

**Anionenrezeptoren
aus einfach und zweifach verbrückten
Bis(cyclopeptiden)**

Dissertation

genehmigt vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern zur
Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“

D 386



vorgelegt von

Carsten Reyheller

geboren in Langenfeld (Rhld.)

Betreuer: Prof. Dr. S. Kubik

Kaiserslautern, 2007

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. S. Kubik im Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Zeit von Januar 2003 bis Juli 2007 angefertigt.

Prüfungskommission

Vorsitzender Prof. Dr. S. Ernst

1. Gutachter Prof. Dr. S. Kubik

2. Gutachter Prof. Dr. L. Goßen

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2007

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

Ich erkläre außerdem, dass diese Arbeit weder in gleicher oder ähnlichen Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Kaiserslautern, den

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Kubik für die sehr interessanten Themen, die hervorragende Betreuung und die vielen hilfreichen Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Kollegin Sabine Stüwe für die zahlreichen Diskussion und für die Unterstützung bei der Wiederaufnahme des Laborbetriebs in Kaiserslautern bedanken, sowie den weiteren aktuellen und ehemaligen Arbeitskollegen Thomas Fiehn, Martin Meng, Tine Richter, Eugenia Petkova Eugenieva, Martin Krause, Astrid Schaly und Jakob Specht in Kaiserslautern sowie Guido Heinrichs und Joachim Bitta in Düsseldorf.

Weiterhin möchte ich mich bei Sijbren Otto, Matthieu Edmond, Zaida Rodríguez-Docampo, Ana Belenguer, Kevin West sowie Jean-Luc Wietor für die Unterstützung während meiner Aufenthalte in Cambridge, U.K., bei Ben Hay vom Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA für die theoretischen Berechnungen, sowie bei Noëlle Wrubbel und Patrick Caspers für ihre Unterstützung in der Zeit in Düsseldorf bedanken.

Ebenso möchte ich den Arbeitskreisen von Prof. Dr. H. Ritter in Düsseldorf, von Prof. Dr. J. K. M. Sanders in Cambridge, U.K., Prof. Dr. J. Hartung und Prof. Dr. L. Gooßen in Kaiserslautern für die freundliche Aufnahme und Unterstützung danken.

Für die Aufnahme von zahlreichen NMR-Spektren muss ich mich bei Peter Behm in Düsseldorf und Christiane Müller in Kaiserslautern bedanken wie auch bei Birgit Dusch, Elke Biehl und Markus Weiland von der Analytikabteilung des Fachbereichs Organische Chemie in Kaiserslautern für die Aufnahme der Elementaranalysen sowie für die Unterstützung bei chromatographischen Problemen und bei Anita Langutschenkov und Britta Pfeffer für die Aufnahme der ESI-MS Spektren. Ich möchte mich auch bei all jenen bedanken, die ich hier namentlich vergessen habe, die aber ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als letztes möchte ich Eva Werle für ihre Unterstützung und die ständige konstruktive Kritik an dieser Arbeit und meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung vor und während meines Studiums danken, ohne die diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.

Die Finanzierung dieser Arbeit verdanke ich einem Graduiertenstipendium des Cusanuswerks, Bischöfliche Studienstiftung.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- Kubik, S.; Goddard, R.; Otto, S.; Pohl, S.; Reyheller, C.; Stüwe, S., *Biosens. Bioelectr.* **2005**, *20*, 2374-2375.
- Reyheller, C; Hay, B. P.; Kubik, S., *New J. Chem.* **2007**, im Druck.
- Eine weitere Publikation bezüglich des Fluoreszenzsensors ist in Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Teil	10
2.1	Aufgabenstellung	10
2.2	Optimierung der Anionenaffinität von verbrückten Bis(cyclopeptiden)	13
2.2.1	Einfach verbrückte Bis(cyclopeptide)	13
2.2.1.1	Hintergrund	13
2.2.1.2	Synthesen	16
2.2.1.3	Ergebnisse	23
2.2.2	Zweifach verbrückte Bis(cyclopeptide)	49
2.2.2.1	Hintergrund	49
2.2.2.2	Synthesen	54
2.2.2.3	Ergebnisse	60
2.3	Sensoren	71
2.3.1	Ionenselektive Elektroden	71
2.3.1.1	Hintergrund	71
2.3.1.2	Eigene Arbeiten	75
2.3.2	Fluoreszenzsensor	81
2.3.2.1	Hintergrund	81
2.3.2.2	Synthesen	84
2.3.2.3	Ergebnisse	89
3	Zusammenfassung und Ausblick	101
4	Experimenteller Teil	105
4.1	Apparatives	105
4.2	Chemikalien	108
4.3	DCLs	111
4.4	Messungen	114
4.5	Synthesen	119
5	Literatur	161

Liste der verwendeten Abkürzungen

APA	6-Aminopicolinsäure
Apro	Aminoprolin
BisCP	Bis(cyclopeptid)
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
CP	Cyclopeptid
DAPD	4,4'-Diaminodimethyldiphensäure
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCL	dynamische kombinatorische Bibliothek
DIEA	Diisopropylethylamin
DPA	Diphensäure
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Dipeptid
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
HP	Hexapeptid
Hyp	Hydroxyprolin
ITC	Isotherme Titrations Kalorimetrie
NDP	4,4'-Dinitrodiphensäure
PDE	Phenylendiessigsäure
Pro	Prolin
PyCloP	Chlorotripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
SBz	Thiobenzoat
TBTU	O-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat
ThioAc	Thioacetat
Tos	Tosyl
TP	Tetrapeptid
Z	Benzyloxycarbonyl

1 Einleitung

Die Organische Chemie beschäftigt sich mit der Erforschung der Verbindungen des Kohlenstoffs, wobei die Synthese dieser Verbindungen ein zentrales Thema ist. Die Organische Synthese hat heutzutage ein hohes Niveau erreicht und z.B. hochkomplexe Naturstoffe im Labormaßstab zugänglich gemacht.¹ Dabei beruhen viele der heute genutzten Synthesestrategien auf irreversiblen Reaktionen.² Dies hat zum Vorteil, dass die gebildeten Produkte unter den gegebenen Reaktionsbedingungen stabil sind und Rückreaktionen nicht stattfinden. Als Hauptprodukt erhält man bevorzugt die Verbindung, deren Bildung die niedrigste Aktivierungsenergie erfordert, die also das kinetisch bevorzugte Produkt darstellt (Abbildung 1; aus **A** wird **C**). Ist dieses nicht gleichzeitig das gewünschte, kann die Ausbeute einer solchen Reaktion gering sein. Tatsächlich gibt es eine Reihe von Synthesen, häufig von strukturell komplexeren Produkten, die mit notorisch schlechten Ausbeuten verlaufen.

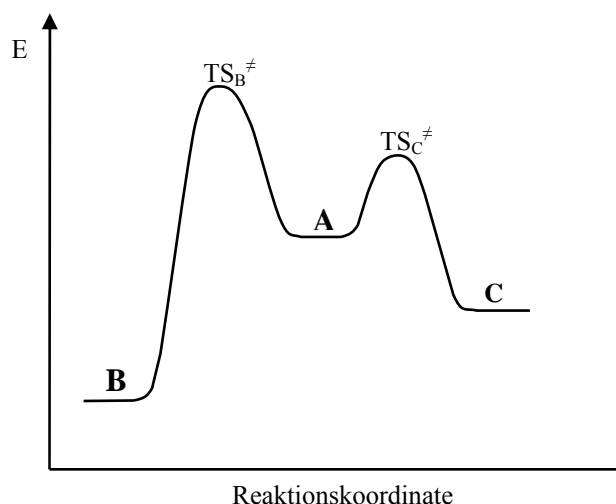


Abbildung 1 Energieprofil einer Reaktion mit zwei konkurrierenden Reaktionswegen. Verbindung **B** ist das thermodynamische bevorzugte Produkt, Verbindung **C** das kinetisch bevorzugte. TS^{\ddagger} = Übergangszustand.

Synthesen, die häufig in unbefriedigenden Ausbeuten verlaufen sind z.B. die von Makrozyklen. Probleme bei der Darstellung von Makrozyklen können sich aus einem energetisch ungünstigen Übergangszustand ergeben und aus der Einschränkung von Rotationsfreiheitsgraden beim Ringschluss, wodurch die Reaktion auch aus Gründen der Aktivierungsentropie benachteiligt ist. Als Nebenreaktionen beobachtet man daher bei Makrozyklensynthesen häufig die Bildung von linearen Oligomeren. Bei kinetischer

Reaktionssteuerung ist eine Überführung dieser Oligomere in das gewünschte Produkt nicht möglich. Anders ist dies bei thermodynamischer Reaktionsführung unter Verwendung reversibler Reaktionen. Auch hier kann es zu Beginn einer Makrozyklensynthese zunächst zur Bildung eines komplexen Produktgemisches kommen. Die Komponenten dieses Gemisches können aber anschließend langsam in das thermodynamisch günstigste Produkt (Abbildung 1; aus **A** wird nun **B**), welches häufig der gewünschte Makrozyklus ist, äquilibrieren. Nebenreaktionen, die nicht zum gewünschten Produkt führen, spielen also nur zu Beginn der Reaktion eine Rolle. Die entstandenen unerwünschten Nebenprodukte lassen sich aber wieder in das gewünschte Produkt zurückführen.

Die Nutzung reversibler Reaktionen zum Aufbau komplexerer Produkte unter thermodynamischer Kontrolle stellt ein interessantes Konzept dar, das in den letzten zwei Jahrzehnten unter der Bezeichnung dynamische kovalente Chemie (DCC) große Bedeutung erlangt hat.³ Typische Beispiele reversibler Reaktionen, die in der DCC bereits vielfach Verwendung gefunden haben, sind Veresterungen bzw. Umesterungen (siehe Abbildung 2). Unter geeigneten Bedingungen sind diese Reaktionen vollständig reversibel, bei Veränderung der Reaktionsbedingungen, z.B. des pH-Werts, kommen sie aber zum Erliegen, und stabile Produkte können isoliert werden. Neben der Estergruppe gibt es noch eine Vielzahl von anderen funktionellen Gruppen, deren Bildung reversibel verläuft und die deswegen in der DCC von Bedeutung sind. In diesem Zusammenhang wären Acetale, borzaaromatische Anhydride, Disulfide, Imine, Oxime, Borsäureester, Hydrazone etc. zu nennen.^{4,5}

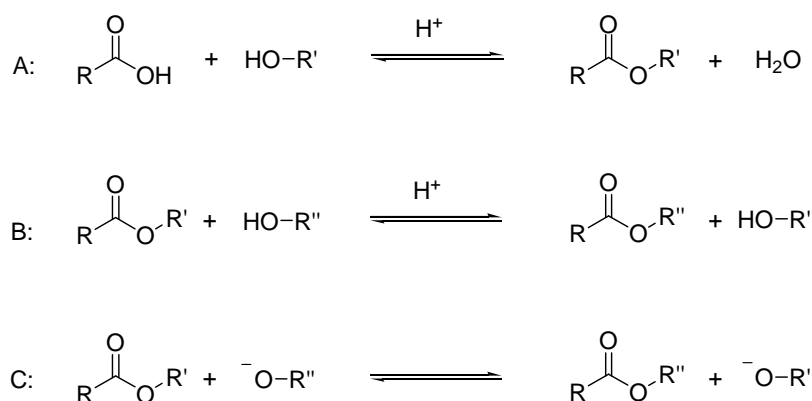


Abbildung 2 Beispiele von reversiblen Reaktionen: A: Esterbildung bzw. -spaltung; B: Umesterung, sauer katalysiert; C: Umesterung, basisch katalysiert.

Die Leistungsfähigkeit einer auf reversiblen Reaktionen beruhenden Synthese soll an Hand der in Abbildung 3 dargestellten Makrolactonisierung verdeutlicht werden. Rowan, Brady und Sanders zeigten, dass bei kinetischer Reaktionsführung aus dem gezeigten Hydroxyalkohol ein zyklisches trimeres Makrolacton in 37 %iger Ausbeute gebildet wird. Daneben entstehen 23 % des cyclischen Tetramers und 40 % Oligomere. Durch thermodynamische Reaktionsführung kann die Bildung des gewünschten cyclischen Trimers aus dem entsprechenden Ester dagegen auf > 90 % gesteigert werden.^{6,7}

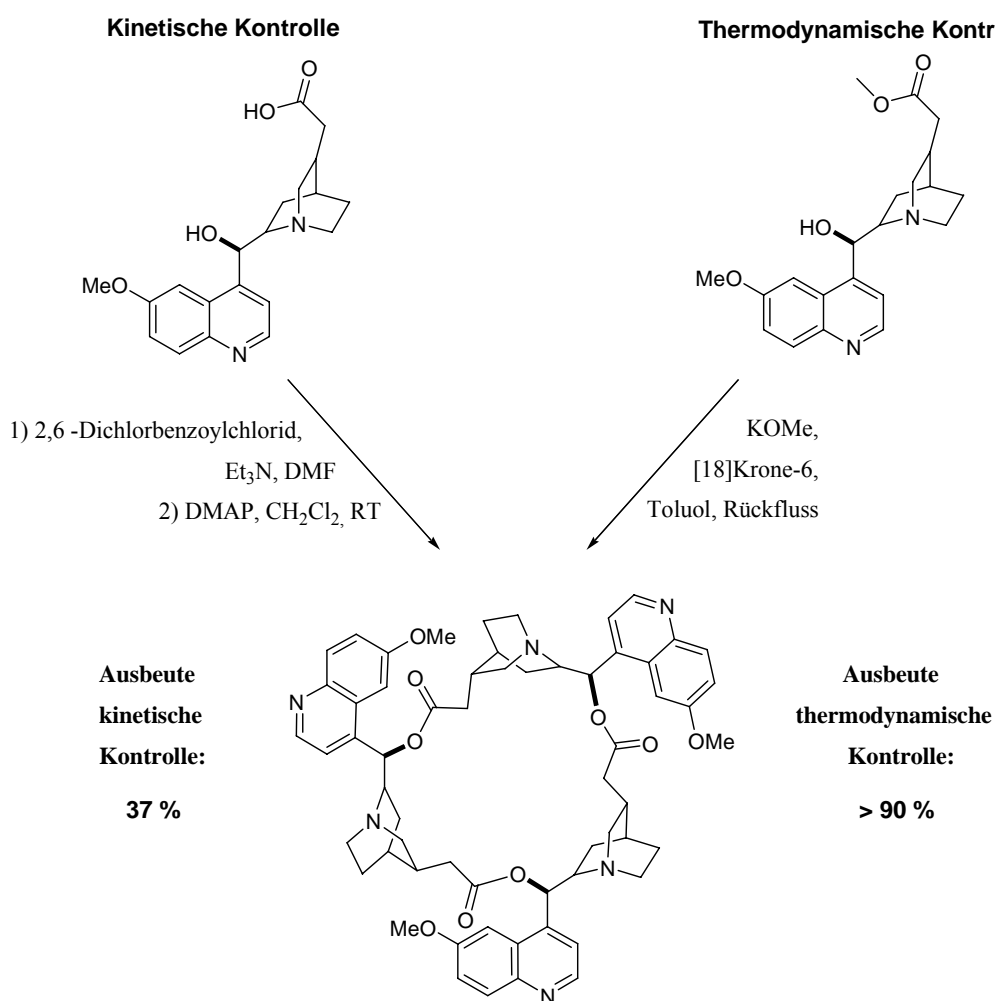


Abbildung 3 Thermodynamisch kontrollierte Makrolactonisierung im Vergleich zu einer kinetisch kontrollierten Reaktion.^{6,7}

Die Verwendung der DCC bietet noch weitere Vorteile. So kann durch die Veränderung der Reaktionsbedingungen relativ einfach Einfluss auf die Produktzusammensetzung genommen werden. So demonstrierten Lehn und Giuseppone, dass durch Veränderung des

pH-Werts und der Temperatur das Verhältnis von im Gleichgewicht ineinander umwandelbaren Iminen gezielt verändert werden kann.⁸

Beim Design eines auf der DCC basierenden Experiments muss allerdings berücksichtigt werden, dass einige reversible Reaktionen mitunter lange Äquilibrierungszeiten haben.⁹ Deswegen sind solche Reaktionen (bzw. Bedingungen für Reaktionen) günstiger, welche die Gleichgewichtseinstellung in einem akzeptablen Zeitrahmen zulassen. Zudem sollten die Reaktionen möglichst unter milden Bedingungen ablaufen, wodurch viele andere Funktionalitäten im Molekül toleriert werden. Ebenso muss die Möglichkeit bestehen, die Reaktion abubrechen bzw. die gegenseitige Umwandlung der Produkte ineinander zu vermindern. Ansonsten würde das Produkt beim Versuch es zu isolieren, im Gleichgewicht wieder in seine Ausgangsprodukte zerfallen. So können z.B. Imine, die sehr hydrolyseempfindlich sind, durch Reduktion zu den korrespondierenden Aminen in stabile Derivate überführt werden, was die Isolation der entsprechenden Produkte ermöglicht (Beispielreaktion siehe Abbildung 4).

Inzwischen gibt es eine Vielzahl von Synthesen, in denen die DCC genutzt wurde, um Produkte darzustellen, die auf anderen Wegen schwerer bzw. mit schlechten Ausbeuten zugänglich wären. Als Beispiele sollen einige Rotaxansynthesen vorgestellt werden. Bei Rotaxanen handelt es sich um mechanisch verknüpfte Verbindungen, in denen ein zyklisches Molekül auf eine lineare Einheit (Achse) aufgefädelt ist. Das Abgleiten des Rings von der Achse wird durch sperrige Substituenten (Stopper) an den Achsenenden verhindert. Rotaxane sind u.a. deshalb interessant, da geeignete Derivate die Möglichkeit besitzen, die Position des Rings auf der Achse gezielt zu kontrollieren. Durch äußere Einflüsse wie Redoxprozesse, Licht oder pH-Wert-Änderung kann man den Ring auf der Achse verschieben und so schaltbare Systeme realisieren, die in der molekularen Elektronik eine Bedeutung finden können.¹⁰⁻¹³ Eine Strategie zur Synthese von Rotaxanen besteht in der Umsetzung eines Gemisches aus Ring und Achse mit geeigneten Stoppermolekülen. Reaktive Gruppen an den Enden der Achse reagieren mit den Stoppnern, wodurch die hantelförmige Rotaxankomponente entsteht. Ist die Reaktion zwischen Achse und Stoppermolekülen irreversibel, so hängt die maximal mögliche Ausbeute der Reaktion vom Anteil ab, in dem der Komplex aus Ring und Achse im Gleichgewicht unter den Reaktionsbedingungen vorliegt. Liegt dieses Gleichgewicht weit auf der linken Seite, ist die Ausbeute gering und als Nebenprodukt entsteht die Achse ohne aufgefädelten Ring in erheblichen Mengen. Ist allerdings das Rotaxan durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Ring und Achse thermodynamisch stabilisiert und ist die Reaktion zwischen Achse und Stoppnern reversibel,

kann die Ausbeute einer solchen thermodynamisch kontrollierten Rotaxansynthese hoch sein. Ein Beispiel für eine solche Vorgehensweise stellt eine von Stoddart et al. beschriebene Rotaxansynthese dar. Dabei wurde die Iminbindung zur Kupplung der Stopper an die Achse und als Ring ein Kronenetherderivat, das mit einer Aminofunktion im Rückgrat der Achse wechselwirken kann (Abbildung 4), verwendet.^{14,15} Die Dissoziation des Komplexes zwischen Kronenether und Achse ist nur möglich, wenn mindestens eine terminale Aldehydgruppe der Achse frei vorliegt. Unter Verwendung von *p*-Toluidin und NH_4PF_6 als Katalysatoren lag das Rotaxan aus diesen Komponenten nach zwei Stunden mit 47 % im Gleichgewicht vor. Durch Reduktion der Imingruppen konnte es in ein stabiles Produkt überführt werden.

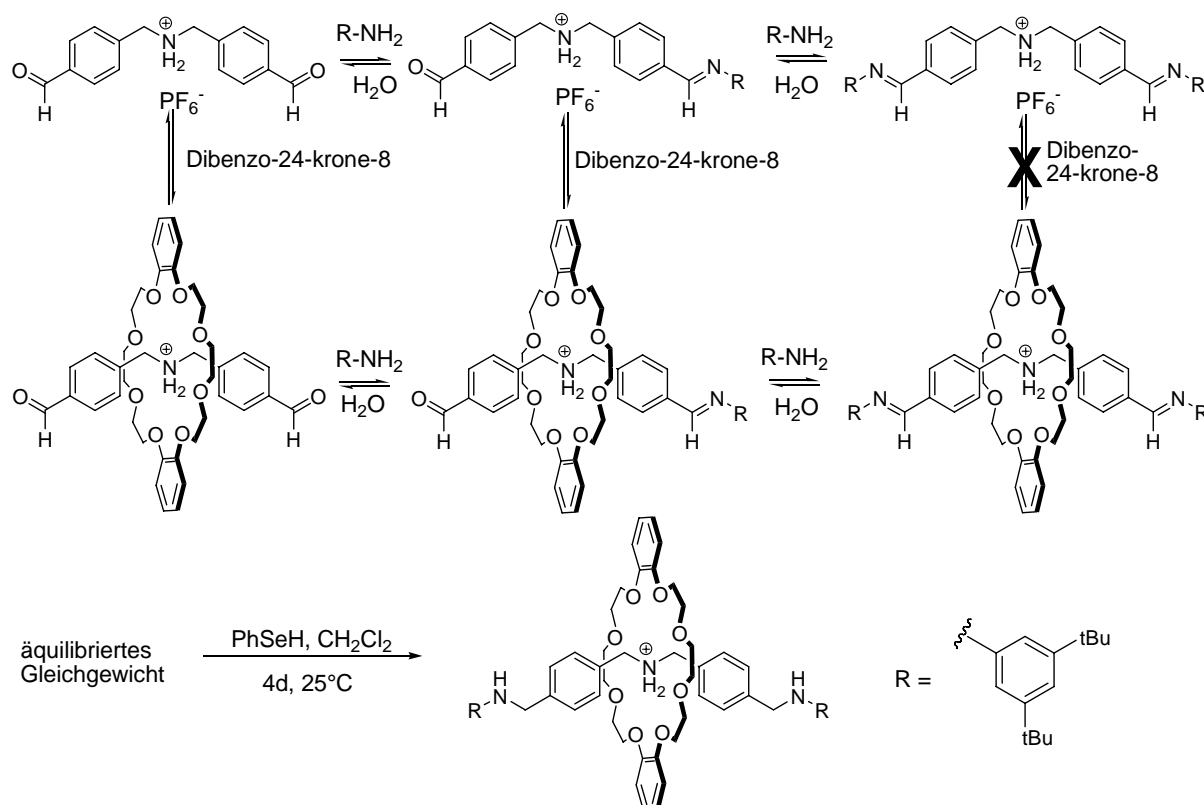


Abbildung 4 Rotaxan dargestellt durch Iminbildung und anschließende Reduktion zum Amin.¹⁴

T. Takata stellte ein ähnliches System vor, bei dem sich aber eine Disulfidbrücke innerhalb der Achse befand, die während der Synthese reversibel gespalten und neu gebildet werden konnte (Abbildung 5). Zunächst wurde in diesem Fall die an beiden Enden mit Stoppergruppen modifizierte Achse durch Zugabe von Thiophenol in das korrespondierende

gemischte Disulfid überführt. Durch den Bruch der Kette wurde das Auffädeln von Dibenzo-24-krone-8 als zyklische Untereinheit des Rotaxans ermöglicht. Die komplexierten ‘‘Halbhanteln‘‘ konnten anschließend mit den in der Lösung vorliegenden Sulfiden bzw. Disulfiden zu dem entsprechenden [2]- und [3]Rotaxan (8 bzw. 58 %) weiterreagieren.

