allyl-
AllBr	3-Brom-1-propen
Apa	6-Aminopicolinsäure
Apro	(4 <i>R</i>)-Amino-L-prolin
Bn-	Benzyl-
Boc-	tert-Butoxycarbonyl-
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
d	Duplett (¹ H-NMR)
Dansyl-	5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonyl-
DC	Dünnschichtchromatographie
DIEA	Diisopropylethylamin
DiPrAD	Diisopropylazadicarboxylat
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
EI-MS	Elektronenstoßmassenspektrometrie (electron impact)
ESI-MS	Elektrosprayionisationsmassenspektrometrie
Et ₃ SiH	Triethylsilan
FAB	fast atom bombardement, Massenspektrometrie
HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium- hexafluorophosphat
HPLC	High performance liquid chromatography
Hyp	(4 <i>R</i>)-Hydroxy-L-prolin
Konz.	konzentriert
m	Multipllett (¹ H-NMR); mittelstarke Bande (IR)
MALDI	matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisationsmassenspektrometrie
Ms-Hyp	(4 <i>S</i>)-[(Methylsulfonyl)oxy]-L-prolin
M _w	Molekulargewicht
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p.A.	zur Analyse
ppm	parts per million

H-Pro-OH (Pro-)	L-Prolin (L-Prolinyl-)
PyCloP	Chlorotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
Py ₃ PO	Trispyrrolidinophosphinoxid
RP	Reversed Phase
s	Singulett (¹ H-NMR); starke Bande (IR)
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett (¹ H-NMR)
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TB-Pro	(4 <i>R</i>)-Benzoylthio-L-prolin-
TBTU	<i>O</i> -(1H-Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat
THF	Tetrahydrofuran
Ts-	<i>p</i> -Toluolsulfonyl-
w	schwache Bande (IR)
Z-	Benzyloxycarbonyl-
z.S.	zur Synthese
ZCl	Benzylchlorformiat

F. LITERATUR

- [1] *Roempp Online; Version 2.12* **2007**, www.roempp.com
- [2] *Wikipedia - Die freie Enzyklopädie* **2007**, www.wikipedia.de
- [3] K.C. Nicolaou; C.N.C. Boddy; S. Bräse; N. Winssinger *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2230-2287; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2096-2152
- [4] D.H. Williams; B. Bardsley *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1264-1286; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 1172-1193
- [5] S. Borman In *Chemical & Engineering News*, **2006**; Vol. 84, p 15.
- [6] R.B. Silverman *Medizinische Chemie für Organiker, Biochemiker und pharmazeutische Chemiker*; VCH: Weinheim, **1995**.
- [7] L. Stryer *Biochemie, 4. Aufl., 1. korr. Nachdruck*; Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg, Berlin, **1999**.
- [8] K. Munk *Grundstudium Biologie: Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution*; Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg, **2000**.
- [9] D.H. Williams; J.P. Waltho *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 133-141
- [10] D.H. Williams; M.S. Searle; M.S. Westwell; U. Gerhard; S.E. Holroy *Phil. Trans. R. Soc. London A* **1993**, *134*, 11-21
- [11] M. Nieto; H.R. Perkins *Biochem. J.* **1971**, *123*, 773
- [12] C.T. Walsh; S.L. Fisher; I.-S. Park; M. Prahalad; Z. Wu *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 21-28
- [13] P.H. Axelsen; D. Li *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 877-881
- [14] C.C. McComas; B.M. Crowley; D.L. Boger *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9314-9315
- [15] J. Rao; G.M. Whitesides *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10286-10290
- [16] A. van de Kerk-van Hoof; A.J.R. Heck *J. Antimicrob. Chemother.* **1999**, *44*, 593-599
- [17] T.J.D. Jorgensen; T. Staroske; P. Roepstorff; D.H. Williams; A.J.R. Heck *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 1859-1863
- [18] N.-H. Yao; W.-Y. He; K.S. Lam; G. Liu *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 123-129
- [19] M. Rekharsky; D. Heseck; M. Lee; S.O. Meroueh; Y. Inoue; S. Mobashery *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7736-7737
- [20] S. Weist; B. Bister; O. Puk; D. Bischoff; S. Pelzer; G.J. Nicholson; W. Wohlleben; G. Jung; R.D. Süßmuth *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3531-3534; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 3383-3385
- [21] J. Rao; J. Lahiri; L. Isaacs; R.M. Weis; G.M. Whitesides *Science* **1998**, *280*, 708-711