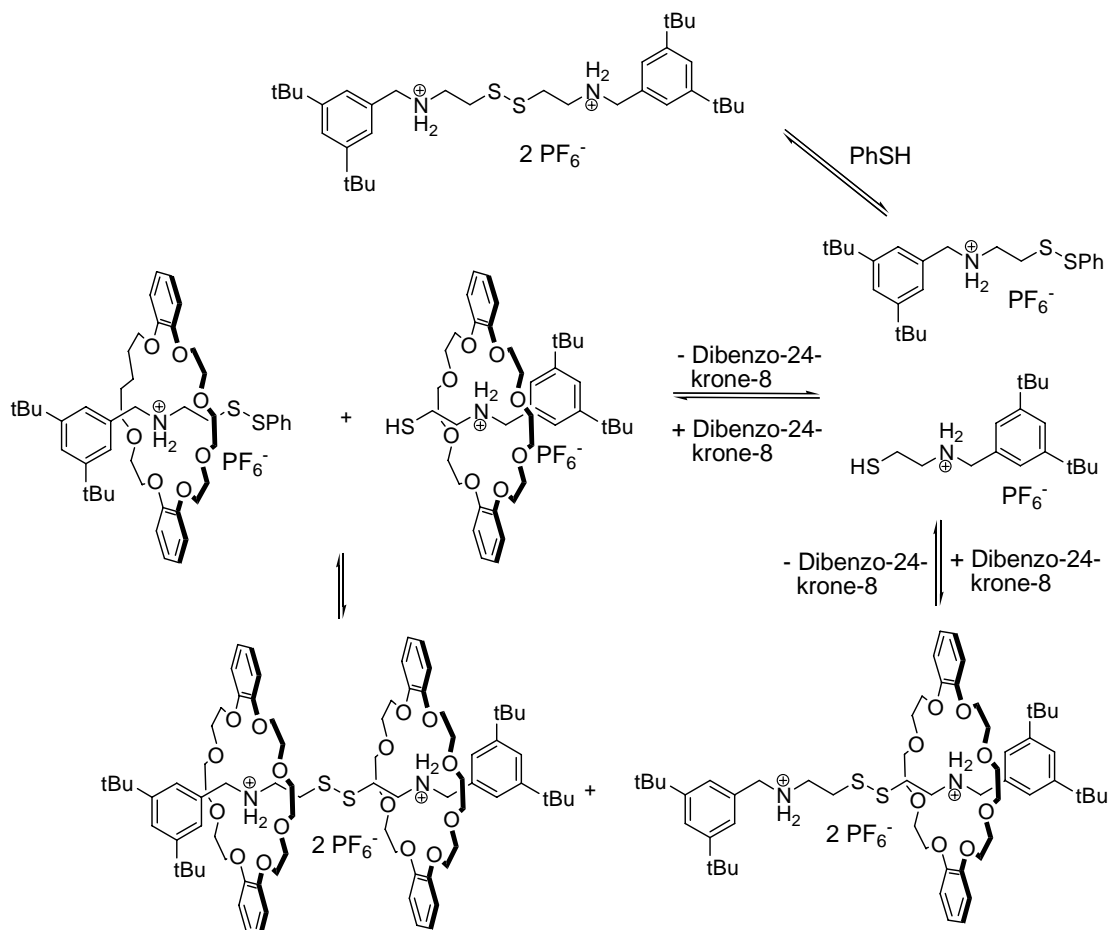


Abbildung 5 Synthesestrategie von Takata et al. zur Darstellung eines Rotaxans unter Verwendung des Disulfidaustausches.¹⁶

Neben Rotaxanen sind Catenane in den letzten Jahren zu einem beliebten Forschungsthema geworden. Bei Catenanen handelt es sich um Verbindungen, die aus zwei oder mehreren ineinandergreifenden zyklischen Molekülen bestehen. Eine Anwendung der DCC zur Catenansynthese ist die von Sanders et al. beschriebene Synthese eines rein organischen [2]Catenans mittels Ring Closing Metathese (RCM) (Abbildung 6).¹⁷ Dabei wurde ein elektronenreicher zyklischer Kronenether und ein elektronenarmes Diimid mit terminalen Doppelbindungen eingesetzt. Im ersten Schritt der Synthese kommt es zur Bildung eines Komplexes, bei der das Diimid in den Kronenetherring eingelagert wird. Die

Wechselwirkung der beiden Komponenten beruht auf π - π Wechselwirkungen. Anschließend wurde das Diimid unter dem Einfluss des Grubbs-Katalysators zyklisiert, wodurch sich die Catenanstruktur bildete. Um zu beweisen, dass dieser Synthese wirklich eine reversible Reaktion zu Grunde liegt, wurde von den Autoren ein Austauschexperiment durchgeführt, in dem ein Catenan, das einen Ring mit Pyromelliteinheiten anstelle der Naphthalindiimiduntereinheiten enthielt, mit dem Naphthalindiimidprecursor unter den Bedingungen der RCM umgesetzt wurde. Als Produkt entstand auch hierbei das Naphthalindiimid-Catenan, was zeigt, dass die Reaktion bevorzugt zum stabileren Produkt mit den stärkeren Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Untereinheiten der beiden Ringe, führt. Gleichzeitig wurde dadurch die Reversibilität der Reaktion eindeutig belegt.

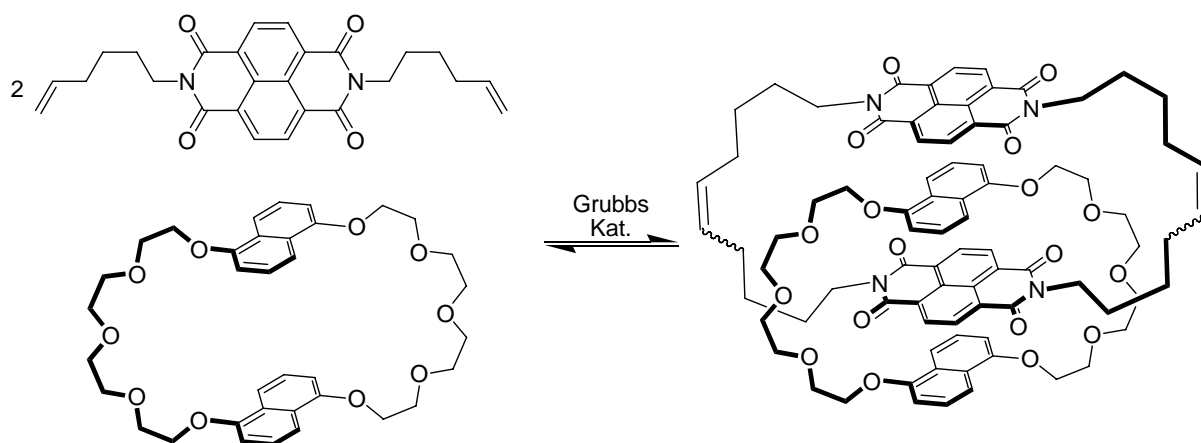


Abbildung 6 Ring Closing Metathesis zur Darstellung eines Catenans nach Sanders et al.¹⁷

Ein anderes Beispiel, welches die Effizienz der RCM zum Aufbau von Catenanen zeigt, stammt von Sauvage und Grubbs.¹⁸ Sie konnten mit Hilfe der RCM die Bildung eines Catenans mit bis zu beeindruckenden 92 % realisieren. Bei dieser Reaktion erfolgt die Vororganisation der Catenan-Untereinheiten vor dem Ringschluss über die Koordination eines Cu(I)-Ions an zwei Phenanthrolin-Einheiten.

Weitere Verbindungen, die mit Hilfe der DCC effizient synthetisiert werden können, sind so genannte Containermoleküle. Dabei handelt es sich um mehr oder weniger sphärische Moleküle, die einen Hohlraum mit molekularen Dimensionen umgeben, in dem Gastmoleküle permanent gebunden werden können. Containermoleküle können u.a. zur Stabilisierung reaktiver Zwischenstufen, als Katalysatoren oder für den molekularen Transport verwendet werden.¹⁹⁻²⁴ Containermoleküle mit labilen Bindungen haben gegenüber solchen mit stabilen

den Vorteil, dass es möglich sein sollte, durch Veränderungen eines äußeren Einflusses, wie z.B. des pH-Werts, ein zuvor eingelagertes Substrat gezielt freizusetzen.

Zum Aufbau eines Containermoleküls und der gezielten Spaltung verwendeten Tam Chang et al. den Disulfidaustausch (Abbildung 7). Dazu setzten sie ein monomeres Trithiol mit Bis(2-hydroxyethyl)disulfid als Katalysator um und erhielten so das gewünschte dreifach verbrückte Dimer (30 %) und ein Oligomer, welches nicht genauer identifiziert werden konnte. Durch den Zusatz von 2-Hydroxyethanthiol war es möglich, den erzeugten Käfig wieder zu spalten. Allerdings wurde die Einlagerung von Substraten in dieses Container nicht untersucht.

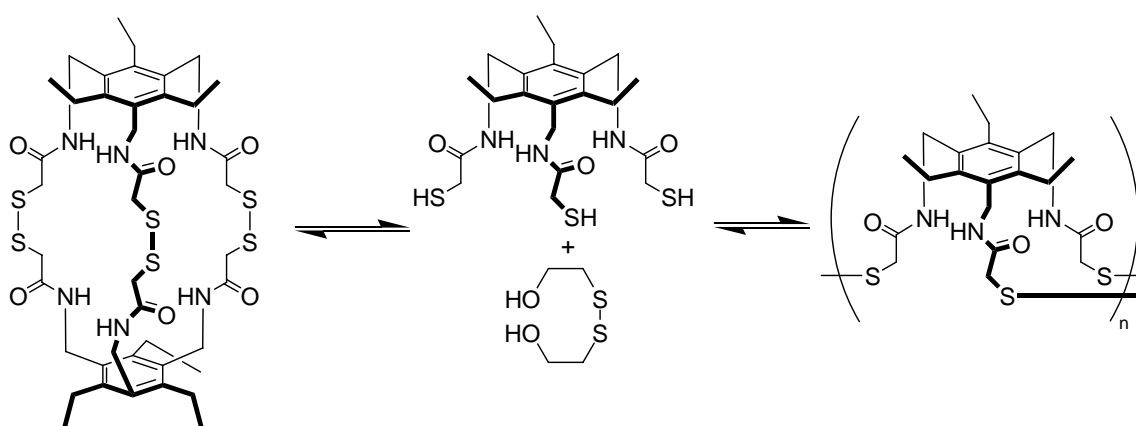


Abbildung 7 Containermolekül basierend auf Disulfiden.²⁵

In seiner vorletzten Veröffentlichung zeigte Cram, dass es möglich ist, ein Containermolekül bestehend aus einem Tetraformyl-Cavitanden und einem Diaminlinker unter thermodynamischer Kontrolle zu generieren (Abbildung 8).²⁶ In dieses Containermolekül konnte Ferrocen eingelagert und daraus wieder gezielt freigesetzt werden, wobei für die Komplexierung bzw. Dekomplexierung Brücken zwischen den Cavitanduntereinheiten geöffnet und geschlossen werden mussten. Liu und Warmuth untersuchten ein analoges System, bei dem ebenfalls ein Tetraformyl-Cavitand mit einem Diaminlinker in einer Eintopfreaktion umgesetzt wurde.²⁷ Sie konnten nach dem Einstellen des thermodynamischen Gleichgewichts feststellen, dass sich abhängig vom Lösungsmittel verschiedene Containermoleküle ausbildeten. So beobachteten sie in THF einen Container, in welchem vier Cavitanden (35 %) verbrückt sind. In Chloroform hingegen bildete sich eine Struktur mit sechs verbrückten Cavitanden (82 %) und in Methylchlorid konnten sie sogar

einen Container mit acht verbrückten Cavitanden (65 %) isolieren. Auf Grund der Anzahl der Cavitanduntereinheiten und der daraus resultierenden Größe des aufgespannten Hohlraums werden solche Strukturen auch als Nanocontainer bezeichnet. Diese sind wahrscheinlich in der Lage, auch sehr große Gäste einzulagern. Diesbezügliche Ergebnisse sind allerdings noch nicht publiziert.

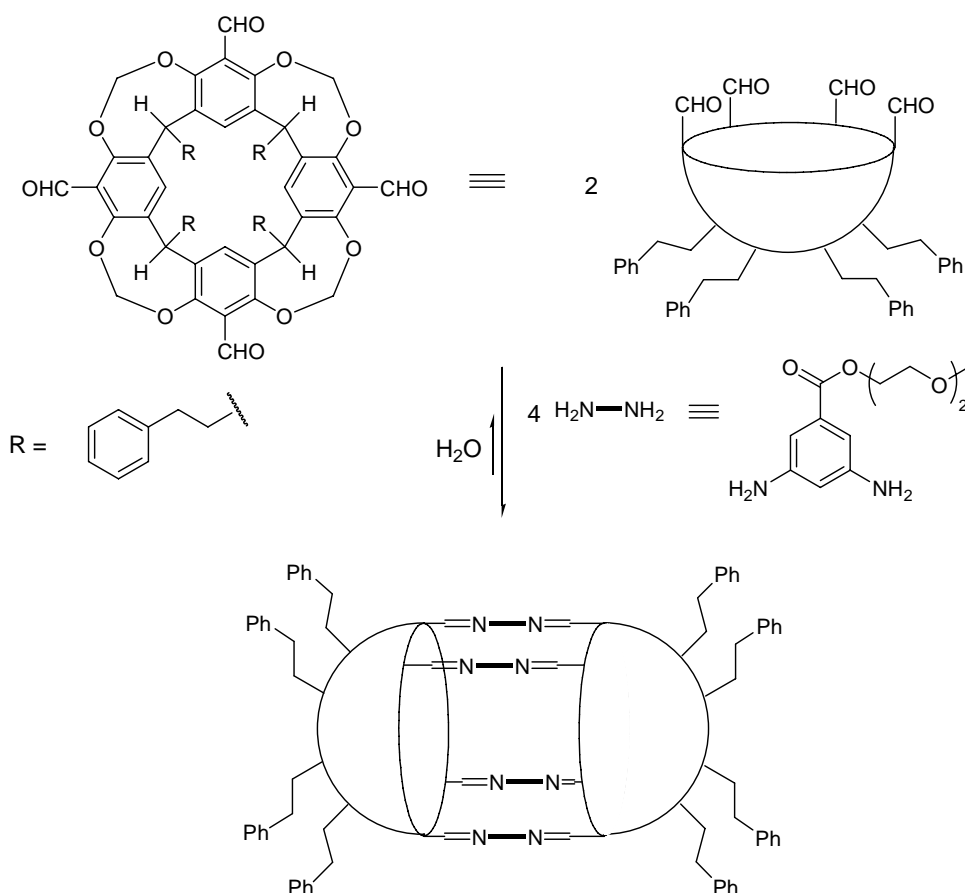


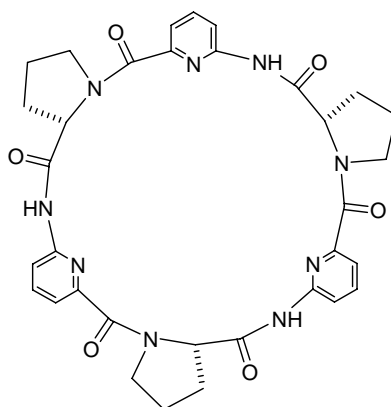
Abbildung 8 Containermolekül basierend auf Iminbindungen.²⁶

Reversible Bindungen bieten also einen Zugang zu komplexen Verbindungen wie z.B. Makrozyklen, Catenanen, Rotaxanen oder molekularen Containern, die über kinetisch kontrollierte Reaktionen oftmals schlechter zugänglich sind. Im Rahmen dieser Arbeit werden analoge Strategien verfolgt. Dabei sollen auf Basis der in der Gruppe von S. Kubik entwickelten anionenbindenden Cyclopeptide verbrückte Bis(cyclopeptide) mit mehr als einem Linker zwischen den Cyclopeptiduntereinheiten synthetisiert werden. Die DCC stellt für solche Arbeiten das ideale Instrument dar.

2 Theoretischer Teil

2.1 Aufgabenstellung

Von der Arbeitsgruppe um S. Kubik wurde 2001 das cyclische Hexapeptid **1** bestehend aus alternierenden L-Prolin- und Aminopicolinsäureeinheiten beschrieben, das in wässrigen Lösungsmittelgemischen anorganische Anionen wie Sulfat oder Iodid bindet.²⁸



1

Abbildung 9 Cyclohexapeptid **1**, bestehend aus einer alternierenden Sequenz von 6-Aminopicolinsäure- und L-Prolin-Untereinheiten.

Untersuchungen zur Anionenkomplexierung von **1** haben gezeigt, dass die in wässrigen Lösungen gebildeten Komplexe aus zwei ineinander greifenden Cyclopeptidringen bestehen, zwischen die ein Anion eingelagert wird.²⁸ Diese sandwichartigen 2:1 Komplexe konnten durch kovalente Verbrückung der beiden Cyclopeptide mit einem geeigneten Linker in 1:1 Komplexe überführt werden.²⁹ Durch eine solche Verbrückung wurde die Effizienz der Anionenkomplexierung im Vergleich zu **1** deutlich gesteigert. Die in dem Bis(cyclopeptid) der ersten Generation als Linker verwendete Adipinsäure wurde zuvor in Molecular Modeling Studien als geeignet identifiziert, um die beiden Cyclopeptidringe zu verbrücken ohne deren Kooperativität bei der Anionenbindung zu verhindern.

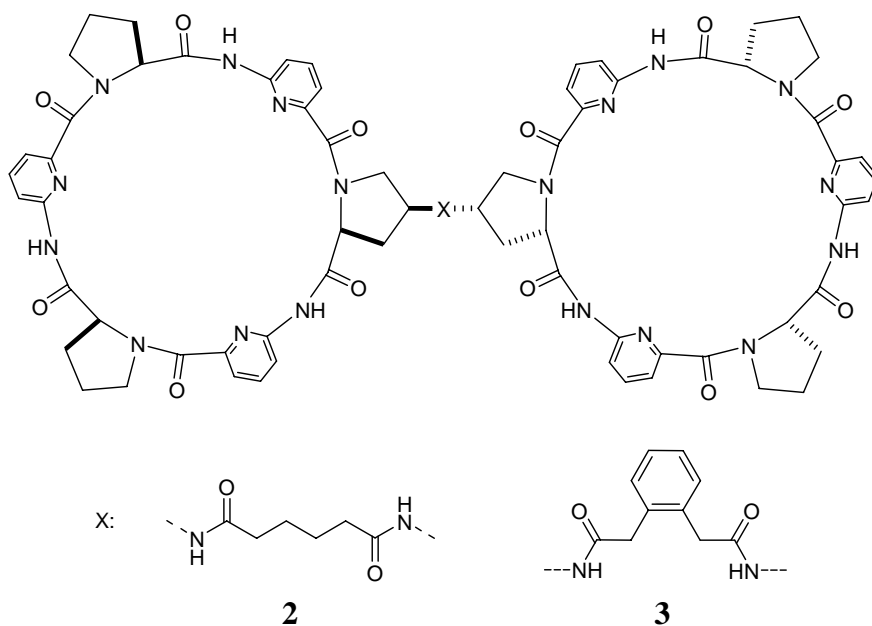


Abbildung 10 Durch Adipinsäure bzw. 1,2-Phenyldiessigsäure einfach verbrückte Bis(cyclopeptide) **2** und **3**.

Bereits in meiner Diplomarbeit habe ich weiterführende Untersuchungen zum Einfluss der Struktur des Linkers in solchen Bis(cyclopeptiden) auf deren Anionenaffinität durchgeführt. Ich konnte zeigen, dass das mit 1,2-Phenyldiessigsäure verbrückte Bis(cyclopeptid) **3** eine im Vergleich zu **2** zwei- bis vierfache höhere Selektivität für Iodid gegenüber Bromid und Chlorid besitzt.³⁰ Als Grund hierfür wurde angenommen, dass die Größe des Rezeptorhohlraums von **3** optimal für die Einlagerung eines Iodidions ist und durch die größere Starrheit des 1,2-Phenyldiessigsäurelinkers im Vergleich zum Adipinsäurelinker die Anpassungsfähigkeit des Rezeptors für kleinere Anionen abnimmt. Zusätzlich kommt es durch die geringe Anzahl von Rotationsfreiheitsgraden im Linker von **3** möglicherweise zu einer besseren Vororganisation dieses Rezeptors für die Iodidkomplexierung. Die im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführten Untersuchungen beruhten auf NMR-Studien. Die für eine genauere Interpretation benötigten thermodynamischen Daten der Komplexierung wurden zu diesem Zeitpunkt noch nicht ermittelt.

Ausgehend von diesen ersten Ergebnissen sollten im Rahmen meiner Doktorarbeit weitere einfach verbrückte Bis(cyclopeptide) dargestellt und untersucht werden, um ein genaueres Verständnis über den Einfluss der Linkerstruktur auf deren Anionenaffinität zu erhalten. Des Weiteren sollten die thermodynamischen Daten aller untersuchten Komplexe ermittelt werden, was zu einem genaueren Verständnis des Einflusses der Rezeptorstruktur auf die Anionenaffinität bzw. -selektivität führen sollte.

Der zweite Teil dieser Arbeit hatte zum Ziel, zweifach verbrückte Bis(cyclopeptide) zu generieren und geeignete Linker zu identifizieren, die bei Einbau zwischen zwei Cyclopeptiduntereinheiten Zugang zu neuen Anionenrezeptoren eröffnen. Die Verbrückung der Cyclopeptiduntereinheiten über zwei Linker sollte zu einer besseren Vororganisation der Rezeptoren für die Anionbindung führen, da auf diese Weise Konformationen, die keine kooperative Wirkung der beiden Cyclopeptiduntereinheiten bei der Substraterkennung zulassen, verhindert werden. Im Idealfall resultiert eine erhöhte Anionenaffinität und -selektivität im Vergleich zu den einfach verbrückten Bis(cyclopeptiden). Da der Aufbau solcher komplexerer Strukturen bei Verwendung irreversibler Reaktionen problematisch ist, sollte die DCC zur Synthese herangezogen werden. Hierfür musste zunächst eine geeignete Cyclopeptidvorstufe synthetisiert werden, die die Verwendung reversibler Reaktionen zum Aufbau von zweifach verbrückten Bis(cyclopeptide) erlaubten. Da als reversible Reaktion der Disulfidaustausch verwendet werden sollte, handelt es sich bei diesem Cyclopeptidbaustein um ein Dithiol. Zur Identifikation geeigneter Linker sollte in Kooperation mit S. Otto an der University of Cambridge, U.K. die dynamische kombinatorische Chemie herangezogen werden. In diesen Zusammenhang sollte auch der Fragestellung nach anderen potentiellen Substraten für die Rezeptoren, z.B. der Eignung von organischen Anionen, nachgegangen werden.

Im letzten Teil meiner Arbeit sollte überprüft werden, ob sich einfach verbrückte Bis(cyclopeptide) für die zur Anionendetektion in ionenselektiven Elektroden (ISEs) oder Fluoreszenzsensoren eignen. Zum einen sollten hierfür mit Bis(cyclopeptiden) dotierte Membranen dargestellt werden und deren Eigenschaften in ISEs überprüft werden. Zum anderen sollte ein einfach verbrücktes Bis(cyclopeptid) synthetisiert werden, das in geeigneter Position einen Fluoreszenzchromophor enthält, dessen Eigenschaften sich bei der Anionenbindung ändern. Dies würde die qualitative und quantitative optische Detektion von Anionen ermöglichen.

2.2 Optimierung der Anionenaffinität von verbrückten Bis(cyclopeptiden)

2.2.1 Einfach verbrückte Bis(cyclopeptide)

2.2.1.1 Hintergrund

Die Untersuchung von Rezeptor-Gast-Wechselwirkungen ist in der Supramolekularen Chemie ein zentrales Forschungsthema. Dabei wird die Anionenerkennung seit etwa 20 Jahren intensiver untersucht. Dieses Gebiet besitzt insofern eine hohe Relevanz, da Anionen wichtige Rollen in biologischen Systemen spielen. Sie beeinflussen die Aktivität von Enzymen, den Transport von Hormonen, die Proteinsynthese und die DNA-Regulation. Allerdings stellen Anionen höhere Ansprüche als z.B. Kationen an Rezeptorsysteme. Dies ist in dem größeren Radius und der damit geringeren Ladungsdichte, der besseren Solvatation von Anionen in Wasser und der Basizität einiger Anionen begründet.

Während es eine Vielzahl synthetischer Rezeptoren gibt, die Anionen durch elektrostatische oder koordinative Wechselwirkungen in wässrigen Lösungsmitteln effizient binden, sind neutrale Anionenrezeptoren wie **2**, die in Wasser wirksam sind, die Ausnahme.³⁰ Rezeptor **2** stellte vor meiner Promotion den einzigen literaturbekannten einfach kovalent verbrückten Bis(cyclopeptid)-Anionenrezeptor dar. Ein Ziel in meiner Promotion war es, weitere einfach verbrückte Bis(cyclopeptide) zu synthetisieren und eingehende Untersuchungen über den Einfluss der Linkerstruktur auf die Anionenbindung durchzuführen. Vor allem sollte untersucht werden, ob durch die Verringerung der konformativen Rigidität des Linkers eine Erhöhung der Anionenaffinität und gegebenenfalls der Anionenselektivität erzielt werden kann.

Die Bindungseigenschaften von **2** sollten hierfür mit denen von Bis(cyclopeptiden) verglichen werden, die als Linker strukturelle Analoga von Adipinsäure enthalten, jedoch konformativ weniger flexibel sind. Unter diesen Kriterien wurden als Linker 1,2-Phenylendiessigsäure und Diphensäure ausgesucht. Im Vergleich zu **2** (5 rotierbare Bindungen im Linker) besitzt ein Bis(cyclopeptid) mit 1,2-Phenylendiessigsäure 4 und eines mit Diphensäure nur noch eine rotierbare Bindung im Linker.

Darüber hinaus wurden in Kooperation mit Benjamin P. Hay vom Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA theoretische Berechnungen zur Optimierung der Linkerstruktur einfach verbrückter Bis(cyclopeptide) durchgeführt. Hierbei wurde mit Hilfe der HostDesigner Software ein *de novo* Design verbrückter Bis(cyclopeptide) durchgeführt, die

eine für die Anionenkomplexierung optimale Struktur besitzen.³¹ Als Grundlage für die Berechnungen diente die Kristallstruktur des Iodidkomplexes von **1**, unter der Annahme, dass in dieser Struktur die Cyclopeptide für die Anionenbindung optimal angeordnet sind. Für die Berechnungen wurden an beiden Cyclopeptidringen in dieser Struktur an jeweils einer Prolineinheit in 4-Position und *S*-Konfiguration eine (NH-C(O)-CH₃)- Gruppe eingeführt. Nach dieser Modifikation entfernte das Programm die Wasserstoffatome der terminalen Methylgruppen an diesen Substituenten, um Bindungsvektoren für die Suche von molekularen Fragmenten zu erhalten, die den Ansprüchen an Winkel und Länge für die Verbrückung der Untereinheiten genügten. Vor der Struktur-Suche, die mit dem so genannten OVERLAY Algorithmus durchgeführt wurde,³¹ wurden die Geometrien aller in der Datenbank verwendeten Fragmente mit der MM3 Methode optimiert. Zusätzlich wurde die Suche auf symmetrische Linker eingeschränkt. Die auf diese Weise identifizierten Rezeptorstrukturen wurden an Hand von drei geometrischen Parametern verglichen - dem Abstand zwischen den Rezeptoruntereinheiten, der Länge des Linkerfragments und dem Diederwinkel - und so eine Rangfolge von Linkern erzeugt, welche die Cyclopeptiduntereinheiten im Iodidkomplex optimal verbrücken. Abschließend wurden die identifizierten Rezeptorstrukturen mit MM3 optimiert. Die besten durch das Programm identifizierten Linker sind in Abbildung 11 dargestellt. Einschränkungen dieses Verfahrens sind u.a., dass nur Linker identifiziert werden konnten, die in der Datenbank vorhanden sind. Weiterhin beruht die Struktursuche allein auf enthalpischen Faktoren, der Einfluss der Linker auf die Bindungsentropie kann nicht berücksichtigt werden. Schließlich müssen auf Grund der Suchstrategie alle Linker eine Methylengruppe in Nachbarschaft zur Carbonylgruppe tragen. Eine direkte Verknüpfung zwischen Carbonylgruppen und einem starren Molekülfragment war nicht möglich, da die durch die Bindungsknüpfung zur Acylgruppe entstehenden Diederwinkel nicht parametrisiert sind und deswegen nur Bindungen zwischen sp² und sp³ hybridisierten C-Atomen geknüpft werden können. Trotz dieser Einschränkungen wurde das Potential des geschilderten Verfahrens zur Identifikation von neuen Rezeptoren kürzlich eindeutig demonstriert.^{32,33}

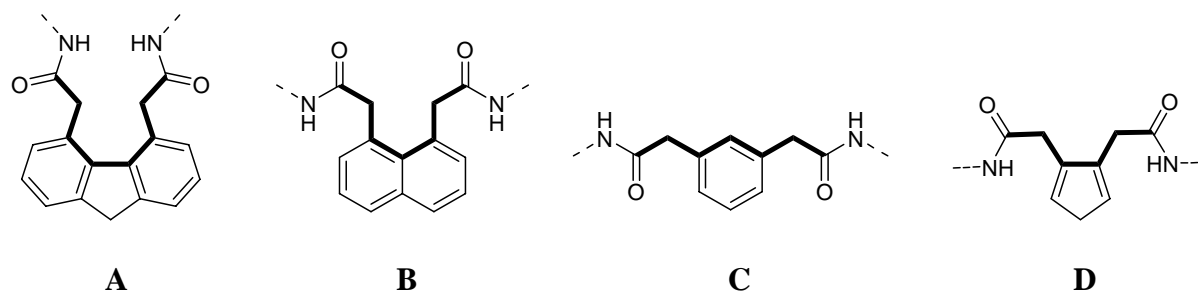


Abbildung 11 Von HostDesigner identifizierte Linkerstrukturen **A-D** für einfach verbrückte Bis(cyclopeptide).

Die in der Suche identifizierten Linkerstrukturen **A** bis **D** unterscheiden sich u.a. in der Anzahl der Kohlenstoffe im Rückgrat der Linker (**A**: acht, **B** und **C**: sieben, **D**: sechs Kohlenstoffe). Auffällig ist, dass alle Linker sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffe im Rückgrat besitzen. Es scheint also, dass rigidere Linker, die zusätzlich planar in der β -Position zu den Carbonylgruppen der Amide sind, optimal für die kooperative Bindung eines Anions durch die Cyclopeptiduntereinheiten sind.

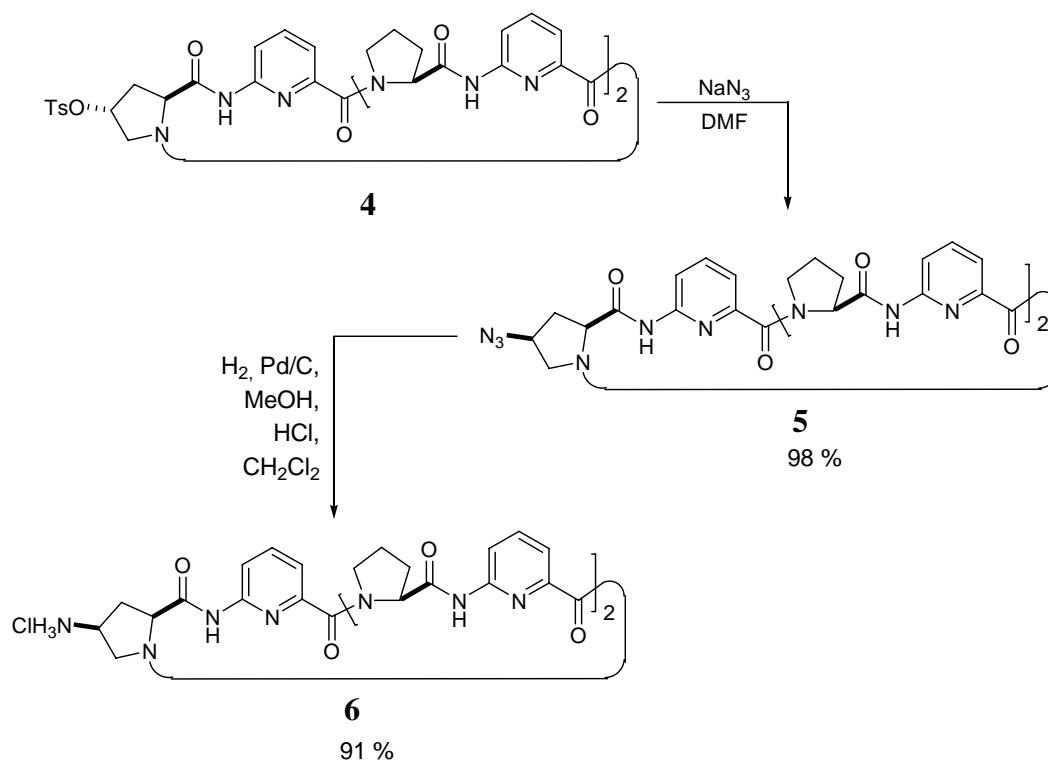
Um zu überprüfen inwieweit mit diesem Verfahren leistungsfähige Rezeptoren identifiziert werden konnten, wurde in die Untersuchungen ein Bis(cyclopeptid) aufgenommen, das den kommerziell erhältlichen Linker **C** enthält. Zusätzlich gab es weitere Gründe, warum **C** attraktiv für die Verbrückung war. So besitzt **C** die gleiche Anzahl von Rotationsfreiheitsgraden wie 1,2-Phenylendiessigsäure, unterscheidet sich von dieser aber durch die Stellung der Substituenten im Ring. Ein Vergleich der Eigenschaften zweier Bis(cyclopeptide), die 1,2- bzw. 1,3-Phenylendiessigsäure als Linker enthalten, erlaubt also auch Aussagen zum Einfluss des Substitutionsmuster strukturell eng verwandter Linker auf die Anionenaffinität der davon abgeleiteten Anionenrezeptoren.

2.2.1.2 Synthesen

2.2.1.2.1 Synthese eines einfach verbrückbaren Cyclopeptids

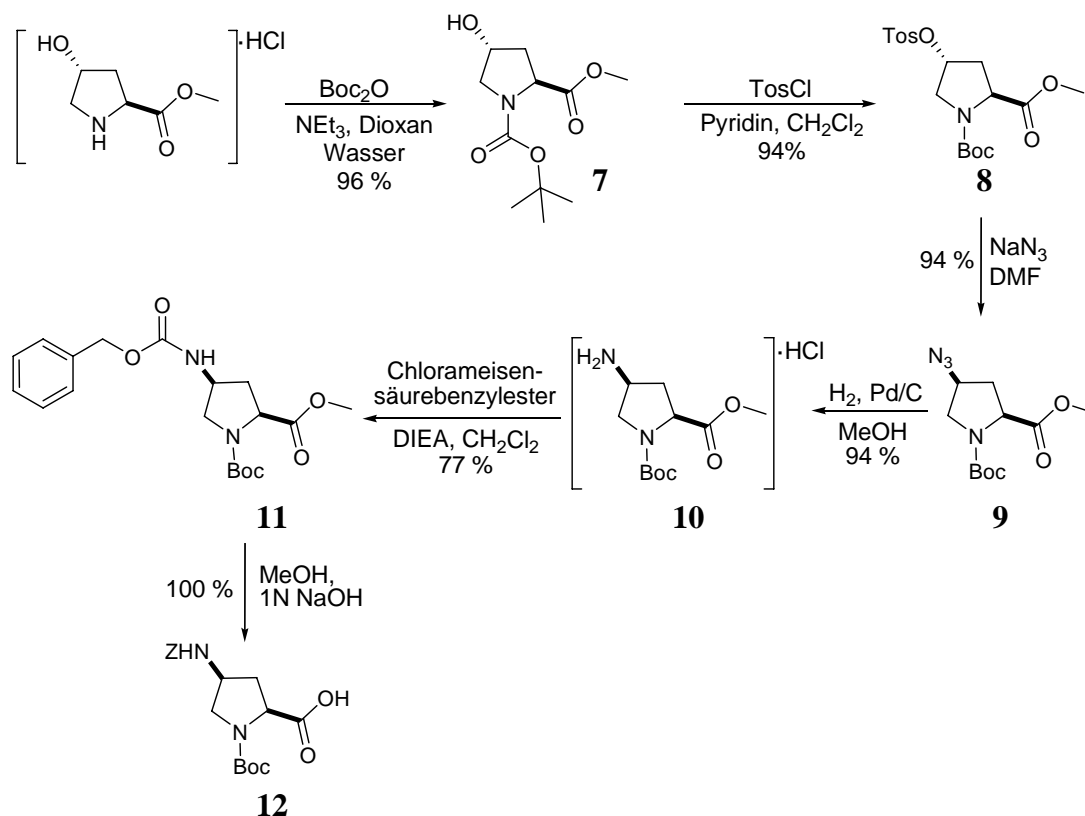
Die Synthese des einfach verbrückten Bis(cyclopeptids) **2** ist beschrieben.²⁸ Es wird ausgehend von einem Cyclopeptid mit einer 4*S*-konfigurierten Aminoprolinereinheit durch Kupplung mit Adipinsäure unter Verwendung eines in der Peptidchemie gängigen Kupplungsreagenzes, TBTU, erhalten. Die Aminoprolinereinheit wurde gewählt, da deren Aminogruppe in der Kupplungsreaktion erheblich reaktiver ist als z.B. die OH-Gruppe einer ebenfalls denkbaren Hydroxyprolinereinheit. Die 4*S*-Konfiguration ist notwendig, um eine gegenseitige Orientierung der beiden Cyclopeptidringe im Bis(cyclopeptid) zu ermöglichen, die deren kooperative Wirkung bei der Anionenkomplexierung erlaubt.

Zu Beginn meiner Promotion wurde das aminoprolinhaltige cyclische Hexapeptid analog des von S. Kubik entwickelten Synthesewegs dargestellt. Hierbei wird das tosylierte Cyclopeptid **4** in das Azid **5** überführt und aus diesem durch Hydrierung das gewünschte Amin **6** hergestellt (Schema 1). Diese Strategie hat allerdings den Nachteil, dass auf der Stufe des Cyclopeptids zwei Reaktionsschritte notwendig sind. Im Rahmen meiner Promotion wurde ein alternativer Syntheseweg entwickelt, bei dem das Aminoprolinderivat zu einem frühen Zeitpunkt der Synthese generiert wird. Dadurch konnten aufwendige Transformationen mit Cyclopeptidderivaten umgangen werden, was zu einer effizienteren Synthese von **6** führte.



Schema 1 Synthese von *cyclo*-{(4-*cis*-Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂}-hydrochlorid **6**.

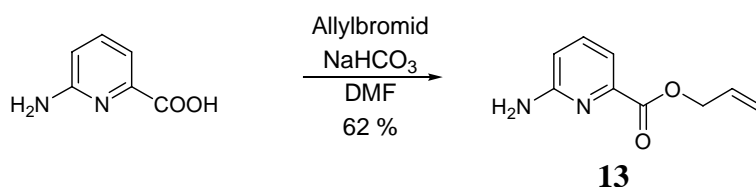
Die von mir entwickelte Synthese von **6** startet bereits mit einem geeignet geschützten 4*S*-Aminoprolinderivat **12**, das zuvor auf dem in Schema 2 dargestellten Weg synthetisiert wird. Ausgangspunkt ist der kommerzielle *trans*-4-Hydroxy-L-prolinmethylester, der im ersten Schritt mit Boc_2O an der NH-Gruppe geschützt wird. Die freie Hydroxylgruppe des erhaltenen Boc-geschützten Derivats **7**, wurde anschließend mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in das entsprechende Tosylat **8** überführt. Darauf folgte eine nucleophile Substitution mit Natriumazid unter der erforderlichen Konfigurationsumkehr zur Generierung der 4*S*-Konfiguration. Das erhaltene Azid **9** wurde unter hydrogenolytischen Bedingungen in das Amin **10** und anschließend mit Chlorameisensäurebenzylester in die *Z*-geschützte Form **11** überführt. Im letzten Schritt erhielt man durch Verseifung des Methylesters das gewünschte Boc-*cis*-4-(*Z*)Amino-L-prolin **12**.



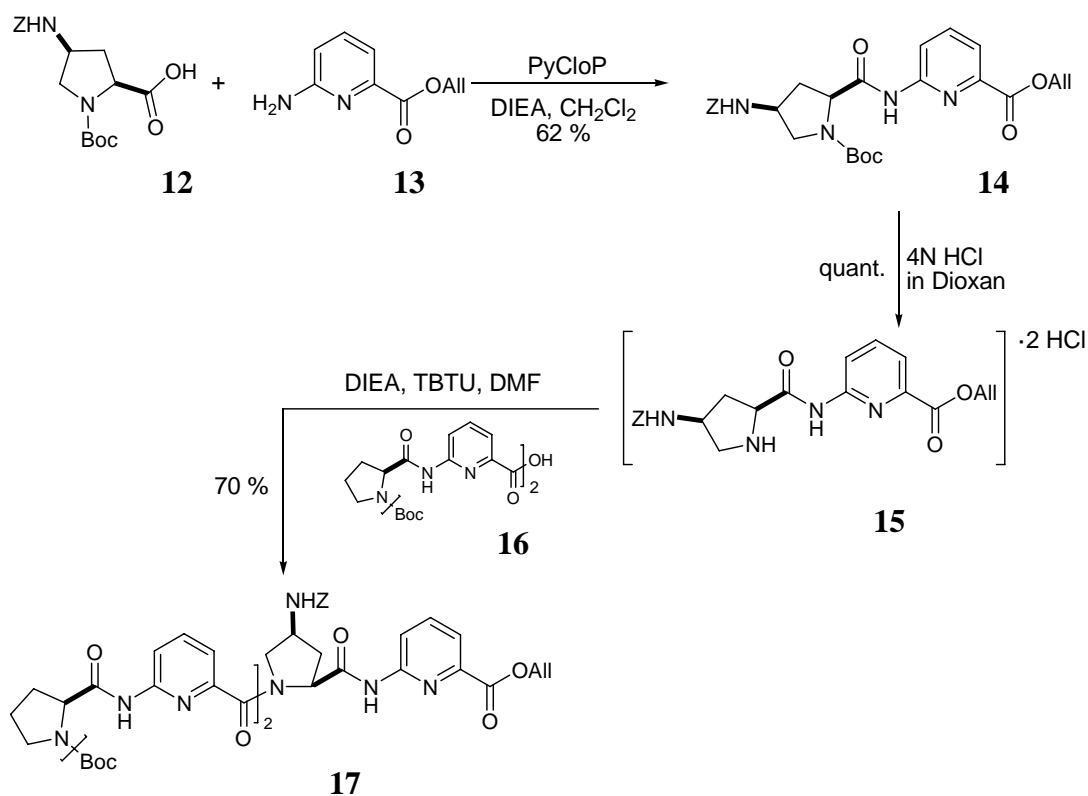
Schema 2 Synthese von Boc-cis-4-(Z)-amino-L-Prolin **12**.

Verbindung **12** wurde nun mit 6-Aminopicolinsäureallylester **13**, der gemäß Schema 3 aus 6-Aminopicolinsäure und Allylbromid zugänglich ist, unter Verwendung des Kupplungsreagenz PyCloP zum Dipeptid **14** umgesetzt (Schema 4). Die erforderliche 6-Aminopicolinsäure wurde zuvor aus 6-Amino-2-picolin dargestellt.³⁴

Die beiden Schutzgruppen am N- und C-terminalen Ende dieses Dipeptids können unabhängig voneinander unter Bedingungen gespalten werden, unter denen die Benzylcarbamatgruppe an der 4-Aminogruppe im Prolinring stabil ist.



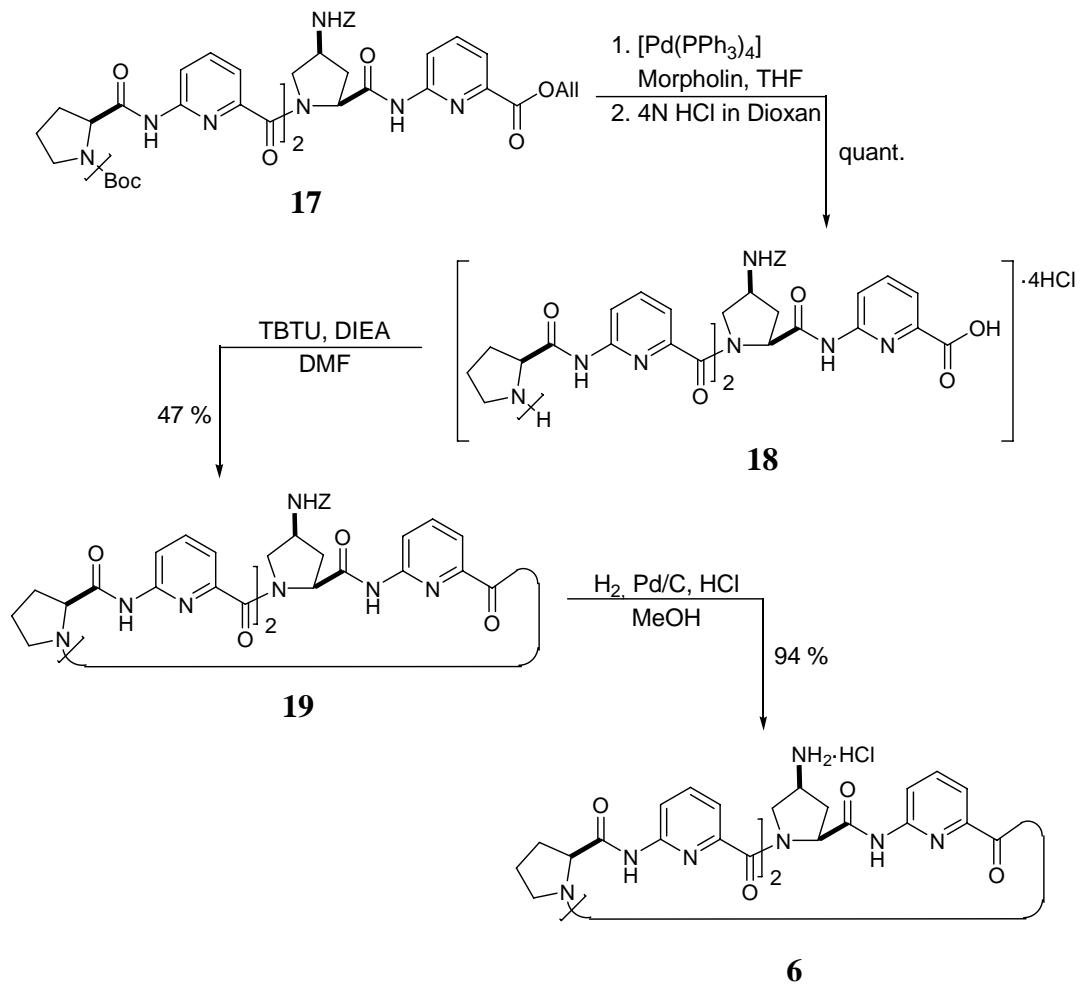
Schema 3 Darstellung von Aminopicolinsäureallylester **13**.



Schema 4 Synthese des Hexapeptids Boc-(cis-4-(Z)Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂-OAll **17**.