-
- [22] R. Xu; G. Greiveldinger; L.E. Marenus; A. Cooper; J.A. Ellman *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4898-4899
- [23] R.K. Jain; J. Trias; J.A. Ellman *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8740-8741
- [24] B.M. Crowley; D.L. Boger *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2885-2892
- [25] R.J. Pieters *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 7541-7545
- [26] H.T. ten Brink; D.T.S. Rijkers; R.M.J. Liskamp *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1817-1824
- [27] H. Herzner; T. Reipen; M. Schultz; H. Kunz *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495-4537
- [28] A. Casnati; M. Fabbi; N. Pelizzi; A. Pochini; F. Sansone; R. Ungaro *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2699-2704
- [29] J. Sheperd; T. Gale; K.B. Jensen; J.D. Kilburn *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 713-720
- [30] C. Schmuck; M. Heil *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1339-1348
- [31] C. Schmuck; P. Wich *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4383-4387; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 4277-4281
- [32] L. Frish; F. Sansone; A. Casnati; R. Ungaro; Y. Cohen *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5026-5030
- [33] G. Arena; A. Casnati; A. Contino; A. Magri; F. Sansone; D. Sciotto; R. Ungaro *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 243-249
- [34] B. Dietrich; T.M. Fyles; J.-M. Lehn; L.G. Pease; D.L. Fyles *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 943-963
- [35] F.P. Schmidtchen *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 4493-4496
- [36] B. Linton; A.D. Hamilton *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6027
- [37] G. Hennrich; E.V. Anslyn *Chem.-Eur. J.* **2002**, *8*, 2219-2224
- [38] C. Schmuck *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 709-718
- [39] C. Schmuck; L. Geiger *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8898-8899
- [40] C. Schmuck; M. Heil; J. Scheiber; K. Baumann *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7374-7379; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 7208-7212
- [41] M.C.F. Monnee; J. Brouwer; L.M. Verbeek; A.M.A. van Wageningen; R.M.J. Liskamp *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1521-1525
- [42] T. Opatz; R.M.J. Liskamp *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3499-3502
- [43] C. Chamorro; J.W. Hofman; R.M.J. Liskamp *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8691-8697
- [44] M.C.F. Monnee; J. Brouwer; R.M.J. Liskamp *QSAR & Combinatorial Science* **2004**, *23*, 546-559
- [45] H. Wennemers; M. Conza; M. Nold; P. Krattiger *Chem. Eur. J.* **2001**, *5*, 3342-3347
- [46] M. Conza; H. Wennemers *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2696-2698
-