Die Kupplung zum gewünschten Dipeptid **14** aus **12** und **13** erfolgt mit PyCloP als Kupplungsreagenz und Diisopropylethylamin in Methylenchlorid (Schema 4). Das zum Aufbau von **6** nötige lineare Hexapeptid **17** wird durch Boc-Entschützung des Dipeptids **14** und anschließender Umsetzung mit Tetrapeptid **16** und TBTU als Kupplungsreagenz in DMF erhalten. Abschließend wurde nach vollständiger Entschützung von **17** das Hexapeptid **18** unter Ausnutzung des Ziegler-Rüggli-Verdünnungsprinzips zum Cyclopeptid **19** umgesetzt (Schema 4). Die Allyl-Entschützung von **17** erfolgte dabei unter Verwendung von Tetrakis[triphenylphosphin]-palladium(0) und Morpholin. Bei der sauren Aufarbeitung wurde überschüssiges Morpholin und das bei der Reaktion entstandene *N*-Allylmorpholin vollständig entfernt. Eine Abtrennung des Katalysatorrückstands gelang jedoch nicht. Auf die nachfolgenden Reaktionen hatte der Katalysatorrückstand allerdings keinen Einfluss, so dass auf eine weitere Reinigung des allylentschützten Hexapeptids **17** verzichtet wurde. Die Boc-Entschützung wurde mit 4N HCl in 1,4-Dioxan durchgeführt.

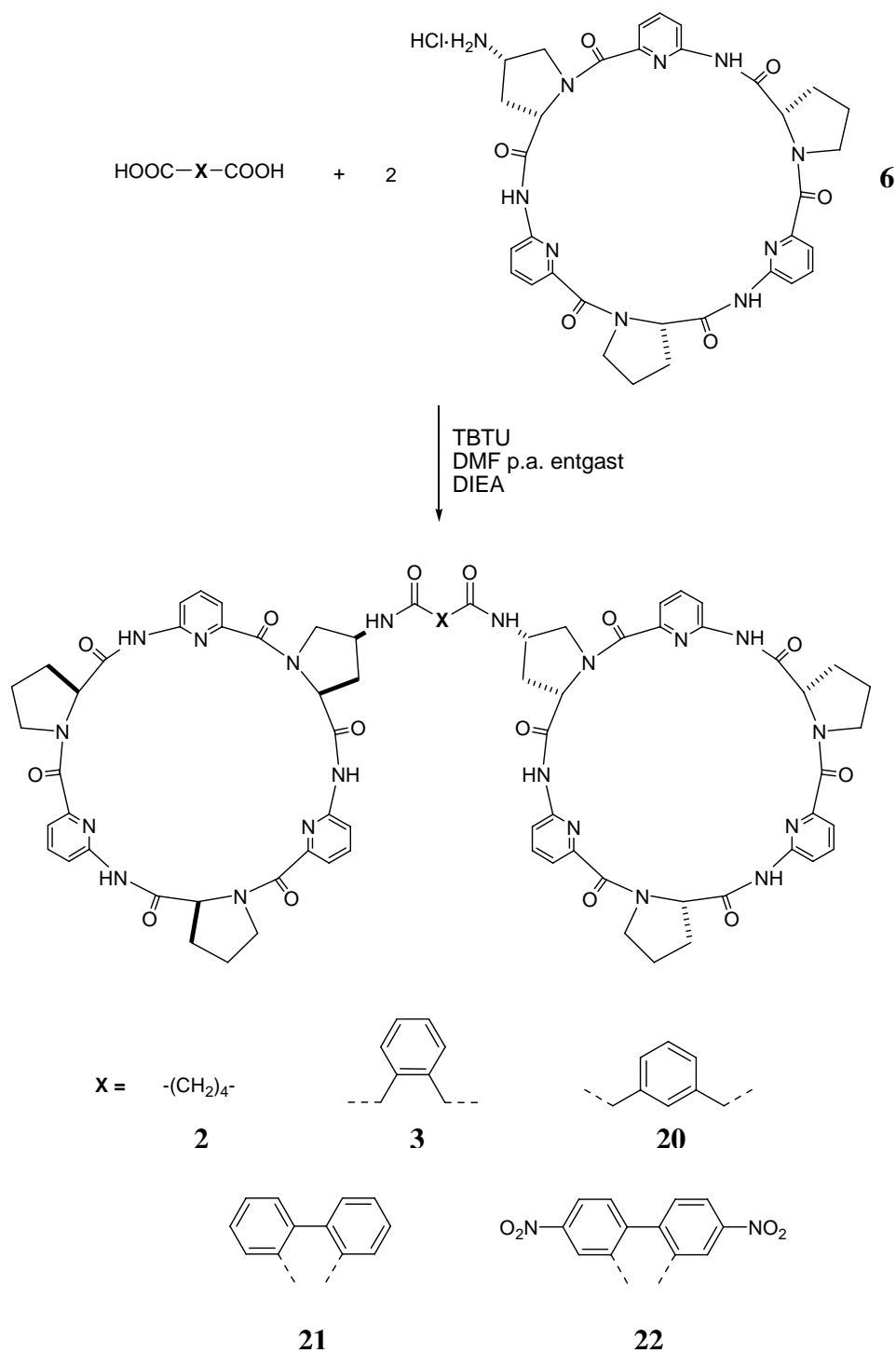
Im Anschluss an die Zyklisierung wurde die *Z*-Schutzgruppe unter hydrogenolytischen Bedingungen in Methanol entfernt (Schema 5). Durch Zusatz von einem Äquivalent Salzsäure konnte das entsprechende Hydrochlorid **6** erhalten werden.



Schema 5 Synthese von $cyclo\text{-}\{(4\text{-cis-Amino-L-Pro})\text{-APA-(L-Pro-APA)}_2\}\text{-hydrochlorid } \mathbf{6}$.

2.2.1.2.2 Synthesen der einfach kovalent verbrückten Bis(cyclopeptide)

Im Folgenden wird die Synthese der einfach kovalent verbrückten Bis(cyclopeptide) vorgestellt.



Schema 6 Synthese der einfach kovalent verbrückten Bis(cyclopeptide) **2**, **3**, **20**, **21** und **22**.

Zur Darstellung der einfach kovalent verbrückten Bis(cyclopeptide) wurden die Disäuren, 1,2-Phenylendisessigsäure, 1,3-Phenylendiessigsäure und Diphensäure jeweils mit zwei Äquivalenten des Cyclopeptids **6** gekuppelt. Nach chromatographischer Aufreinigung und Umfällung wurden alle Bis(cyclopeptide) analysenrein in befriedigenden Ausbeuten erhalten. Bis auf Rezeptor **21** waren alle Bis(cyclopeptide) in den für die folgenden Untersuchungen notwendige Konzentrationen in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol löslich. **21** hingegen löste sich nur in Gemischen, die mindestens 70 % (v/v) Methanol enthielten. Um eine Vergleichbarkeit der quantitativen Bindungsstudien mit denen, die für Rezeptor **2** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol durchgeführt wurden, zu gewährleisten musste also ein Bis(cyclopeptid) gefunden werden, dessen Linker auf Diphensäure basiert, das allerdings in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol löslich ist. Im Rahmen der in Kapitel 2.3.2.2 beschriebenen Untersuchungen zur Synthese eines Fluoreszenzsensors wurde Bis(cyclopeptid) **22** synthetisiert. Dieses unterscheidet sich von **21** durch die beiden Nitrogruppen im Linker. Durch diese Substituenten wird die Löslichkeit des Bis(cyclopeptids) in polaren Lösungsmittel günstig beeinflusst, so dass **22** anstelle von **21** für die Untersuchungen zum Einfluss der Linkerstruktur auf die Bindungseigenschaften einfach verbrückter Bis(cyclopeptide) eingesetzt werden konnte.

Bis auf die Disäure **45**, die zur Synthese von **22** benötigt wurde, waren alle eingesetzten Disäuren kommerziell erhältlich. **45** wurde im Rahmen der Untersuchungen zur Synthese eines Fluoreszenzsensors synthetisiert. Die Darstellung von **45** ist in Kapitel 2.3.2.2 beschrieben.

2.2.1.3 Ergebnisse

Zunächst sollte untersucht werden, ob die im Verhältnis zu **2** weniger flexibleren Rezeptoren in analoger Art und Weise Anionen komplexieren können. Hierfür wurden zunächst Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) Studien durchgeführt. Die Elektrospray-Ionisation ist ein besonders mildes Ionisationsverfahren, das es in vielen Fällen ermöglicht, auch nicht kovalent assoziierte Komplexe in der Gasphase massenspektrometrisch zu analysieren.^{29,35} Auf diese Weise lassen sich Aussagen über deren Zusammensetzung und gegebenenfalls ihre relative Stabilität machen. Im Falle der Komplexe der Bis(cyclopeptide) stammt die Ladung vom gebundenen Anion, so dass die Massenspektren im negativen Modus aufgenommen werden musste. Als Probenlösung für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde eine Rezeptorlösung (0,1 mM; 1:1 (v/v) Wasser/Methanol) mit jeweils 0,33 Äquivalenten NaI, NaBr, und NaCl verwendet. Die Ergebnisse der Messungen für **3**, **20** und **22** sind in Abbildung 12 bis Abbildung 14 dargestellt.

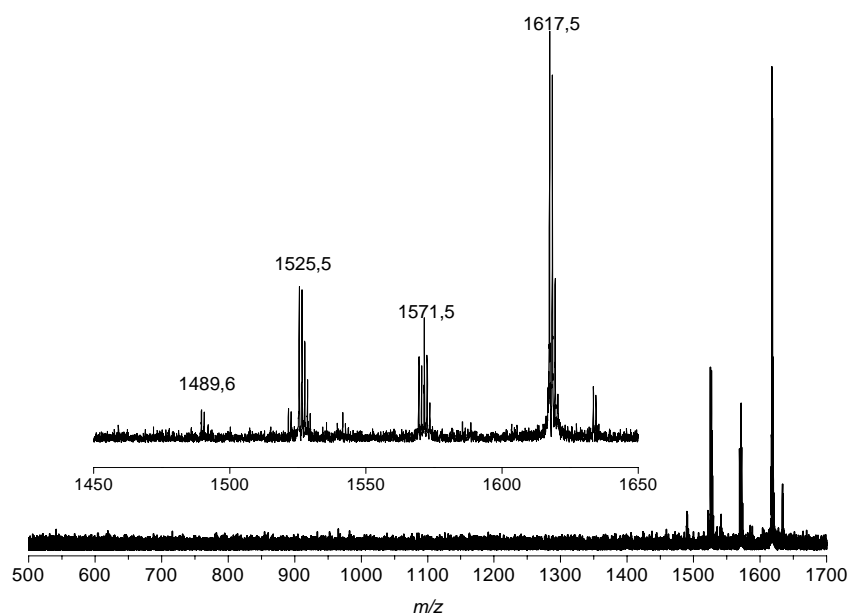


Abbildung 12 ESI-MS Spektrum von **3** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol (0,1 mM) nach der Zugabe von jeweils 0,33 Äquiv. NaI, NaBr und NaCl. Cap-Exit Wert -120 V. $[3-H]^-$ (1489,6); $[3+Cl]^-$ (1525,5); $[3+Br]^-$ (1571,5); $[3+I]^-$ (1617,5).

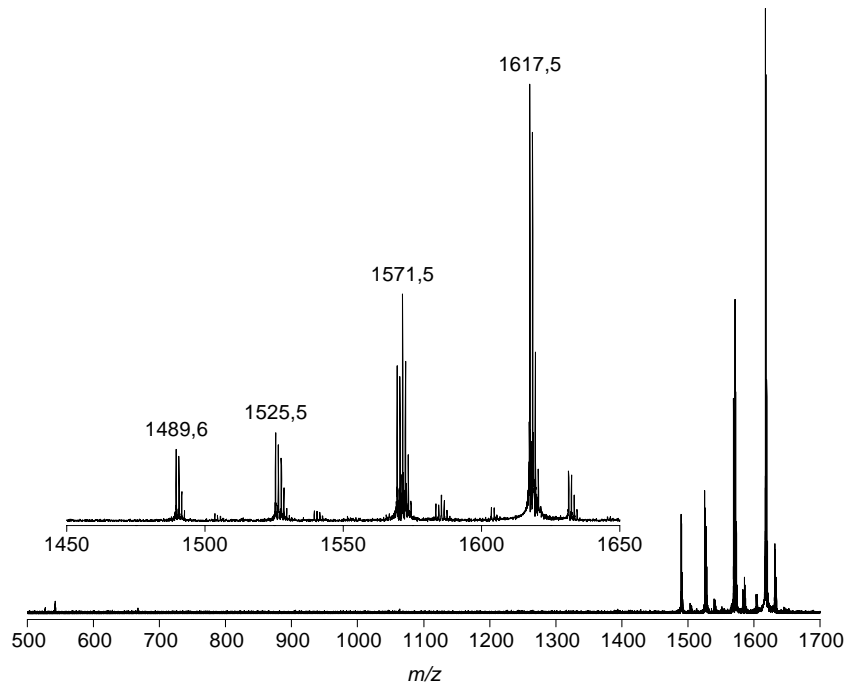


Abbildung 13 ESI-MS Spektrum von **20** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol (0,1 mM) nach der Zugabe von jeweils 0,33 Äquiv. NaI, NaBr und NaCl. Cap-Exit Wert -160 V. $[20-H]^+$ (1489,6); $[20+Cl]^+$ (1525,5); $[20+Br]^+$ (1571,5); $[20+I]^+$ (1617,5).

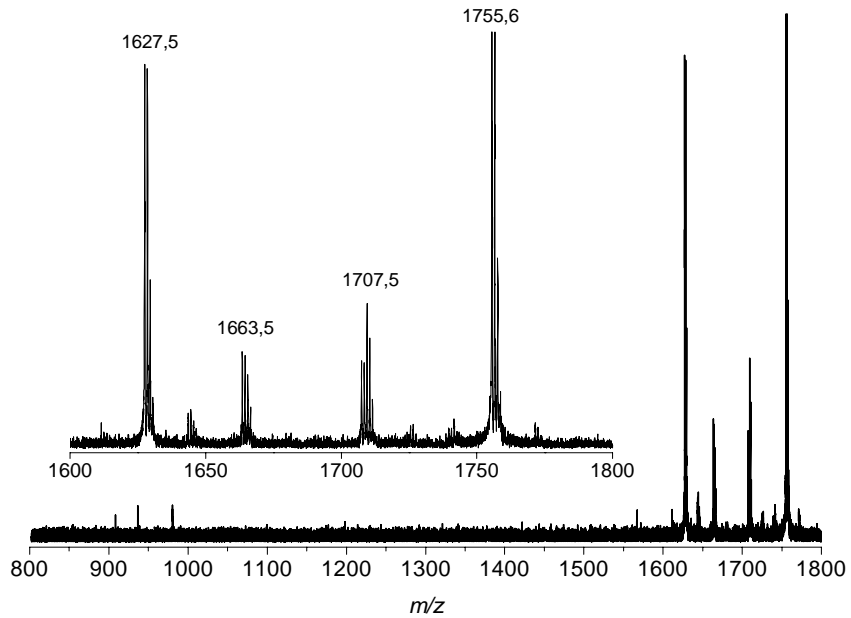


Abbildung 14 ESI-MS Spektrum von **22** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol (0,1 mM) nach der Zugabe von jeweils 0,33 Äquiv. NaI, NaBr und NaCl. Cap-Exit Wert -120 V. $[22-H]^+$ (1627,5); $[22+Cl]^+$ (1663,5); $[22+Br]^+$ (1707,5); $[22+I]^+$ (1755,6).

Die Ergebnisse sollen im Folgenden am Beispiel des Rezeptors **20** näher diskutiert werden. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, sind im Massenspektrum neben einem Peak mit dem m/z -Verhältnis des deprotonierten Rezeptors $[\mathbf{20-H}]^-$ (1489,6) nur drei weitere intensive Peaks zu beobachten, die auf Grund ihrer m/z -Verhältnisse und Isotopenmuster eindeutig 1:1 Komplexen der Zusammensetzung $[\mathbf{20+Cl}]^-$ (1525,5), $[\mathbf{20+Br}]^-$ (1571,5) und $[\mathbf{20+I}]^-$ (1617,5) zuzuordnen sind. Die Bildung von Komplexen höherer Stöchiometrie kann ausgeschlossen werden, da entsprechende Signale im Spektrum nicht zu beobachten sind. Die relativen Intensitäten der beobachteten Signale korrelieren dabei qualitativ mit der für **2** beobachteten Anionenaffinität ($I^- > Br^- > Cl^-$). Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass die Signale nicht auf Addukte zurückzuführen sind, die durch nicht spezifische Wechselwirkungen entstanden sind. Weiterhin wurde ein analoges Massenspektrum auch für die Halogenidkomplexe von Bis(cyclopeptid) **2** beobachtet.²⁹ Die Spektren von Bis(cyclopeptid) **3** und **22** können analog interpretiert werden.

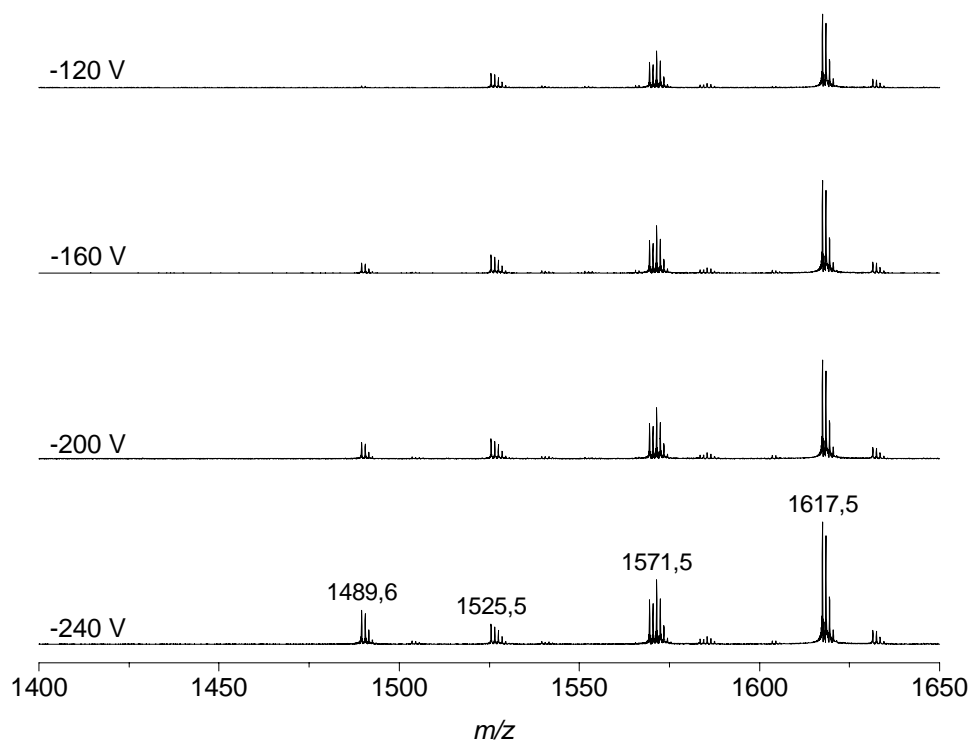


Abbildung 15 ESI-MS Spektrum von **20** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol (0,1 mM) nach der Zugabe von jeweils 0,33 Äquiv. NaI, NaBr und NaCl bei Cap-Exit Werten von -120 V bis -240 V.

Zusätzlich wurden Messungen durchgeführt, in denen die Spannung bei der Ionisation, der so genannten Cap-Exit Wert, variiert wurde (Abbildung 15). Die Erhöhung der Spannung (Erniedrigung des Cap-Exit Werts) verursacht eine Zunahme der Intensität des $[21-H]^-$ Peaks beobachtet. Der $[M-H]^-$ Peak und die Komplexsignale sind auf verschiedene Prozesse zurückzuführen. Ersterer ergibt sich aus einer Deprotonierung des Cyclopeptids, während die Komplexsignale durch Wechselwirkung des Cyclopeptids mit Anionen hervorgerufen werden. Eine Erhöhung des Cap-Exit Werts scheint den Anteil an deprotoniertem Cyclopeptid in Lösung zu erhöhen. Die verbleibende neutrale Form wechselwirkt mit den Anionen. Eine bevorzugte Dissoziation der instabileren Komplexe (z.B. des Chloridkomplexes) bei Erhöhung des Cap-Exit Werts wurde nicht beobachtet.

Ein weiteres Indiz für die Wechselwirkung der Bis(cyclopeptide) mit Anionen in wässrigen Lösungen gibt die 1H -NMR Spektroskopie. In früheren Untersuchungen wurde beobachtet, dass es bei Bindung von Anionen durch Cyclopeptid **1** und Bis(cyclopeptid) **2** zu einem deutlichen Tieffeldshift der Signale der $H(\alpha)$ -Protonen der Prolineinheiten von den Rezeptoren kommt. Die Kristallstruktur des Iodidkomplexes von **1** (Abbildung 16) gibt Hinweise auf die Ursachen von diesem Einfluss. So kommen im Komplex die $H(\alpha)$ -Protonen in räumliche Nähe des gebundenen Anions und die Entschirmung der Protonen ist dementsprechend auf die elektronische Abstoßung der Elektronen der $H(\alpha)$ -Protonen durch die Ladungsdichte des negativ geladenen Gastes zurückzuführen.

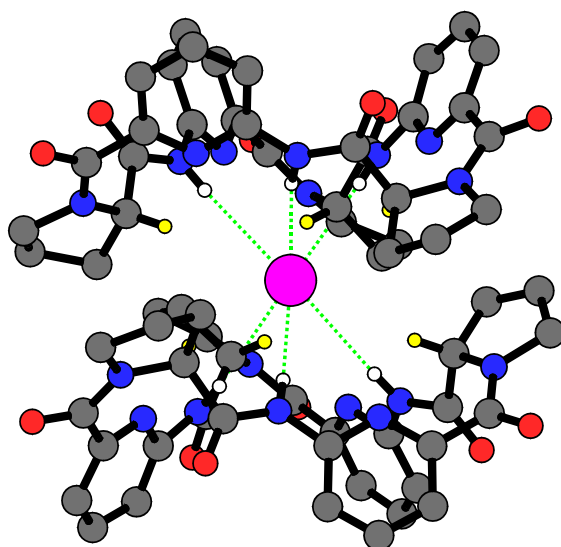


Abbildung 16 Kristallstruktur eines Komplexes von **1** mit Iodid. Die $H(\alpha)$ -Protonen der Cyclopeptide wurden in gelb hervorgehoben.

Alle untersuchten Rezeptoren zeigten in ihren ^1H -NMR Spektren in 1:1 (v/v) $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ in Anwesenheit von Natriumsulfat ebenfalls den charakteristischen Tieffeldshift der $\text{H}(\alpha)$ -Protonen (Abbildung 17 bis Abbildung 19). Daraus kann man schließen, dass das Sulfatanion von diesen Bis(cyclopeptiden) auf ähnliche Weise gebunden wird wie von **2**.

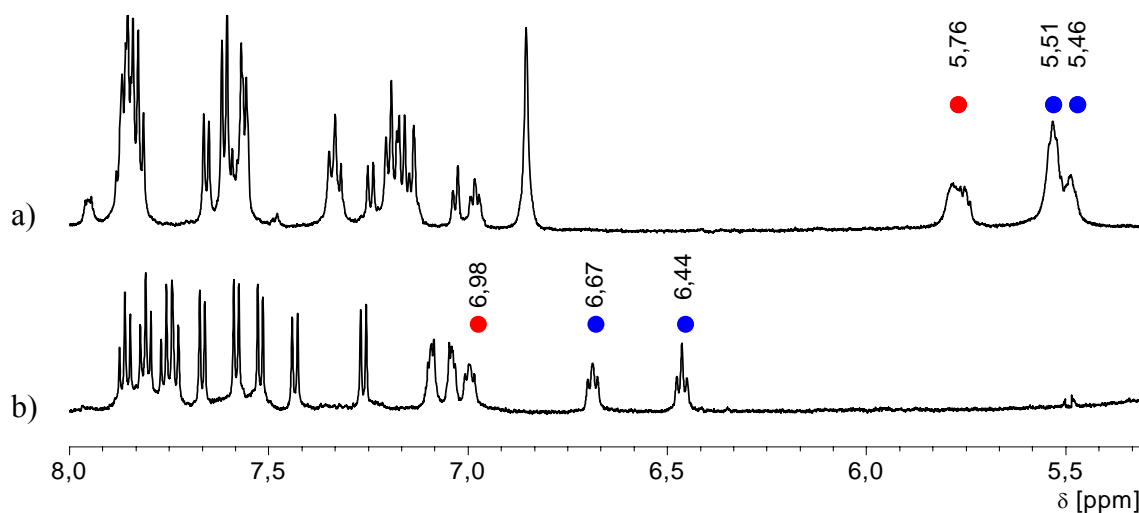


Abbildung 17 NMR-Spektren von **3** (1 mM) ohne Gast (a) bzw. mit 5 Äquiv. Natriumsulfat (b) in 1:1 (v/v) $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$. Die Signale der Protonen an den $\text{H}(\alpha)$ -Signalen von Aminoprolin und Prolin wurden markiert.

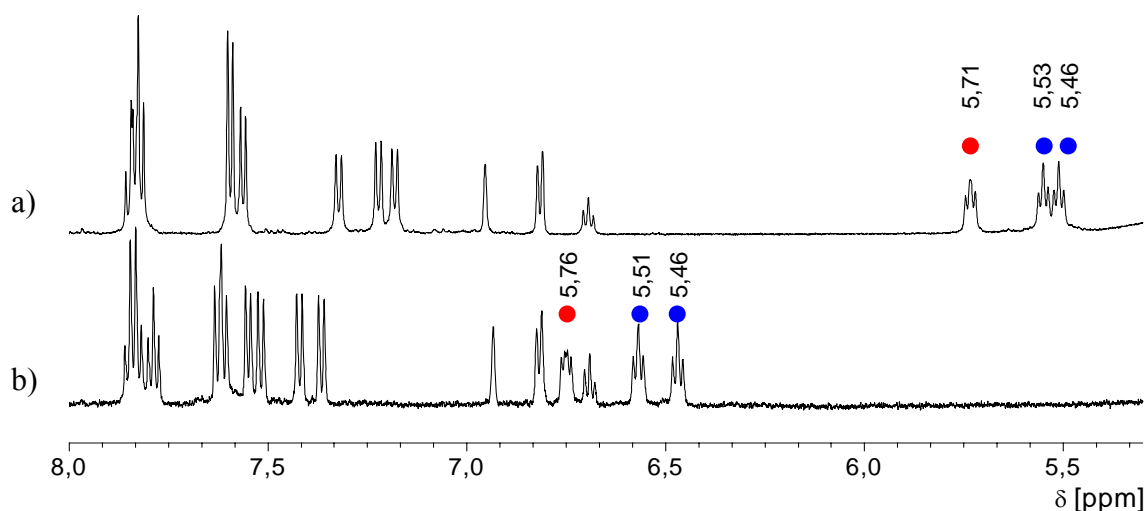


Abbildung 18 NMR-Spektren von **20** (1 mM) ohne Gast (a) bzw. mit 1 Äquiv. Natriumsulfat (b) in 1:1 (v/v) $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$. Die Signale der Protonen an den $\text{H}(\alpha)$ -Signalen von Aminoprolin und Prolin wurden markiert.

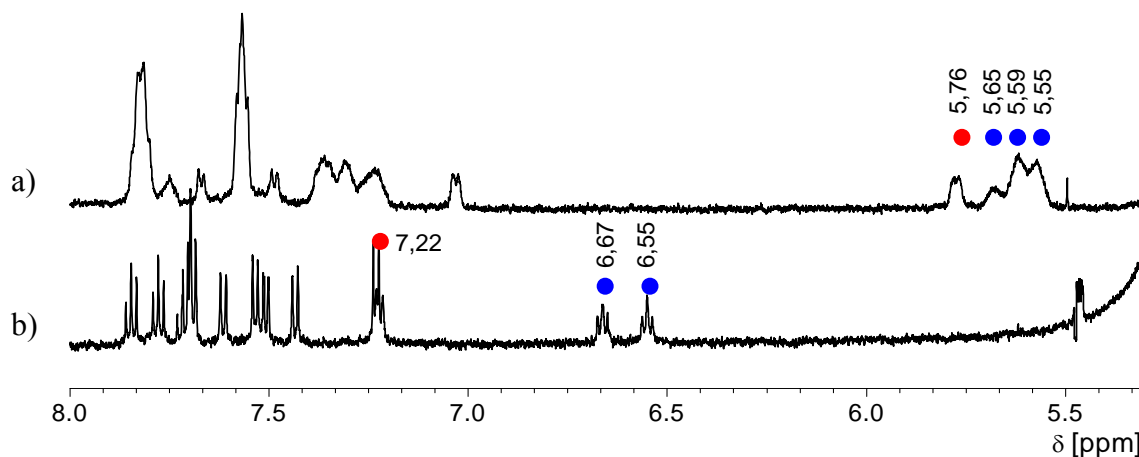
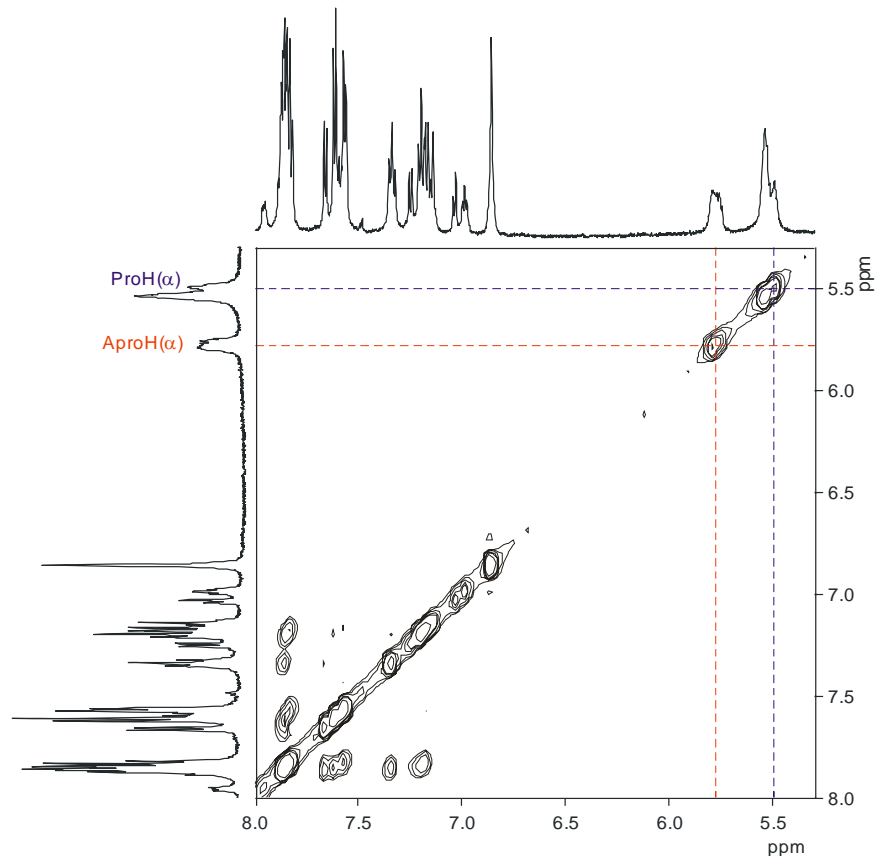


Abbildung 19 NMR-Spektren von **22** (0,25 mM) ohne Gast (a) bzw. mit 5 Äquiv. Natriumsulfat (b) in 1:1 (v/v) $D_2O/MeOD$. Die Signale der Protonen an den $H(\alpha)$ -Signalen von Aminoprolin und Prolin wurden markiert.

Informationen zur Struktur der gebildeten Komplexe in 1:1 (v/v) $D_2O/MeOD$ lieferten 2D-NOESY-NMR Spektren. Für **2** wurde gezeigt, dass im NOESY-NMR Spektrum dieses Rezeptors in Anwesenheit von 2 Äquivalenten Natriumsulfat ein Kreuzpeak zwischen dem $H(\alpha)$ -Signal einer unsubstituierten Prolineinheit und dem des $C(\alpha)$ Protons an der Aminoprolineinheit dieser Bis(cyclopeptids) zu beobachten ist.²⁹ Dieser Kreuzpeak deutet die räumliche Nähe der beiden Protonen im Komplex an, welcher in der berechneten Komplexstruktur eindeutig ersichtlich ist (Abbildung 23). Er kann nur dann auftreten, wenn das Bis(cyclopeptid) im Komplex eine gefaltete Konformation annimmt, in welcher die beiden Cyclopeptidringe in räumliche Nähe gelangen. Ohne gebundenen Gast ist der Abstand der Cyclopeptidringe wahrscheinlich erheblich größer, weswegen kein Kreuzsignal beobachtet wird. Wie für **2** wurde auch für die Sulfatkomplexe der Bis(cyclopeptide) **3**, **20** und **22** in den NOESY-NMR Spektren Kreuzpeaks zwischen den entsprechenden $H(\alpha)$ Signalen beobachtet, die in den NOESY-NMR Spektren der freien Rezeptoren nicht zu beobachten sind (Abbildung 20 bis Abbildung 22). Auch dieses Ergebnis spricht für die analoge Struktur der Anionenkomplexe dieser drei Bis(cyclopeptide) und der von **2**.

a)



b)

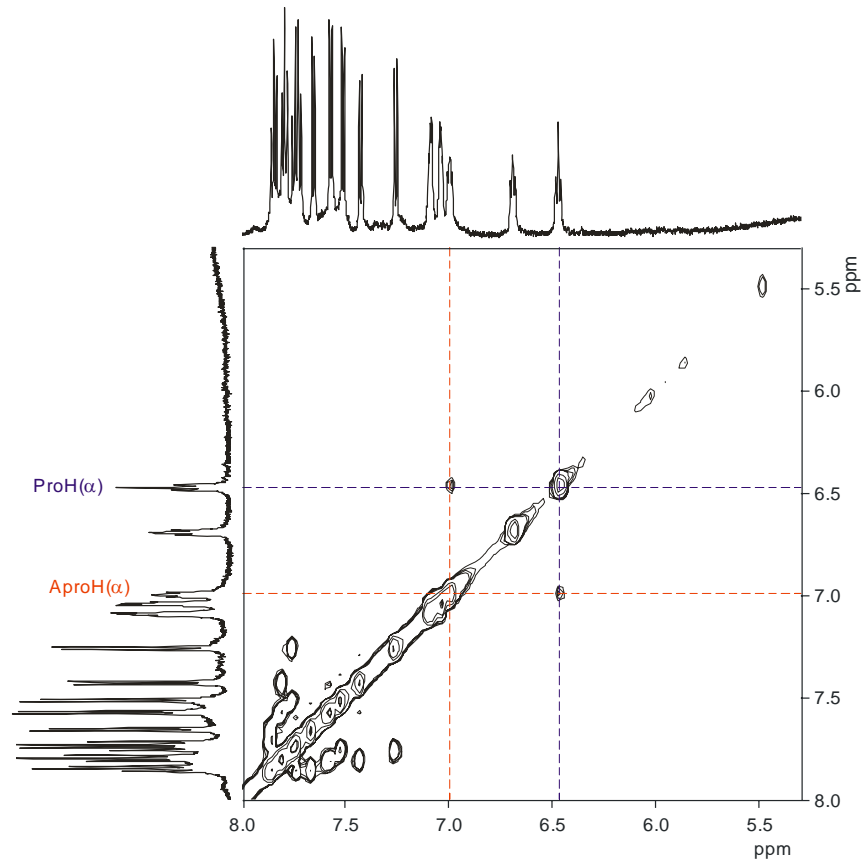


Abbildung 20 2D-NOESY NMR Spektrum von **3** (1mM) a) ohne Gast und b) in Anwesenheit von 5 Äquiv. Natriumsulfat in 1:1 (v/v) D₂O/MeOD. Bereich 8,0-5,3 ppm. Mischzeit 300 ms.

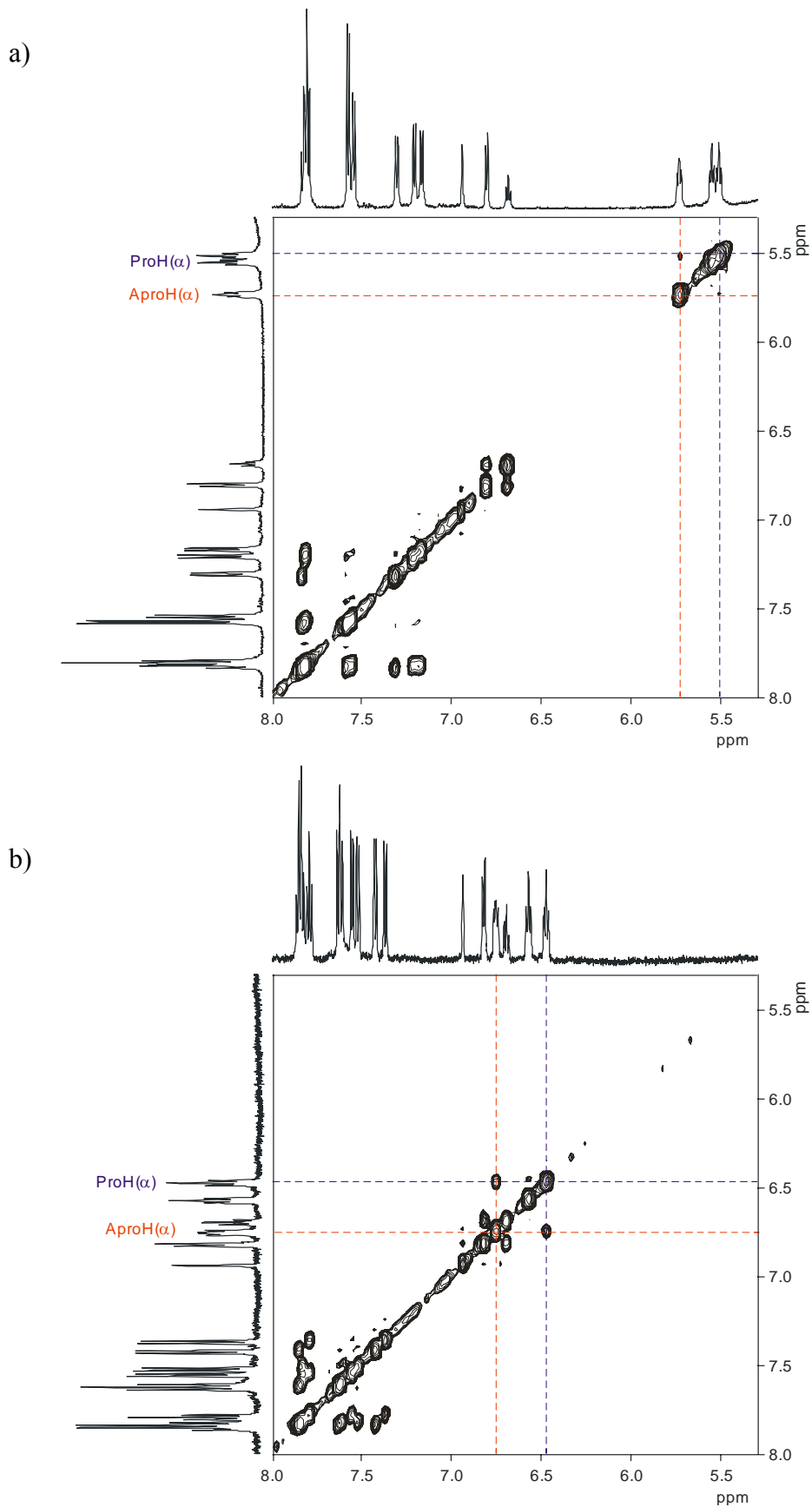


Abbildung 21 2D-NOESY NMR Spektrum von **20** (1mM) a) ohne Gast und b) in Anwesenheit von 1 Äquiv. Natriumsulfat in 1:1 (v/v) $D_2O/MeOD$. Bereich 8,0-5,3 ppm. Mischzeit 300 ms.

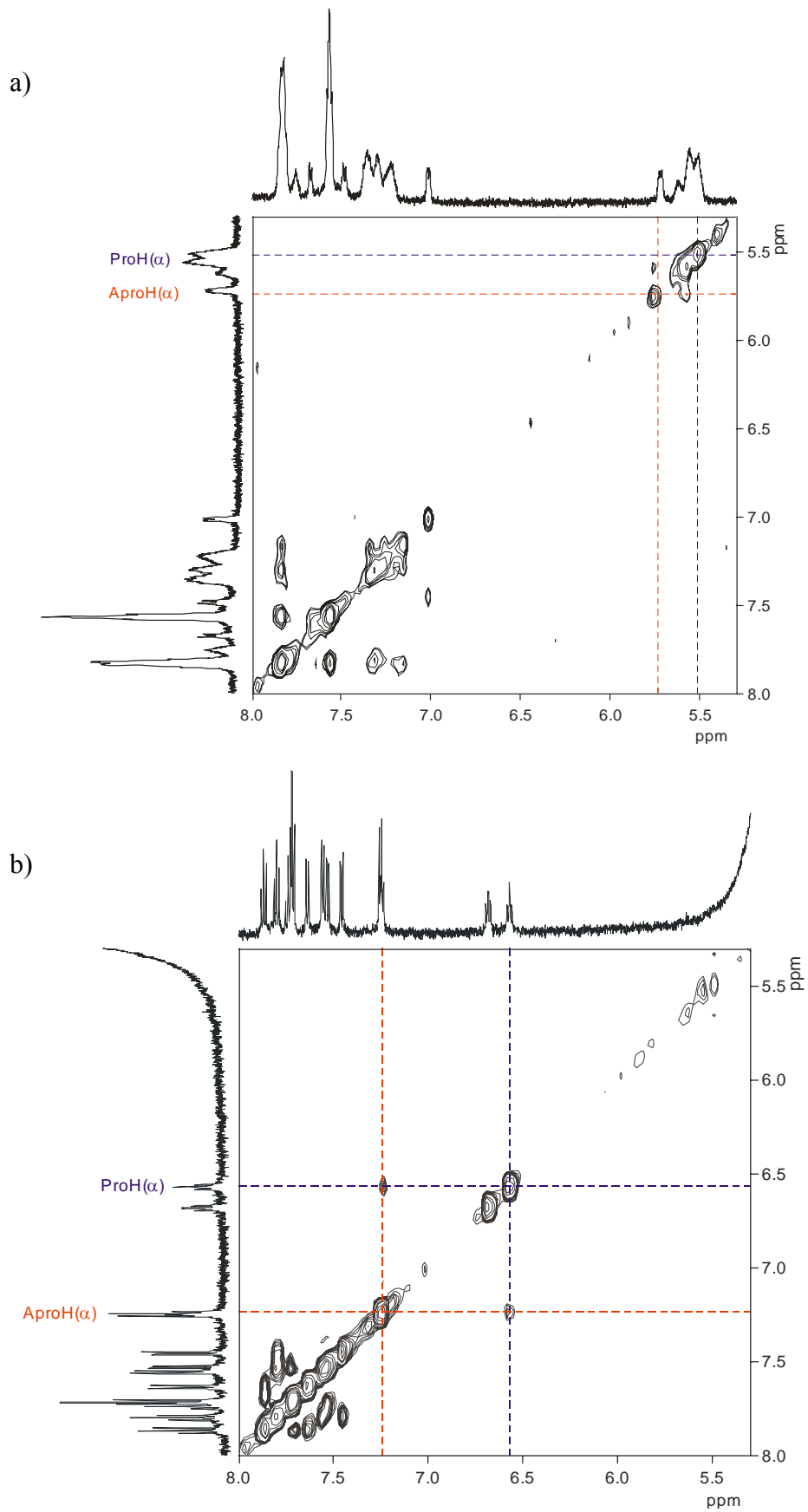


Abbildung 22 2D-NOESY NMR Spektrum von **22** (0,25 mM) a) ohne Gast und b) in Anwesenheit von 1 Äquiv. Natriumsulfat in 1:1 (v/v) D₂O/MeOD. Bereich 8,0-5,3 ppm. Mischzeit 300 ms.

Zur Verdeutlichung wurde exemplarisch die Struktur des Iodidkomplexes von **20** berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt. Diese Struktur steht im Einklang mit den spektroskopischen Befunden. So ist die gefaltete Rezeptorstruktur, die räumliche Nähe des Gastes zu den H(α) Protonen der Cyclopeptidringe und die räumliche Nähe der H(α) Protonen an den Aminoprolineneinheiten zu H(α) Protonen an unsubstituierten Prolineneinheiten in benachbarten Cyclopeptidring eindeutig ersichtlich. Die berechnete Struktur liefert damit ein gutes, wenn auch statisches Bild der gebildeten Komplexe. Sie steht weiterhin im Einklang mit der publizierten Kristallstruktur des Sulfatkomplexes von Bis(cyclopeptid) **24** (siehe Kapitel 2.2.1.3.1).³⁶ Versuche, geeignete Kristalle eines Anionenkomplexes der untersuchten Bis(cyclopeptide) zu erhalten, welche für eine Kristallstrukturanalyse geeignet wären, schlugen leider fehl.

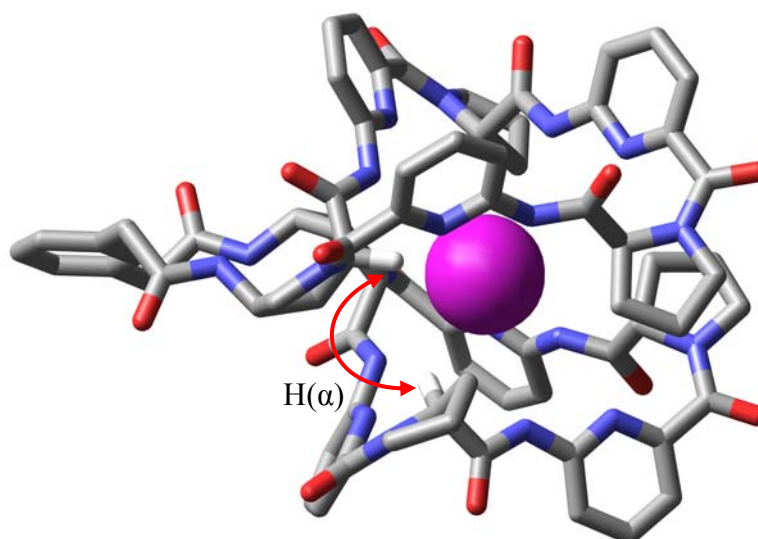


Abbildung 23 Berechnete Struktur des Iodid-Komplexes von **20** (PCModel Serenasoft, Inc. unter Verwendung des MMFF94 Kraftfelds). Wasserstoffatome an C-Atomen des Rezeptors wurden bis auf die H(α)-Protonen an einer Prolin- und einer Aminoprolinuntereinheit zur besseren Übersicht weggelassen. Die räumliche Nähe eines H(α) an einer substituierten Prolineneinheit zu einem H(α) an einer unsubstituierten Prolineneinheit ist durch den roten Pfeil kenntlich gemacht.

2.2.1.3.1 Isotherme Titrations Kalorimetrie

Die Bestimmung der Bindungskonstante eines Komplexes kann mit Hilfe einer NMR-Titration durchgeführt werden, vorausgesetzt es gibt eine Veränderung im NMR-Spektrum von Wirt oder Gast während der Komplexbildung. Die alleinige Bestimmung der Bindungskonstante K_a , wie sie oft bei Untersuchungen von Rezeptor-Gast Wechselwirkungen durchgeführt wird, ist allerdings häufig unbefriedigend. Man erhält zwar eine Quantifizierung der Bindungsstärke und damit einen Hinweis auf die Effizienz des Systems, aber keine Informationen über die thermodynamischen Ursachen der Komplexbildung. Die thermodynamischen Größen Enthalpie H und Entropie S sind aber wichtige Kennwerte für das genaue Verständnis des Komplexbildungsgleichgewichts. Die Kenntnis dieser Größen kann eine gezielte Optimierung von Rezeptoren erleichtern.