-
- [47] H. Wennemers; M. Nold; M.M. Conza; K.J. Kulicke; M. Neuburger *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 442-448
- [48] P. Krattiger; H. Wennemers *Synlett* **2005**, 706-708
- [49] M.W. Peczu; A.D. Hamilton *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479-2494
- [50] S. Kubik; R. Goddard; R. Kirchner; D. Nolting; J. Seidel *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2722-2725; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2648-2651
- [51] S. Kubik; R. Goddard *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 5127-5132
- [52] S. Kubik; R. Kirchner; D. Nolting; J. Seidel *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12752-12760
- [53] S. Kubik; R. Goddard; S. Otto; S. Pohl; C. Reyheller; S. Stüwe *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *20*, 2364-2375
- [54] S. Kubik; C. Reyheller; S. Stüwe *J. Incl. Phenom. Macro.* **2005**, *52*, 137-187
- [55] S. Stüwe *Diplomarbeit*; Heinrich-Heine-Universität: Düsseldorf, **2002**.
- [56] T. Rosen; S.W. Fesik; D.T.W. Chu; A.G.J. Pernet *Synthesis* **1988**, *8*, 40-44
- [57] T. Rosen; I.M. Lico; D.T.W. Chu *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1580-1582
- [58] T. Rosen; D.T.W. Chu; I.M. Lico; P.B. Fernandes; K. Marsh; L. Shen; V.G. Cepa; A.G.J. Pernet *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1598-1611
- [59] N. Shangguan; S. Katukojvala; R. Greenberg; L.J. Williams *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7754-7755
- [60] M. Tamaki; G. Han; V.J. Hruby *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1038-1042
- [61] N.G. Anderson; D.A. Lust; K.A. Colapret; J.H. Simpson; M.F. Malley; J.Z. Gougoutas *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7955-7958
- [62] L.-S. Sonntag *Laborjournal Arbeitsgruppe H. Wennemers, Basel*
- [63] R.L. Shriner; A.H. Land *J. Org. Chem.* **1941**, *6*, 888-894
- [64] T. Shiba; K. Miyoshi; S. Kusumoto *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 254-257
- [65] H.J. Backer; H. Mulder *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1933**, *52*, 454-468
- [66] P. Job *Compet. Rend.* **1925**, *180*, 928
- [67] K.A. Connors *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*; Wiley: New York, **1987**.
- [68] M.T. Blanda; J.H. Horner; M. Newcomb *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4626-4636
- [69] C.S. Wilcox In *Frontiers in Supramolecular Chemistry and Photochemistry*; Schneider, H.-J., Dürr, H., Eds.; VCH: Weinheim, **1991**.
- [70] H.-J. Schneider; R. Kramer; S. Simova; U. Schneider *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6442-6448
-

-
- [71] L. Fielding *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6151-6170
- [72] I. Wadsö *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 79-86
- [73] M.J. Cliff; A. Gutierrez; J.E. Ladbury *J. Mol. Recognit.* **2004**, *17*, 513-523
- [74] A. Ababou; J.E. Ladbury *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19*, 79-89
- [75] *VP-ITC MicroCalorimeter User's Manual*; MicroCal, LLC: Northhampton, MA.
- [76] W.B. Turnbull; A.H. Daranas *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14859-14866
- [77] J. Tellinghuisen *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 20027-20035
- [78] F.P. Schmidtchen *Org. Lett.* **2002**, *4*, 431-434
- [79] J.L. Sessler; D.E. Gross; W.-S. Cho; V.M. Lynch; F.P. Schmidtchen; G.W. Bates; M.E. Light; P.A. Gale *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12281-12288
- [80] S. Kubik *unveröffentlichte Ergebnisse*
- [81] A. Vacca; C. Nativi; M. Cacciarini; R. Pergoli; S. Roelens *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16456-16465
- [82] M.D. Lankshear; A.R. Cowley; P.D. Beer *Chem. Commun.* **2006**, 612-614
- [83] C. Richter *Diplomarbeit*; Technische Universität: Kaiserslautern, **2006**.
- [84] S.J. Brooks; P.A. Gale; M.E. Light *Chem. Commun.* **2006**, 4344-4346
- [85] S.M. Butterfield; J. Rebek Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15366-15367
- [86] J.-M. Lehn *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2455-2463
- [87] S. Otto *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **2003**, *6*, 509-520
- [88] J.K.M. Sanders *Phil. Trans. R. Soc. London A* **2004**, *362*, 1239-1245
- [89] P.T. Corbett; J. Leclaire; L. Vial; K.R. West; J.L. Wietor; J.K.M. Sanders; S. Otto *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652-3711
- [90] W.J. Lees; G.M. Whitesides *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 642-647
- [91] J.K.M. Sanders *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1378-1383
- [92] J.K.M. Sanders *Pure Appl. Chem.* **2000**, 2265-2274
- [93] S. Otto; R.L. Furlan; J.K.M. Sanders *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12063-12064
- [94] B. Brisig; J.K.M. Sanders; S. Otto *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1308-1311; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 1270-1273
- [95] S. Otto *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3357-3361
- [96] P.T. Corbett; L.H. Tong; J.K.M. Sanders; S. Otto *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8902-8903
- [97] S. Otto; S. Kubik *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7804-7805
- [98] Z. Rodriguez-Docampo; S.I. Pascu; S. Kubik; S. Otto *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11206-11210
-