Zur Bestimmung von ΔH und ΔS bei der Komplexbildung können z.B. temperaturabhängige NMR-Experimente durchgeführt werden. Unter Zuhilfenahme der van't Hoff Gleichung können aus der Temperaturabhängigkeit der Stabilitätskonstante die thermodynamischen Parameter berechnet werden. Schneller und genauer sind diese Parameter allerdings mit der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) zugänglich. Bei dieser Methode bestimmt man direkt den Wärmeumsatz während der Komplexbildung. Man erhält als Ergebnis die Stabilitätskonstante des Komplexes K_a , ΔH und die Anzahl gleichwertiger Bindungsstellen (n). Die Kenntnis dieser Daten erlaubt dementsprechend die Berechnung von ΔS mit der Gibbs-Helmholtz-Gleichung. Man erhält also mit einer einzigen Messung alle relevanten thermodynamischen Daten zur Beschreibung des Rezeptor-Gast Systems. Dies macht die ITC zu einer weit verbreiteten Messmethode für die Quantifizierung von Erkennungsprozessen in biologischen und synthetischen supramolekularen Systemen. Seit ihrer Einführung 1989 durch die Firma MicroCal wurde die ITC bis Ende 2005 in 2300 Publikationen zitiert. Diese außerordentlich hohe Zahl an Publikationen zeigt die Relevanz der Methode für die Forschung. In meiner Dissertation habe ich ebenfalls ITC Messungen durchgeführt, um die von mir dargestellten Systeme vollständig bezüglich ihrer Bindungseigenschaften zu charakterisieren.

Bei einem ITC Experiment wird üblicherweise der Rezeptor in der Messzelle vorgelegt und der Gast über multiple Injektionen hinzugefügt. Dabei wird die entstehende Wärme der Komplexierung bei jeder Injektion durch Messung des Stroms, der nötig ist, um die Temperaturdifferenz zwischen Mess- und Referenzzelle auf Null zu bringen quantifiziert. Im Falle einer endothermen Reaktion muss dem Thermoelement der Messzelle Strom zugeführt

werden, im Falle einer exothermen Reaktion wird weniger Strom benötigt. Der gemessene Strom für das Thermoelement kann mit der während der Reaktion abgegebenen bzw. aufgenommenen Wärme ΔQ korreliert werden. Die Ausschlagsrichtung des Messsignals ist abhängig von der Darstellungsweise, verläuft aber in den meisten Fällen für exotherme Reaktionen zu kleineren, negativen Werten, während sie bei endothermen Reaktionen dementsprechend gegenläufig ist. Um kleinste Temperaturunterschiede messen zu können, ist es wichtig, dass sich die Messzelle und Referenzzelle in einem adiabatischen System befinden, damit ein Austausch von Wärme mit der Umgebung ausgeschlossen werden kann. Der schematische Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters ist in Abbildung 24 zu sehen.

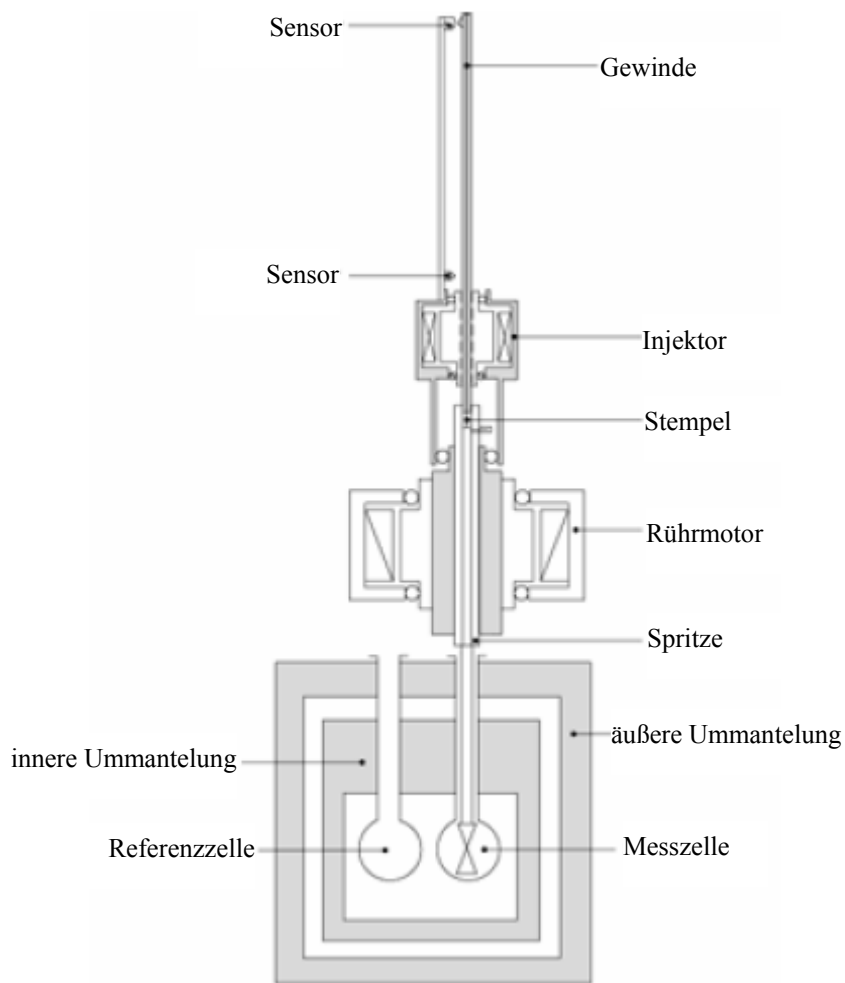


Abbildung 24 Schematischer Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters.

Bei Zugabe eines Gasts zur Rezeptorlösung kommt es durch den Wärmeumsatz der Reaktion also zu einem Ausschlag der Messkurve, welcher nach der Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts wieder verschwindet. Die Fläche des so entstandenen Peaks entspricht dem Wärmeumsatz während der Injektion, der mit der Reaktionsenthalpie korreliert werden kann. Wenn man die bei der Titration erhaltenen Enthalpien gegen den Molenbruch aufträgt, erhält man im Idealfall eine sigmoide Kurve, aus der durch nicht-lineare Kurvenanpassung die Bindungskonstante K_a , die Gesamtenthalpie der Reaktion und die Anzahl gleicher Bindungsstellen des Komplexes ermittelt werden (Abbildung 25) können.

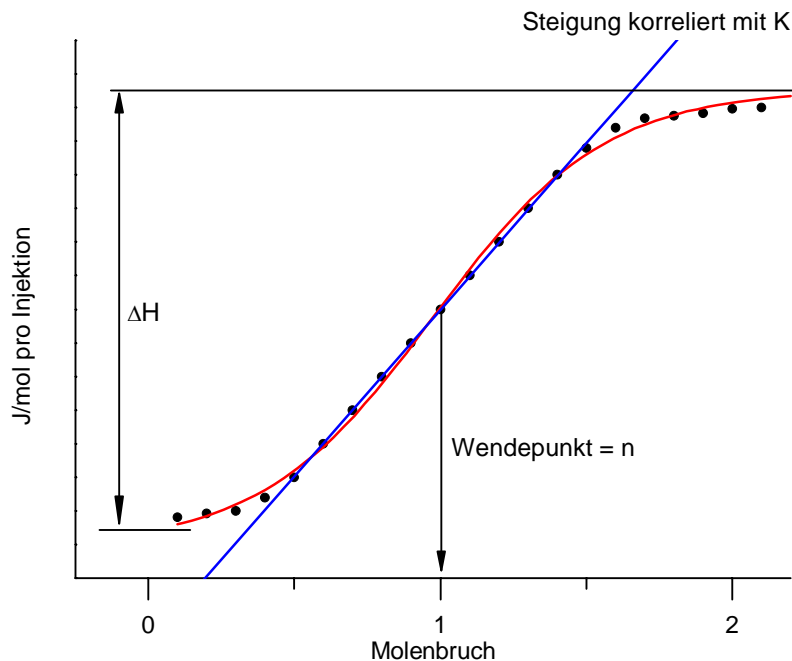


Abbildung 25 Exemplarische Titrationskurve eines ITC-Experiments. rot = Fit der Kurve; blau = Steigung korreliert mit K_a ; n = Anzahl gleichwertiger Bindungsstellen.

Mit Hilfe der Beziehung $\Delta G = -RT \ln(K_a)$ und der Gibbs-Helmholtz-Gleichung $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ lässt sich aus diesen Daten die Reaktionsentropie ΔS berechnen.

Für die Auswertung sollte am besten die Stöchiometrie des untersuchten Komplexes bekannt sein, um den richtigen mathematischen Algorithmus zum Fit der Messdaten auszuwählen. So sind unterschiedliche Algorithmen nötig, wenn es sich bei dem untersuchten System um einen Rezeptor mit zwei Bindungsstellen handelt, welche unterschiedliche Affinitäten zum Substrat besitzen oder um einen Rezeptor mit zwei gleichen Bindungsstellen. Im Folgenden wird der für die hier durchgeführten Messungen verwendete Fitalgorithmus näher erläutern.

Das Massenwirkungsgesetz für einen 1:1-Komplex wird durch Formel (1) beschrieben.

$$K_a = \frac{[RS]}{[R][S]} \quad (1)$$

Dabei steht $[RS]$, $[R]$ und $[S]$ für die Konzentrationen von Komplex, Rezeptor und Substrat im Gleichgewicht. Der Anteil der von vom Substrat besetzten Bindungsstellen Θ kann wie folgt beschrieben werden.

$$\Theta = \frac{[RS]}{[R]_t} \quad (2)$$

bzw. unter Verwendung der Massenbilanz $[R]_t = [R] + [RS]$ mit

$$\Theta = \frac{[RS]}{[R] + [RS]} \quad (3)$$

Damit kann das Massenwirkungsgesetz zu

$$K_a = \frac{\Theta}{(1 - \Theta)[S]} \quad (4)$$

umformuliert werden.

Die Massenbilanz für das Substrat lautet

$$[S]_t = [S] + n\Theta[RS]_t \quad (5)$$

wobei n die Anzahl gleichwertiger Bindungsstellen im Rezeptor darstellt. Nach Einsetzen in 4 und Umformen erhält man die folgende quadratische Gleichung:

$$\Theta^2 - \Theta \left(1 + \frac{[S]_t}{n[R]_t} + \frac{1}{nK_a[R]_t} \right) + \frac{[S]_t}{n[R]_t} = 0 \quad (6)$$

Auflösen nach Θ , der einzige Unbekannte in dieser Gleichung, ergibt folgende Beziehung

$$\Theta = \frac{1}{2} \left[1 + \frac{[S]_t}{n[R]_t} + \frac{1}{nK_a[R]_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{[S]_t}{n[R]_t} + \frac{1}{nK_a[R]_t} \right)^2 - \frac{4[S]_t}{n[R]_t}} \right] \quad (7)$$

Die gesamte Wärmemenge Q der Lösung, welche im Volumen V_0 der Zelle gemessen wird, kann durch Gleichung 8 beschrieben werden

$$Q = n\Theta[R]_t \Delta H V_0 \quad (8)$$

Damit korreliert Q mit n, $[R]_t$, $[S]_t$, ΔH , V_0 und K_a gemäß der Gesamtgleichung 9.

$$Q = \frac{n[R]_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{[S]_t}{n[R]_t} + \frac{1}{nK_a[R]_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{[S]_t}{n[R]_t} + \frac{1}{nK_a[R]_t} \right)^2 - \frac{4[S]_t}{n[R]_t}} \right] \quad (9)$$

Allerdings wird bei der Titration nicht die Gesamtwärmetönung der Reaktion, sondern die Wärmet bei inkrementeller Zugabe der Substratlösung aufgenommen. Die Wärmetönung der vorhergehenden Reaktionen muss also bei i-ten Reaktion mit berücksichtigt werden. Deswegen folgt für die Wärmeentwicklung bei der i-ten Injektion $\Delta Q(i)$:

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (10)$$

Durch Variation von K_a und n im Sinne einer nicht linearen Regression berechnet man gemäß dieser Gleichung für jeden Datenpunkt nun ΔQ so lange bis die berechneten Werte experimentellen optimal beschreiben.

Beim Design eines Experiments, d.h. bei der Wahl der verwendeten Konzentrationen von Wirt und Gast müssen einige Faktoren berücksichtigt werden. Sind die Konzentrationen des Gasts und des Rezeptors im Verhältnis zur Bindungskonstante des Komplexes sehr klein, erhält man keine sigmoide Titrationskurve, sondern eine stark abgeflachte (Abbildung 26).

Mit einer solchen Kurve kann keine verlässliche nicht lineare Regression durchgeführt werden. Als Kenngröße zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Konzentration und Bindungskonstante wurde der so genannte C-Wert eingeführt, der sich aus folgendem mathematischen Zusammenhang ergibt.

$$C = [R]_t \cdot n \cdot K_a \quad (11)$$

Der so definierte C-Wert sollte idealerweise zwischen 5 und 500 liegen, wenn bei einer Titration bis zu 2 Äquivalente des Gastes zugegeben werden, um einen sigmoiden Verlauf der Titrationskurve zu erhalten (Abbildung 26). Unter dieser Voraussetzung erhält man eine verlässlich auswertbare Messung. Wenn der C-Wert < 5 beträgt, so können ebenfalls akkurate Daten erhalten werden, allerdings reicht eine Gastzugabe von 2 Äquivalenten nun nicht mehr aus.³⁷ Idealerweise sollte die Titrationskurve bis 80-90 % der maximalen Konzentration des Komplexes aufgenommen werden. Bei sehr kleinen C-Werten muss die Stöchiometrie des Komplexes außerdem bekannt sein und kann nicht mehr aus dem Kurvenverlauf berechnet werden.

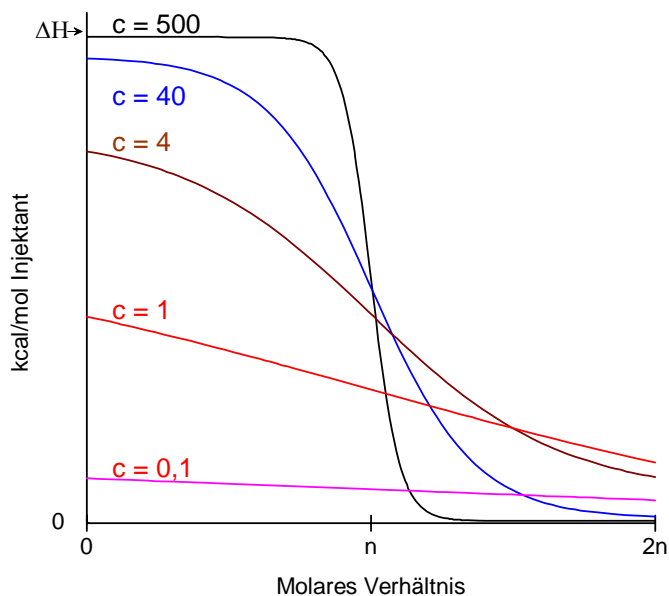


Abbildung 26 Theoretische Titrationskurven mit c -Werten von a) 500, b) 40, c) 4, d) 1, e) 0,1.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die thermodynamischen Daten der Bindung verschiedener anorganischer Anionen durch die einfach verbrückten Bis(cyclopeptiden) **3**, **20** und **22** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol-Gemischen mittels ITC ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die in der Tabelle angegebenen Werte wurden durch mindestens drei voneinander unabhängige Messungen bestimmt und darüber gemittelt. Das Gegenion war in allen Fällen Natrium. Die typische Titrationskurve einer solchen Messung ist in Abbildung 27 dargestellt.

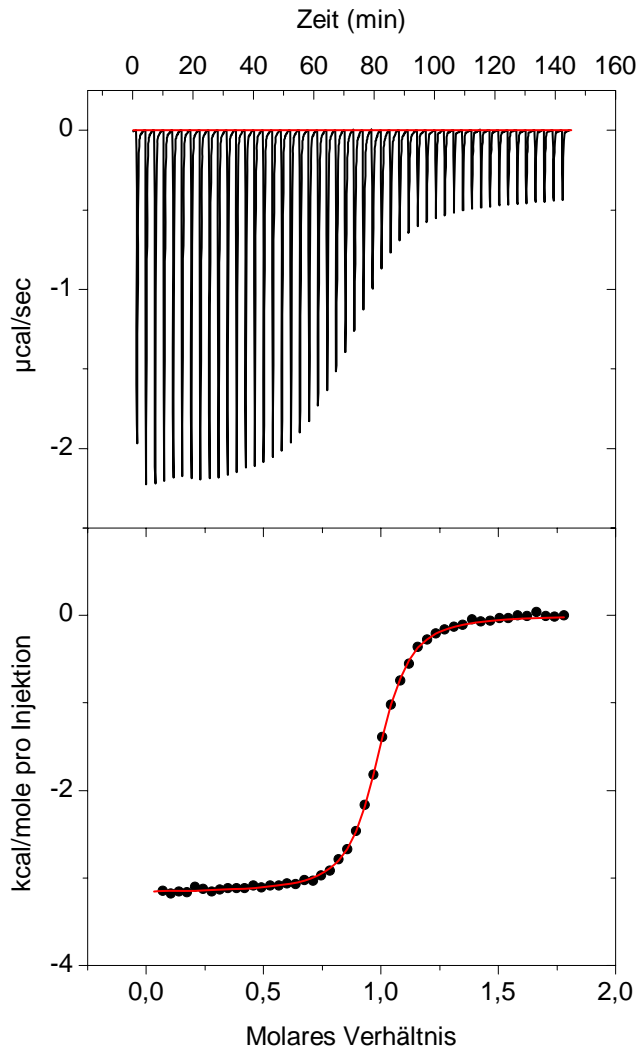


Abbildung 27 ITC-Messung der Komplexbildung zwischen **20** (0,25 mM) und Na_2SO_4 (2,5 mM) in 50 % Wasser/Methanol bei 298 K. Die obere Hälfte der Abbildung zeigt die durch die Injektion der Salzlösung in die Rezeptorlösung auftretenden Wärmetönungen. Die Messpunkte in der unteren Hälfte der Abbildung entsprechen den Integralen der einzelnen Peaks in der obigen Kurve. Die rote Kurve zeigt den Fit der Messdaten.

Theoretischer Teil

Tabelle 1 Thermodynamische Daten der Komplexbildung von Sulfat, Iodid, Bromid und Chlorid durch die verbrückten Bis(cyclopeptide) **2**, **3**, **20** und **22** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol bei 298 K. Die Fehlergrenzen der Messdaten sind angegeben. ΔG , ΔH und $T\Delta S$ in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Die Werte für **2** mit Iodid, Bromid und Chlorid sind der Literatur entnommen und zum Vergleich aufgeführt.²⁹

		2	3	20	22
SO ₄ ²⁻	log K_a	5,28 ± 0,10	5,10 ± 0,05	5,97 ± 0,02	5,32 ± 0,06
	ΔG	-30,2 ± 0,2	-29,2 ± 0,3	-34,1 ± 0,4	-30,3 ± 0,2
	ΔH	-15,5 ± 0,4	-13,5 ± 0,3	-13,2 ± 1,1	-8,6 ± 0,5
	$T\Delta S$	14,7 ± 0,6	15,7 ± 0,5	20,9 ± 1,2	21,7 ± 0,7
I ⁻	log K_a	3,79 ± 0,26	4,00 ± 0,03	4,43 ± 0,11	3,61 ± 0,07
	ΔG	-21,6 ± 2,5	-22,7 ± 0,3	-25,2 ± 1,1	-20,6 ± 0,4
	ΔH	-13,2 ± 1,0	-9,1 ± 0,2	-15,4 ± 0,7	-4,2 ± 1,5
	$T\Delta S$	8,4 ± 2,5	13,6 ± 0,2	9,8 ± 1,2	15,4 ± 3,4
Br ⁻	log K_a	3,45 ± 0,39	3,30 ± 0,04	4,01 ± 0,03	3,03 ± 0,14
	ΔG	-19,7 ± 2,2	-19,0 ± 0,2	-22,9 ± 0,2	-17,3 ± 0,8
	ΔH	-11,2 ± 0,9	-6,2 ± 0,6	-12,1 ± 1,7	-4,0 ± 0,4
	$T\Delta S$	8,5 ± 3,1	12,8 ± 0,8	10,8 ± 1,9	13,3 ± 1,0
Cl ⁻	log K_a	2,51 ± 0,86	1,86 ± 0,14	3,39 ± 0,08	
	ΔG	-14,2 ± 4,9	-10,6 ± 0,8	-19,3 ± 0,5	n.b. ^a
	ΔH	-10,5 ± 1,5	-3,4 ± 1,1	-4,1 ± 1,2	
	$T\Delta S$	3,8 ± 6,4	7,2 ± 1,5	15,2 ± 1,5	

^a nicht bestimmbar

Tabelle 1 zeigt, dass in dem verwendeten Lösungsmittelgemisch immer eine exotherme Komplexbildung mit einem positiven entropischen Beitrag beobachtet wurde, außer im Falle von Rezeptor **22** mit Chlorid. Die entstehende Wärmetönung bei dieser Titration war zu klein, um eine quantitative Auswertung zuzulassen. Dies weist nicht unbedingt auf eine schwache Bindung hin, der Trend der anderen Ergebnisse legt jedoch nahe, dass es sich bei diesem Komplex tatsächlich um den am wenigsten stabilen handelt.

Wie in Tabelle 1 zu erkennen ist, wird die Stabilität der Komplexe in einigen Fällen im Wesentlichen durch den Enthalpiebeitrag bestimmt. Die entropischen Beiträge spielen in diesen Fällen nur eine weniger bedeutsame Rolle, liefern aber einen zusätzlichen günstigen Beitrag zur Gesamtstabilität. Bei anderen Komplexen ist der enthalpische und entropische Beitrag fast gleich groß oder der entropische Beitrag sogar größer als der enthalpische. Auf Grund dieser komplexen Abhängigkeiten ist es sinnvoll, die Daten mit Hilfe einer graphischen Darstellung zu analysieren (Abbildung 28). In den entsprechenden Graphen wurden die Rezeptoren auf der x-Achse mit zunehmender Anzahl der Kohlenstoffatome im Linker und zunehmender Rigidität angeordnet. Die für Chlorid ermittelten Werte wurden in die Graphen nicht aufgenommen, da sie für Rezeptor **22** nicht vorliegen und daher kein Vergleich zu den anderen Rezeptoren möglich ist.

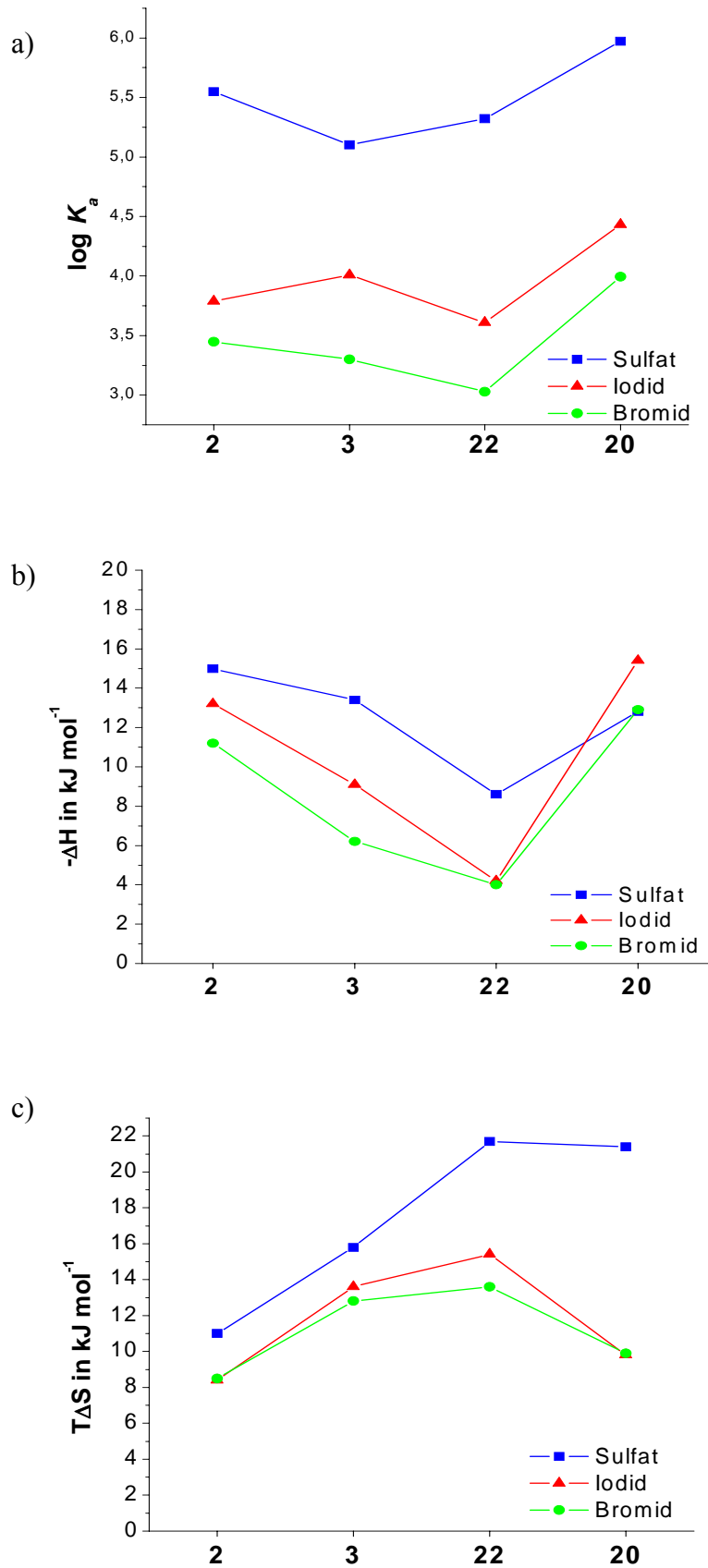


Abbildung 28 Graphische Darstellung der Abhängigkeit von a) $\log K_a$, b) ΔH und c) $T\Delta S$ bei der Bildung der Sulfat, Iodid und Bromidkomplexe von der Struktur der Rezeptoren 2, 3, 20 und 22.

Wie in Abbildung 28 a) zu erkennen ist, sinkt die Anionenaffinität aller untersuchten Rezeptoren von Sulfat über Iodid zu Bromid. Die Reihenfolge weicht von der ab, die man erwarten würde, wenn alleine die Stärke der Wechselwirkung der Anionen mit den NH-Gruppen des Cyclopeptids für die Komplexstabilität verantwortlich wäre (Sulfat > Chlorid > Bromid > Iodid). In einer früheren Veröffentlichung begründete Kubik diese Beobachtung mit der besseren räumlichen Komplementarität zwischen den größeren Anionen Sulfat (Ionenradius 230 pm)³⁸ und Iodid (Ionenradius 220 pm)³⁸ und dem zur Verfügung stehenden Hohlraum zwischen den Cyclopeptiduntereinheiten der Rezeptoren.²⁹ Hierfür sprechen auch die günstigeren Enthalpiebeiträge bei der Bildung der Sulfat- und Iodidkomplexe im Vergleich zu den anderen Anionen.

Der Vergleich der Assoziationskonstanten $\log K_a$ zeigt, dass sich die Anionenaffinität der untersuchten Bis(cyclopeptide) für jedes Anion um maximal eine Größenordnung unterscheiden. So bindet der für alle Anionen effizienteste Rezeptor **20** Sulfat ca. 5mal, Iodid ca. 4,5mal, Bromid 3,6mal und Chlorid ca. 8mal besser als **2**. Dabei stellt die Bindungskonstante des Sulfatkomplexes von **20** mit einem $\log K_a$ von etwa 6,0 in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol einen der höchsten literaturbekannte Werte für einen neutralen Sulfatrezeptor in wässrigen Lösungsmitteln dar.^{34,39-42}

Obwohl die Bindungskonstanten sich nicht signifikant unterscheiden, unterscheiden sich die Enthalpie- und Entropiebeiträge zur Komplexbildung der untersuchten Rezeptoren deutlich. Bei genauerer Betrachtung der Enthalpie- und Entropie-Werte zeigt sich, dass die Affinität von **2** hauptsächlich von dem enthalpischen Beitrag (51 bis 73 % zur Bindung) bestimmt wird. Auch im Falle des besten Rezeptors **20** bestimmt der enthalpische Beitrag die Affinität für das Anion. Eine Ausnahme stellt die Sulfatbindung dar, bei welcher die Entropie 61 % zur Bindung beiträgt. Die Bindung bei Rezeptor **3** hingegen wird im Wesentlichen durch entropische (54 bis 69 % zur Bindung) Einflüsse hervorgerufen. Die bereits in meiner Diplomarbeit festgestellte höhere Bindungsaffinität von Iodid durch **3** im Verhältnis zu **2** kann nun eindeutig einem entropischen Effekt zugeschrieben werden und wird nicht durch die gute Passform von Iodid hervorgerufen wie es noch während meiner Diplomarbeit vermutet wurde. Wäre dies der Fall, müsste der enthalpische Beitrag des $[3 \cdot I]^-$ -Komplexes größer als bei dem $[2 \cdot I]^-$ -Komplex sein. Die Affinität des rigidesten Rezeptors **22** wird ebenfalls mit 70 bis 80 % durch den entropischen Beitrag bestimmt. Durch die Verringerung der Rotationsfreiheitsgrade wird also tatsächlich der entropische Beitrag günstig beeinflusst und liefert bei Komplexbildung eines Anions mit **3** oder **22** den Hauptanteil zur Bindung. Leider wird in den meisten Fällen die Enthalpie der Komplexbildung so ungünstig, dass die Affinität

dieser Rezeptorengegenüber **2** abnimmt (Enthalpie-Entropie Kompensation⁴³). Es scheint somit, dass die enthalpischen Beiträge einen größeren Einfluss auf die Anionenaffinität der Rezeptoren haben als die entropischen. Die außergewöhnlich hohe Affinität von Rezeptor **20** scheint durch einen guten Kompromiss aus der konformationellen Starrheit und einer sehr guten Anpassung für die Anionen hervorgerufen zu werden.

Ein ungewöhnliches Phänomen tritt bei dem $[20 \cdot I]^-$ -Komplexe auf. Vergleicht man die Enthalpie- und Entropie-Werte dieses Komplexes mit denen des flexibelsten Rezeptors **2**, so kann man feststellen, dass beide Terme für $[20 \cdot I]^-$ höher als für $[2 \cdot I]^-$ sind. Der günstige Enthalpiebeitrag bei Rezeptor **20** wird wahrscheinlich durch eine bessere Passform von Iodid in der Bindungshöhle hervorgerufen. Normalerweise hätte man nun auf Grund der Enthalpie-Entropie Kompensation erwarten müssen, dass durch die stärkere Wechselwirkung zwischen Gast und Wirt der entropische Beitrag zur Komplexbildung ungünstig beeinflusst wird.⁴⁴⁻⁴⁸ Dies ist aber hier nicht der Fall, weswegen der Iodidkomplex von **20** im scheinbaren Widerspruch zur Vorstellung von der Enthalpie-Entropie Kompensation steht. Eine Erklärung für den außergewöhnlichen Entropiegewinn ist allerdings schwierig. Es muss berücksichtigt werden, dass die beobachtete Entropie ΔS_{obs} sich aus verschiedenen Termen zusammensetzt (siehe Formel 12).⁴⁹ Dabei steht $\Delta S_{\text{intrinsisch}}$ für die Entropiebeiträge, die durch Veränderung von Freiheitsgraden im Rezeptor, wie der Schwingungen oder Rotationen der Moleküle ($\Delta S_{\text{Translation+Rotation}}$) bei Komplexbildung hervorgerufen werden. $\Delta S_{\text{Konfiguration}}$ bezieht sich auf Änderungen in der geometrischen Anordnung der Konformation der Bindungspartner. $\Delta S_{\text{Lösungsmittel}}$ beschreibt schließlich den Anteil der Entropie den die Reorganisation von Lösungsmittelmolekülen zur Komplexstabilität beisteuert. Diese Beiträge können noch nicht experimentell voneinander separiert ermittelt werden, weswegen eine genaue Klärung der Ursache für die hohe Bindungsentropie des Iodidkomplexes von **20** zurzeit noch nicht möglich ist. Vermutlich ist der Grund ein kompliziertes Zusammenspiel aller Faktoren.

$$\begin{aligned} \Delta S_{\text{obs}} &= \Delta S_{\text{intrinsisch}} + \Delta S_{\text{Lösungsmittel}} & (12) \\ &= \Delta S_{(\text{Translation} + \text{Rotation})} + \Delta S_{\text{Schwingung}} + \Delta S_{\text{Konfiguration}} + \Delta S_{\text{Konformation}} + \Delta S_{\text{Lösungsmittel}} \end{aligned}$$

Für den besten Rezeptor **20** wurde zusätzlich die Komplexbildung von NO_3^- , ClO_4^- , F^- und ReO_4^- im selben Lösungsmittelgemisch untersucht. Diese Anionen wurden aus unterschiedlichen Gründen ausgewählt. Untersuchungen haben gezeigt, dass Nitrat und Perchlorat von **2** gebunden werden. Nitrat ist zudem ein umweltrelevantes Anion, das als Stickstoffquelle für Pflanzen dient und bei zu hohen Konzentrationen zum Umkippen von

Gewässern führen kann, weshalb es bei der Gewässerüberwachung einen wichtigen Analyt darstellt. Auf Grund der im Vergleich zu **2** höheren Affinität von **20** für Chlorid, dem bis jetzt kleinsten untersuchten sphärischen Anion ($r = 181 \text{ pm}$)³⁸, war es interessant zu klären, ob Fluorid als noch kleineres sphärisches Anion ($r = 133 \text{ pm}$)³⁸ ebenfalls gebunden wird. Fluorid spielt z.B. eine wichtige Rolle in der klinischen Behandlung von Osteoporose.⁵⁰ Das letzte untersuchte Anion, Perrhenat, ähnelt strukturell dem in radioaktiven Abfällen vorhandenen Pertechetat (siehe auch Kapitel 2.3.1.1). Daher dient es häufig als Modell zur Entwicklung von Perrhenatrezeptoren, für die es bis jetzt nur wenige Beispiele gibt.⁵¹⁻⁵⁵

Bei den mikrokalorimetrischen Untersuchungen stellte sich heraus, dass nur bei der Wechselwirkung von **20** mit Nitrat eine ausreichende Wärmetönung zu beobachten ist, die eine quantitative Charakterisierung des Komplexes erlaubt. Dies weist daraufhin, dass die Bindung von Fluorid, Perchlorat und Perrhenat wahrscheinlich sehr schwach bzw. nicht vorhanden ist. Für den Nitratkomplex wurde ein $\log K_a = 2,41 \pm 0,5$, $\Delta G = -13,7 \pm 0,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta H = -5,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $T\Delta S = 8,4 \pm 1,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ bei 298 K bestimmt. Seine Affinitätskonstante ist im Vergleich zu dem für **2** bestimmte Wert ($\log K_a = 2,11$) höher.²⁹ Allerdings ist dieser Vergleich nur bedingt zulässig, da die Stabilität des Nitratkomplexes von **2** mit Hilfe einer NMR Titration bestimmt wurde. Es scheint aber, dass **20** auch bei der Nitratkomplexierung den effizientesten Rezeptor darstellt.

In vorangegangenen Untersuchungen wurden mittels der dynamischen kombinatorischen Chemie einfach verbrückte Bis(cyclopeptide) identifiziert, die ebenfalls außerordentlich effiziente Iodid- bzw. Sulfatrezeptoren darstellen.⁵⁶ Die Struktur dieser Bis(cyclopeptide) ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Komplexe dieser Rezeptoren wurden in 2:1 (v/v) Acetonitril/Wasser-Gemischen unter Verwendung von Kaliumsalzen charakterisiert (Tabelle 2).⁵⁶ Um einen direkten Vergleich zu erlauben, wurden daher die thermodynamischen Daten der Sulfat- und Iodid-Komplexe von Bis(cyclopeptid) **20** auch unter diesen Bedingungen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 neben den für die Rezeptoren **23**, **24** und **3** bereits publizierten zusammengefasst. Die Tabelle zeigt, dass auch in dem Acetonitril/Wasser-Gemisch die Anionenaffinität von **20** höher als die von **2** ist. Auffällig ist allerdings, dass in diesem Lösungsmittel der enthalpische Beitrag für die Sulfat-Bindung positiv ist. Dies gilt auch für die Rezeptoren **23** und **24**. Der entropische Beitrag hingegen ist mit in etwa $40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ für alle Sulfat-Komplexen sehr günstig, und ist letztendlich für die hohen Bindungskonstanten verantwortlich. Die Bindungsenthalpie ist bei **23** und **24** weniger ungünstig als bei **2** und **20**, was die höheren Bindungskonstanten der mit Hilfe der dynamischen kombinatorischen Chemie identifizierten Rezeptoren verursacht.

Möglicherweise sind die durch Disulfidbrücken verknüpften Rezeptoren in der Lage, einen Hohlraum aufzuspannen, dessen Größe optimaler für die Sulfat- und Iodid-Bindung ist. Durch die Reduktion von Rotationsfreiheitsgraden in den Rezeptoren konnte im Fall der Sulfat-Bindung der entropische Beitrag weder bei den amidverknüpften Bis(cyclopeptiden) noch bei den disulfidverknüpften Bis(cyclopeptiden) signifikant erhöht werden.

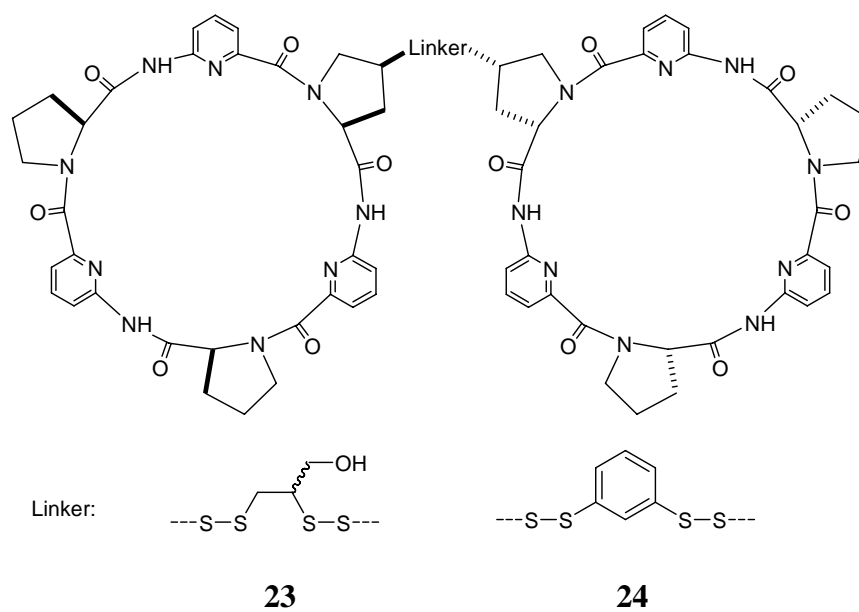


Abbildung 29 Durch dynamische kombinatorische Chemie identifizierte Rezeptoren.⁵⁶

Tabelle 2 Thermodynamische Daten der Komplexierung von Sulfat und Iodid durch die verbrückten Bis(cyclopeptide) **2**, **20**, **23** und **24** in 2:1 (v/v) Acetonitril/Wasser. Fehlergrenzen der Messdaten sind soweit bekannt angegeben. ΔG , ΔH und $T\Delta S$ in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. $T = 298\text{ K}$.

		2 ⁵⁶	20	23 ⁵⁶	24 ⁵⁶
SO₄²⁻	log K_a	5,3	5,75 ± 0,06	6,73	6,83
	ΔG	-30,2	-32,8 ± 0,4	-38,4	-38,9
	ΔH	10,7	9,7 ± 1,4	1,8	3,7
	$T\Delta S$	41,0	42,5 ± 1,6	40,1	42,7
I⁻	log K_a	3,52	4,05 ± 0,17	4,46	4,75
	ΔG	-20,1	-23,1 ± 1,0	-25,5	-27,1
	ΔH	-4,3	-8,3 ± 1,0	-20,7	-13,4
	$T\Delta S$	15,7	14,8 ± 1,8	4,8	13,7

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Iodid-Bindung, wobei der Entropiewert des Komplexes $[\mathbf{23}\cdot\text{I}]^-$ in dem untersuchten Lösungsmittel aus dem Rahmen fällt. Dieser ist

deutlich kleiner als bei den anderen Systemen. Der Enthalpiebeitrag hingegen ist aber deutlich größer, was insgesamt zu einer Bindungskonstante führt, die in einer ähnlichen Größenordnung wie die der anderen Rezeptoren liegt.

Überraschend war, dass die Bindungsaffinität von **20** für Sulfat und Iodid in 2:1 (v/v) Acetonitril/Wasser gegenüber der in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol beobachteten abnimmt (Wasser/Methanol: $\log K_a(\text{SO}_4^{2-}) = 5,97$; $\log K_a(\text{I}^-) = 4,43$; Acetonitril/Wasser: $\log K_a(\text{SO}_4^{2-}) = 5,75$; $\log K_a(\text{I}^-) = 4,03$). Ein analoger Effekt ist auch für Rezeptor **2** zu beobachten. Es scheint, dass das Acetonitril/Wasser-Gemisch das kompetetivere Lösungsmittelgemisch trotz des höheren Anteils an organischer Komponente und der Tatsache, dass Acetonitril kein protisches Lösungsmittel ist, darstellt. Der Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf die Affinität eines synthetischen Rezeptors ist allerdings komplex. So zeigten Hunter et al. erst kürzlich, dass selbst für ein relativ einfaches Wirt-Gast-System die Komplexstabilität nicht allein mit der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels korreliert und daneben viele andere Faktoren berücksichtigt werden müssen.⁵⁷ In diesem Zusammenhang sind noch systematische Arbeiten notwendig.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle untersuchten Rezeptoren eine hohe Affinität für Anionen in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol besitzen. Dabei ist die Abhängigkeit der Bindungsaffinitäten für ein Anion von der Linkerstruktur nicht besonders ausgeprägt, die thermodynamischen Daten der Komplexbildung unterscheiden sich für die einzelnen Rezeptoren jedoch signifikant. So konnte durch die Verringerung der Rotationsfreiheitsgrade im Linker, der Entropiebeitrag der Komplexbildung verbessert werden. Dies verursacht aber nicht zwangsläufig eine bessere Anionenaffinität. So ist die Komplexbildungsenthalpie der starreren Rezeptoren oft ungünstiger als die der weniger starren, was wahrscheinlich aus der schlechteren Anpassungsfähigkeit an das Anion resultiert. Darüber hinaus steht der gegenläufige Trend von Enthalpie und Entropie darüber hinaus mit einer für synthetische Rezeptoren häufig beobachteten Enthalpie-Entropie Kompensation im Einklang. Bei dem effizientesten Rezeptor **20** stellt die Komplexbildung einen guten Kompromiss aus einem hohen enthalpischen Beitrag und einem günstigen Entropiebeitrag dar. Rezeptor **20** ist zudem mit einem $\log K_a$ von fast 6,0 einer der besten bis jetzt bekannten neutralen Rezeptoren für Sulfat in wässrigen Lösungsmitteln.^{34,39-42} Interessanterweise wurde dieser Rezeptor durch eine *de novo* Design Suche mit dem Programm HostDesigner identifiziert, was die Leistungsfähigkeit von theoretischen Verfahren in der Supramolekularen Chemie eindeutig demonstriert.

2.2.2 Zweifach verbrückte Bis(cyclopeptide)

2.2.2.1 Hintergrund

Ein in den letzten Jahren immer intensiver untersuchtes Teilgebiet der dynamischen kovalenten Chemie ist die dynamische kombinatorische Chemie. Bei diesem Ansatz werden so genannte dynamische kombinatorische Bibliotheken (DCLs) generiert, welche eine Vielzahl von Komponenten enthalten, die in einem reversiblen thermodynamischen Gleichgewicht stehen.⁵⁸ Sanders et al. definieren die dynamische kombinatorische Chemie als kombinatorische Chemie unter thermodynamischer Kontrolle.⁴ Dieser Ansatz scheint auf den ersten Blick nicht sehr nützlich für einen Chemiker zu sein, da durch die Erzeugung einer Vielzahl von Produkten in homogener Lösung die Identifikation und Isolation einer Komponente erschwert wird. Das Potential wird aber deutlich, wenn durch den Zusatz eines Templats, das durch nicht kovalente Wechselwirkungen mit einem Baustein in der Bibliothek wechselwirkt, die Gleichgewichtslage innerhalb der Bibliotheken verschoben werden kann. Dadurch wird es möglich, Bibliotheksbestandteile zu identifizieren, welche abhängig vom verwendeten Templat spezifische Eigenschaften besitzen.

Man unterscheidet bei der induzierten Gleichgewichtsverschiebung in DCLs zwei verschiedene Prozesse, das *Casting* und das *Moulding* (Abbildung 30).⁵⁹ Beim *Casting* wird aus den Bibliotheksbestandteilen das beste Gastmolekül durch den Zusatz eines Rezeptors, z.B. eines Enzyms, gebildet, wohingegen beim *Moulding* der beste Rezeptor für einen Gast gebildet wird. In beiden Fällen ist es möglich, den besten Wirt oder Gast, der in der Bibliothek vorhanden ist oder aus Komponenten der Bibliothek aufgebaut werden kann, zu identifizieren ohne genaue Kenntnis darüber zu haben, welche Strukturmerkmale für die selektive Bindung des verwendeten Templats notwendig sind. Die Attraktivität dieses Ansatzes besteht vor allem darin, dass ein Zugang zu Wirten oder Gästen erleichtert wird, die durch einen strukturbasierten Designansatz möglicherweise nicht oder nur schwer identifizierbar wären. Darüber hinaus erlaubt das Verfahren auch eine effiziente Synthese der gefundenen Verbindungen.