-
- [99] A. Scarso; A. Shivanyuk; O. Hayashida; J. Rebek Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6239-6243
- [100] G.V. Oshovsky; D.N. Reinhoudt; W. Verboom *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2810-2816
- [101] S. Tashiro; M. Tominaga; M. Kawano; B. Therrien; T. Ozeki; M. Fujita *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4546-4547
- [102] D.A. Makeiff; J.C. Sherman *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12363-12367
- [103] X. Liu; Y. Liu; G. Li; R. Warmuth *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 915-918; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 901-904
- [104] K.R. West; K.D. Bake; S. Otto *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2615-2618
- [105] C. Reyheller *unveröffentlichte Ergebnisse*
- [106] A.J. Verbiscar; B. Witkop *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1924-1127
- [107] S. Kubik; S. Otto; C. Reyheller *unveröffentlichte Ergebnisse*
- [108] D.A. Swann; J.H. Turnbull *Tetrahedron* **1967**, *24*, 1441-1444
- [109] R. Cosstick; J.S. Vyle *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 4693-4696
- [110] X. Li; D.M. Andrews; R. Cosstick *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2729-2738
- [111] S. Moutel; J. Prandi *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 305-315
- [112] T. Wakmiya; T. Shimbo; T. Shiba; K. Nakajima; M. Neya; K. Okawa *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 3878-3881
- [113] R. Cosstick; J.S. Vyle *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 992-993
- [114] B. Strijtveen; R.M. Kellog *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5039-5054
- [115] V. Eswarakrishnan; L. Field *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4182-4187
- [116] Y. Berger; H. Dehmlow; D. Blum-Kaelin; E.A. Kitas; B.-M. Löffler; J.D. Aebi; L. Juillerat-Jeanneret *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 483-498
- [117] M. Li; K. Yamato; J.S. Ferguson; B. Gong *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12628-12629
- [118] A. Metzger; E.V. Anslyn *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 682-684; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 649-652
- [119] S.L. Wiskur; H. Ait-Haddou; J.J. Lavigne; E.V. Anslyn *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 963-972
- [120] B.T. Nguyen; E.V. Anslyn *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3118-3127
- [121] A.P. de Silva; H.Q.N. Gunaratne; T. Gunnlaugson; A.J.M. Huxley; C.P. McCoy; J.T. Rademacher *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515-1586
- [122] C. Suksai; T. Tuntulani *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 192-202
- [123] R. Martinez-Manez; F. Sancenon *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419-4476
- [124] A. Ueno *Supramol. Sci.* **1996**, *3*, 31-36
-

-
- [125] H. Ikeda; M. Nakamura; N. Ise; N. Oguma; A. Nacamura; T. Ikeda; F. Toda; A. Ueno *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10980-10988
- [126] H. Ikeda; T. Murayama; A. Ueno *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4262-4267
- [127] V. Amendola; L. Fabbrizzi; E. Monzani *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 76-82
- [128] B. Schazmann; N. Alhashimy; D. Diamond *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8607-8614
- [129] R. Nishiyabu; P. Anzenbacher *Org. Lett.* **2006**, *8*, 359-362
- [130] S.L. Wiskur; E.V. Anslyn *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10109-10110
- [131] J.J. Lavigne; E.V. Anslyn *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3212-3225; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 3118-3130
- [132] S.L. Wiskur; J.J. Lavigne; A. Metzger; S.L. Tobey; V. Lynch; E.V. Anslyn *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3792-3804
- [133] K. Niikura; A. Metzger; E.V. Anslyn *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8533-8534
- [134] A.T. Wright; E.V. Anslyn *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1341-1344
- [135] A.T. Wright; E.V. Anslyn; J.T. McDevitt *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17405-17411
- [136] J.H. Rothman; W.C. Still *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 509-512
- [137] J.J. Lavigne; E.V. Anslyn *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3903-3906; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 3666-3669
- [138] A.M. Piatek; Y.J. Bomble; S.L. Wiskur; E.V. Anslyn *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6072-6077
- [139] C.-T. Chen; H. Wagner; W.C. Still *Science* **1998**, *279*, 851-853
- [140] I. Hisaki; S. Sasaki; K. Hirose; Y. Tobe *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 607-615
- [141] T. Yvernault; G. Yvernault; J.C. Bollinger *C. R. Acad. Sci. Paris* **1978**, *287*, 519-521
- [142] J. Coste; E. Frerot; P. Jouin *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437-2446
- [143] H. Meyer *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1925**, *44*, 323-328
- [144] T.R. Kelly; F. Lang *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4623-4633
- [145] A. Janecka; T. Janecki; S. Shan; C. Bowers; F. Folkers *J. Med. Chem.* **1994**, *1994*, 2238-2241
- [146] D. Kubik *Laborjournal*; Heinrich-Heine-Universität: Düsseldorf.
- [147] M.M. Bowers-Nemia; M.M. Joullie *Heterocycles* **1983**, *20*, 817-828
- [148] J.A. Gomez-Vidal; R.B. Silverman *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2481-2484
- [149] M. Tamaki; G. Han; V.J. Hruby *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3593-3596

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Stefan Kubik, der es mir ermöglichte, dieses interessante Thema zu bearbeiten und mir stets mit hilfreichen Diskussionen motivierend zur Seite stand.

Des Weiteren möchte meinem Kollegen Carsten Reyheller für zahllose Diskussionen, für Kritik und Anregungen für die vorliegende Arbeit und die Unterstützung bei der Wiederaufnahme des Laborbetriebs in Kaiserslautern danken, sowie den weiteren aktuellen und ehemaligen Arbeitskollegen Thomas Fiehn, Martin Meng und Tine Richter in Kaiserslautern sowie Guido Heinrichs und Jochen Bitta in Düsseldorf für die produktive Zusammenarbeit.

Ebenso möchte ich den Arbeitskreisen von Herrn Prof. Dr. Ritter in Düsseldorf bzw. von Herrn Prof. Dr. J. Hartung in Kaiserslautern für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit danken.

Mein zusätzlicher Dank gilt auch Herrn P. Behm für die Aufnahme der NMR-Spektren, den Herren P. Tommes und R. Bürgel für die Aufnahme der Massenspektren und Frau I. Menzel für die Durchführung der IR Messungen an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, sowie Frau C. Müller für die zahlreichen NMR-Spektren und Frau B. Dusch für die Durchführung der C,H,N-Analysen an der Technischen Universität Kaiserslautern und zuletzt all denen, die ich hier namentlich vergessen habe, die aber ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die Finanzierung meiner Arbeit verdanke ich einem Rektoratsstipendium der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir mein Studium ermöglicht und mich immer in der ihnen möglichen Form unterstützt haben.

LEBENS LAUF

15.03.1978	Geboren in Krefeld-Hüls
August 1984 – Juni 1988	Gemeinschaftsgrundschule Oedt
August 1988 – Juni 1997	Gymnasium Liebfrauenschule Mülhausen
Juni 1997	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Oktober 1997 – Dezember 2002	Studium des Fachs Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Oktober 1999	Vordiplom im Fach Chemie
August 2000 – Juli 2001	Studium und Forschungsaufenthalt an der University of North Carolina at Chapel Hill, gefördert durch ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austausch Diensts
Dezember 2002	Diplom im Fach Chemie
Januar 2003	Beginn der Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bei Prof. Dr. S. Kubik
August 2003 – März 2005	Rektoratsstipendium der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
April 2005	Fortsetzung der Dissertation an der Technischen Universität Kaiserslautern
Seit April 2005	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