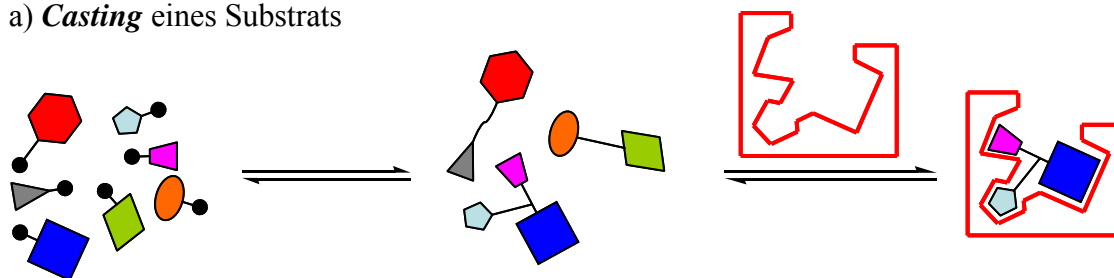
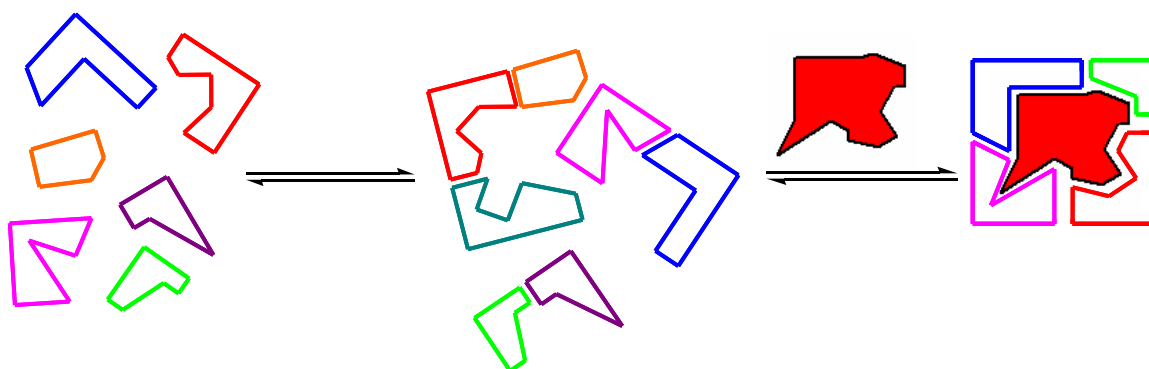
a) *Casting* eines Substratsb) *Moulding* eines Rezeptors

Abbildung 30 Verdeutlichung der Begriffe a) *Casting* und b) *Moulding* nach Lehn und Huc.⁵⁹

Einige Beispiele zur Anwendung der dynamischen kombinatorischen Chemie mit Bezug zur Thematik dieser Dissertation sollen das Konzept verdeutlichen. So nutzten Sanders et al. für das *Moulding* das in Abbildung 31 dargestellte Hydrazid (mPro) als Baustein.⁶⁰ Bei säureinduzierter Spaltung des Acetals oligomerisiert das Hydrazid unter Hydrazonbildung, wobei die Hydrazonbildung im Säuren vollkommen reversibel ist, durch Neutralisation aber gestoppt werden kann. In Anwesenheit eines Templats führte die Reaktion im thermodynamischen Gleichgewicht vorwiegend zu einem cyclischen Dimer. Durch Zugabe eines Templats konnte man die Gleichgewichtslage zugunsten eines cyclischen Trimers verschieben. Dabei hing das Ausmaß des Effekts von der Art des Templats ab. Ausgehend von einem Gleichgewicht mit 88 % cyclischem Dimer führte die Zugabe von Acetylcholin zu 86 % cyclischem Trimer während die Zugabe von *N*-Methylchinuclidiniumiodid das Gleichgewicht weitaus geringer verschob. Das cyclische Trimer ähnelt strukturell einem von Kubik untersuchten Cyclopeptid bestehend aus alternierenden Prolin und 3-Aminobenzoesäureuntereinheiten.⁶¹ Beide Verbindungen binden quaternäre Ammoniumionen in Chloroform, was die Selektion des cyclischen Trimers bei Zugabe solcher Gäste zur Lösung der aus mPro gebildeten Oligomere erklärt.^{61,62}

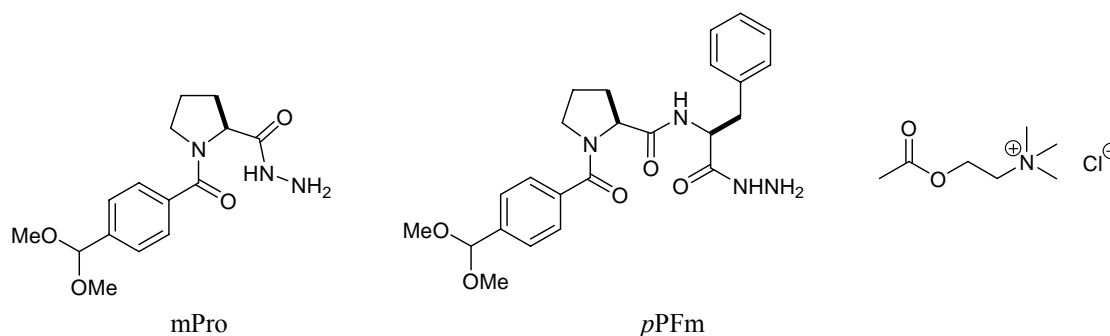


Abbildung 31 Von Sanders et al. verwendete prolinbasierte DCL-Bausteine mPro und pPFm sowie die Struktur von Acetylcholinchlorid.^{60,63}

In weiteren Untersuchungen beschäftigten Sanders et al. sich mit einem Pseudodipeptid Baustein, pPFm, (Abbildung 31), in welchem der mPro Baustein eine zusätzliche Phenylalanineinheit enthält.⁶³ Nach Acetalspaltung bildete dieser Baustein in Anwesenheit von Lithiumiodid oder Natriumiodid vorwiegend ein cyclisches Trimer. Bei Zugabe von Acetylcholinchlorid verschob sich das Gleichgewicht der Hydrazonbildung zugunsten eines Rezeptors, bei dem es sich um ein Catenan handelte.⁹ Dies stellte ein überraschendes Ergebnis dar, das außerordentlich deutlich das Potential der dynamischen kombinatorischen Chemie zur Identifizierung neuer Rezeptorstrukturen belegt. Ein rationelles Design eines Acetylcholinrezeptors hätte sicher nicht zu einem Catenan geführt.

In Kooperation mit S. Otto von der University of Cambridge, U.K. wurde die dynamische kombinatorische Chemie bereits von S. Kubik zur Optimierung der Anionenaffinität einfach verbrückter Bis(cyclopeptide) eingesetzt.⁵⁶ Dazu wurde ein anionenbindendes Cyclopeptidmonothiol mit verschiedenen Dithiolen gemischt, die als Linker zwischen zwei Cyclopeptidringen fungieren sollten. Als reversible Reaktion zum Aufbau der Rezeptoren wurde der Disulfidaustausch genutzt. Es wurde beobachtet, dass in Anwesenheit von Iodid- oder Sulfatsalzen zwei Bis(cyclopeptide) in der dynamischen Bibliothek angereichert wurden, von denen eines 2,3-Dimercaptopropan-1-ol und das andere 1,3-Dithiobenzol als Linker enthielt (Abbildung 29). Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um die bisher effizientesten neutralen Anionenrezeptoren für Sulfat in wässrigen Lösungen.⁵⁶

In Rahmen dieser Arbeit sollte die Affinität von verbrückten Bis(cyclopeptiden) durch Einführung einer zweiten Brücke, welche die Vororganisation der beiden Cyclopeptiduntereinheiten für die Anionenbindung verbessert, optimiert werden. Dieses Konzept ist in Abbildung 32 dargestellt.

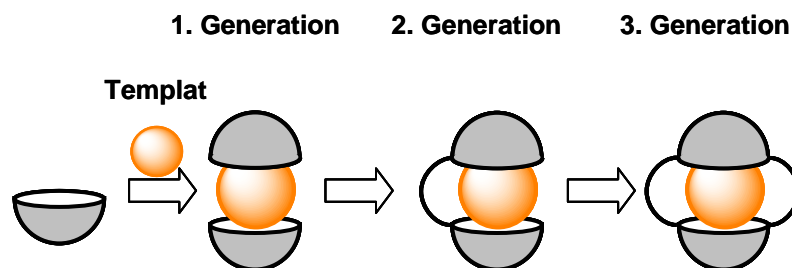


Abbildung 32 Evolution der Anionenrezeptoren basierend auf der in der Gruppe von S. Kubik entwickelten Cyclohexapeptide.

Für die Synthese von zweifach verbrückten Bis(cyclopeptiden) ist der Einsatz der dynamischen kovalenten Chemie unter thermodynamischer Kontrolle wahrscheinlich unerlässlich, da es beim Aufbau solcher Verbindungen unter Verwendung irreversibler Reaktionen zur Bildung zahlreicher unerwünschter Nebenprodukte kommen kann. So ist die richtige Verknüpfung der beiden Cyclopeptidringe nur dann möglich, wenn beide Linker auf korrekte Weise eingeführt werden. Erfolgt die erste Verknüpfung fehlerhaft, so kann auch die zweite nicht richtig ablaufen. Bei Einsatz reversibler Reaktionen zur Verknüpfung der beiden Cyclopeptidringe können solche Fehler korrigiert werden und das zweifach verbrückte Bis(cyclopeptid) sollte in guten Ausbeuten zugänglich sein, sofern es die thermodynamisch stabilste Spezies in dem Produktgemisch darstellt.

Zum Aufbau von zweifach verbrückten Bis(cyclopeptiden) bietet sich eine analoge Strategie an, die sich bereits beim Aufbau der einfach verbrückten Derivate bewährt hat. So kann als reversible Reaktion ebenfalls der Disulfidaustausch eingesetzt werden. Diese Reaktion ist eine der wenigen reversiblen Reaktionen, die auch in der Natur, z.B. bei der Faltung von Proteinen und der Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts in Zellen, eine Rolle spielt.^{64,65} Disulfide bilden sich in wässrigen Lösungen z.B. durch Oxidation von Thiolaten mit Sauerstoff (Abbildung 33 a). Beim Disulfidaustausch selbst handelt es sich um den nucleophilen Angriff eines Thiolats an ein Schwefelatom einer Disulfidbrücke unter gleichzeitiger Abspaltung eines Thiolats (Abbildung 33 b). Die Reaktion findet im basischen Medium bei pH-Werten von 7 bis 9 statt. Unter diesen Bedingungen liegen normalerweise ausreichende Mengen der für den Disulfidaustausch benötigten Thiolationen vor, und es können Thiolate durch Luftsauerstoff zu Disulfiden oxidiert werden. Durch die Verwendung wässriger Lösungsmittel, bietet diese Reaktion Zugang zu Rezeptoren, die natürliche Systeme imitieren können.

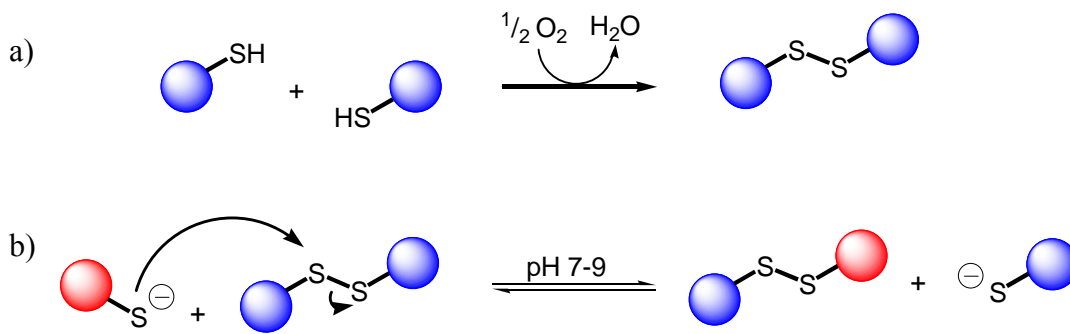
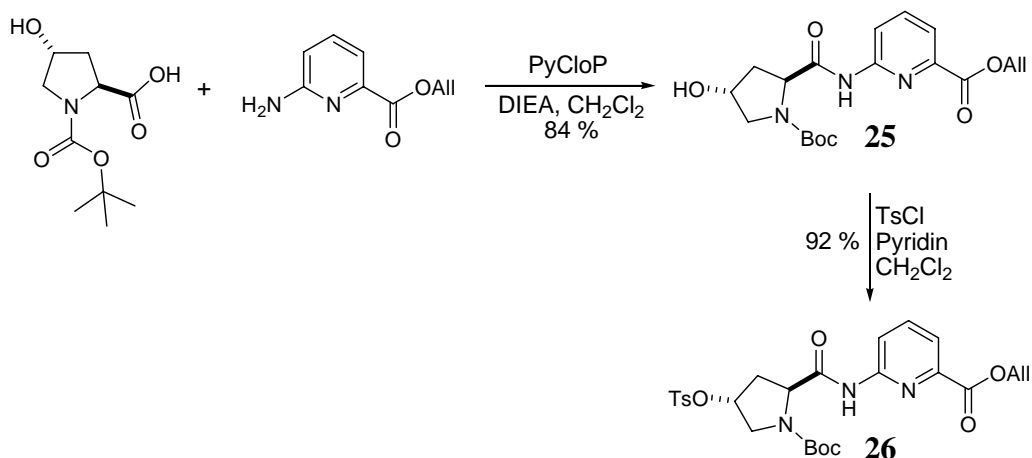


Abbildung 33 a) Bildung von Disulfiden und b) Disulfidaustausch.

Zur Anwendung des Disulfidaustauschs bei der Synthese eines Bis(cyclopeptids) mit zwei Linkern muss man von einem Cyclopeptid ausgehen, das zwei Thiolgruppen enthält. Die Synthese dieses Cyclopeptids ist im folgenden Kapitel beschrieben.

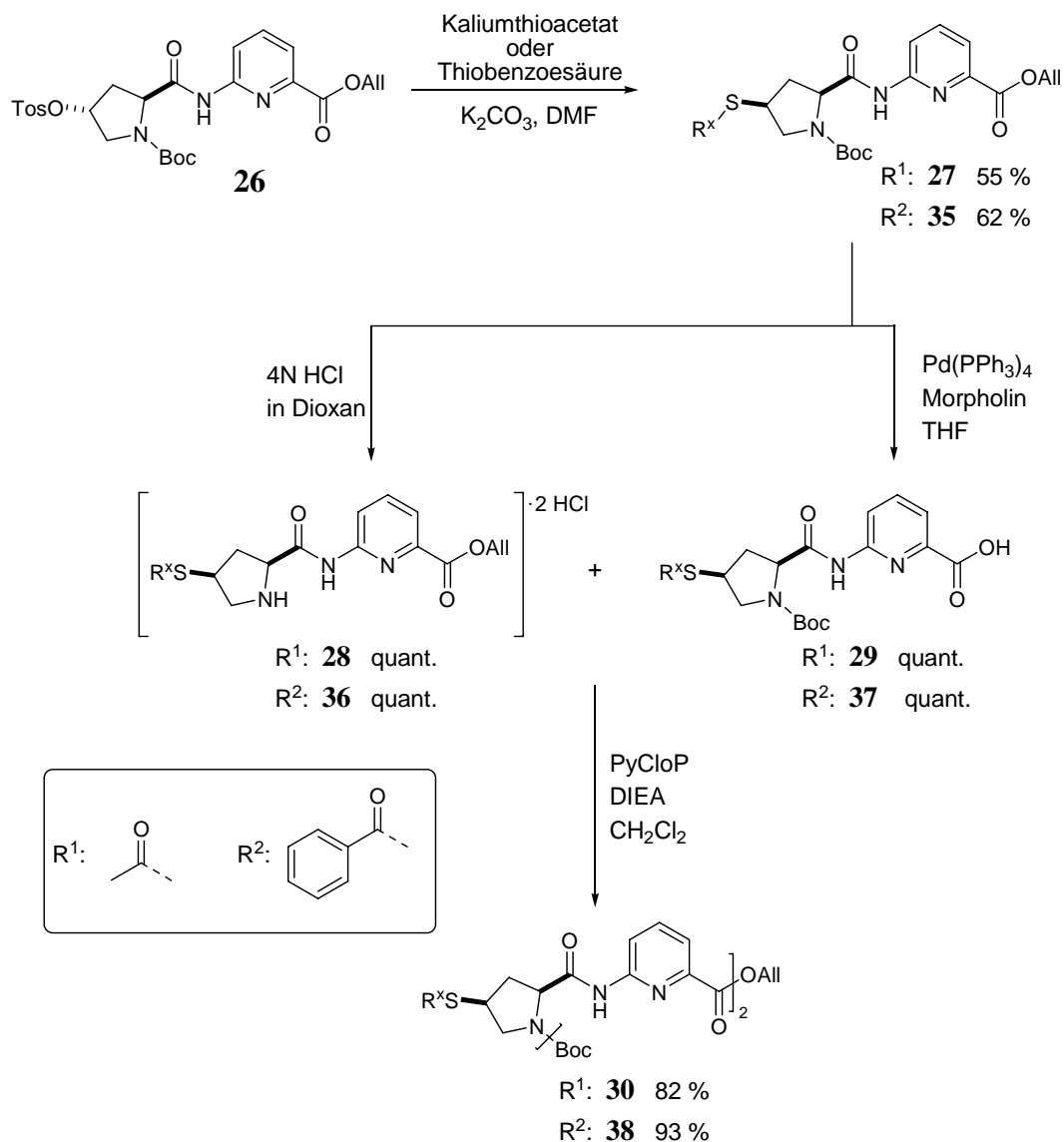
2.2.2.2 Synthesen

Als Cyclopeptidkomponente für dynamische kombinatorische Bibliotheken, die den Aufbau von zweifach verbrückten Bis(cyclopeptiden) erlauben, dient ein Cyclopeptid mit zwei Thiolgruppen. Ein entsprechendes Monothiol ist in vorangegangenen Untersuchungen von S. Kubik bereits hergestellt worden.⁵⁶ In dieser Synthese wurde ein Cyclopeptidthioacetat durch Umsetzung von **4** mit Kaliumthioacetat erhalten. Der Thioester konnte anschließend durch Umesterung in Methanol zum freien Thiol gespalten und durch Rühren an der Luft in das korrespondierende Disulfid überführt werden. Zur Herstellung eines Cyclopeptiddithiols ist diese Synthesestrategie allerdings ungünstig. So besteht die Gefahr, dass die Einführung von zwei Thioestergruppen in ein Cyclopeptid mit Tosylatsubstituenten an zwei Prolinuntereinheiten wenig effizient verläuft und zu komplexen, schwer trennbaren Produktgemischen führt. Günstiger ist es, die Thiogruppen bereits in einem frühen Schritt der Synthese, z.B. auf der Stufe des Dipeptids, einzuführen. Als Baustein der Synthese eines Cyclopeptids mit zwei (oder drei) Thiogruppen kann dementsprechend Dipeptid **26** dienen. Dieses Peptid enthält als Schutzgruppe am C-terminalen Ende einen Allylester anstelle des bisher verwendeten Benzylesters. Diese Änderung war notwendig, da die Spaltung eines Benzylester unter hydrogenolytischen Bedingungen bei Anwesenheit eines Schwefelatoms im Substrat nicht gelingt. Die Allylschutzgruppe kann im Gegensatz dazu mit Hilfe eines Pd(0)-Katalysators auch in Gegenwart von Schwefel gespalten werden. Zur Synthese eines aus **25** abgeleiteten Dipeptids mit einer Thiogruppe wurde zunächst die Allyl-geschützte Aminopicolinsäure mit Boc-(*trans*-4-Hydroxy)-L-prolin zum Dipeptid **25** gekuppelt (Schema 7). Das Boc-(*trans*-4-Hydroxy)-L-prolin wurde zuvor aus *trans*-4-Hydroxy-L-prolin durch Umsetzung mit Boc₂O dargestellt.



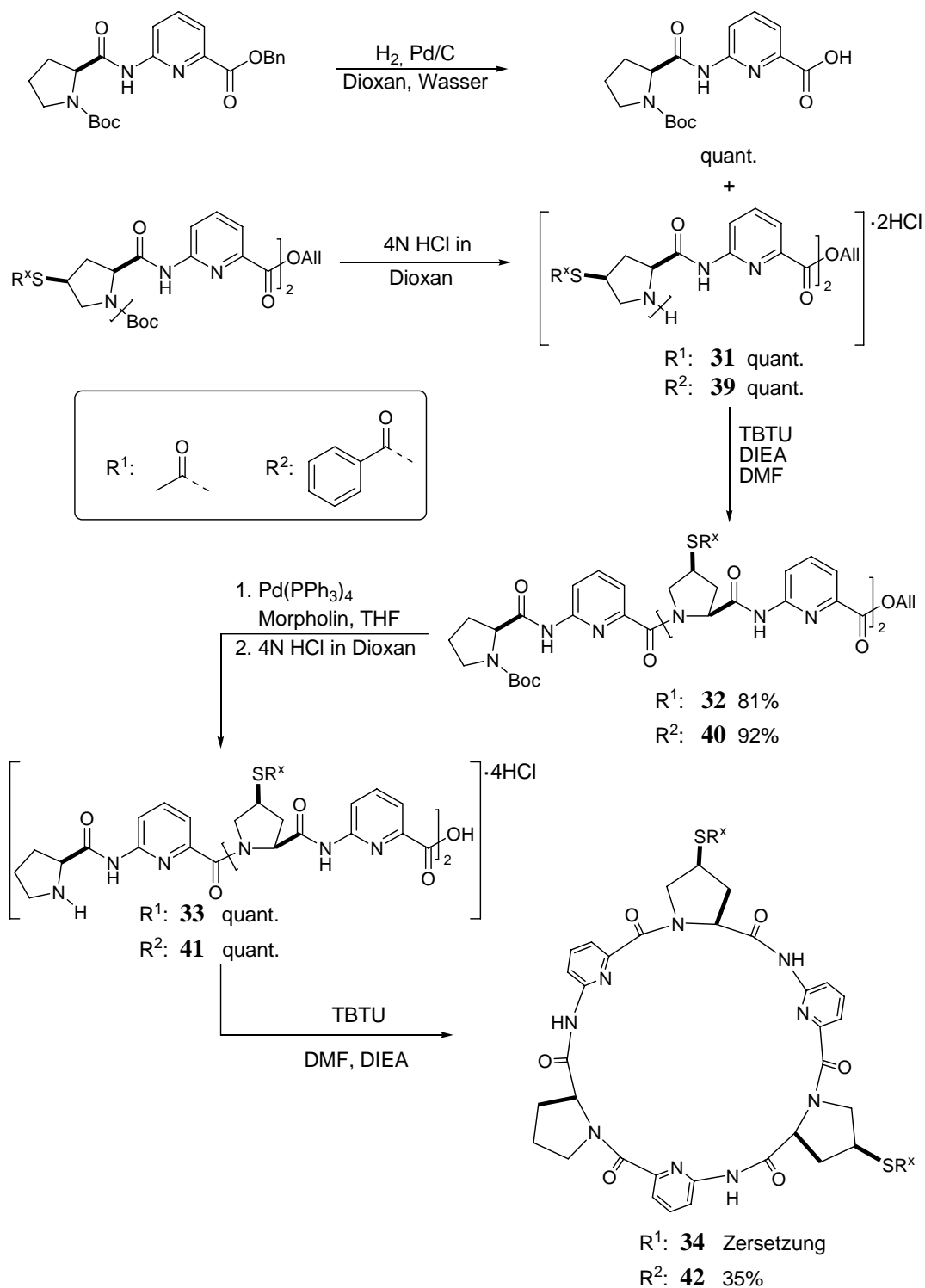
Schema 7 Synthese des Dipeptids Boc-(trans-4-Hydroxy)-L-prolin **26**.

Anschließend wurde **25** mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid zum *p*-Tosylsulfonsäureester **26** umgesetzt. Dieser konnte durch eine nucleophile Substitution mit Thioacetat unter Inversion der Konfiguration am C-4 des Prolins in **27** überführt werden. Das thiofunktionalisierte Dipeptid **27** wurde nun in einer Sequenz von Schutzgruppenmanipulationen und Kupplungsschritten zunächst zum Tetrapeptid **30** (Schema 8) und anschließend zum Hexapeptid **32** aufgebaut (Schema 9). Das für die Synthese von **33** benötigte unsubstituierte Dipeptid wurde nach publizierten Verfahren synthetisiert.²⁸



Schema 8 Synthese der thiofunktionalisierten Di- und Tetrapeptide.

Abschließend wurde das Hexapeptid **32** vollständig entschützt und unter Verdünnungsbedingungen bei 80 °C cyclisiert. Hierbei stellte sich heraus, dass die verwendete Thioacetatgruppe unter den Bedingungen der Cyclisierung nicht stabil ist, wodurch es zur Zersetzung des Hexapeptids kam und das gewünschte Cyclopeptid **34** nicht isoliert werden konnte.

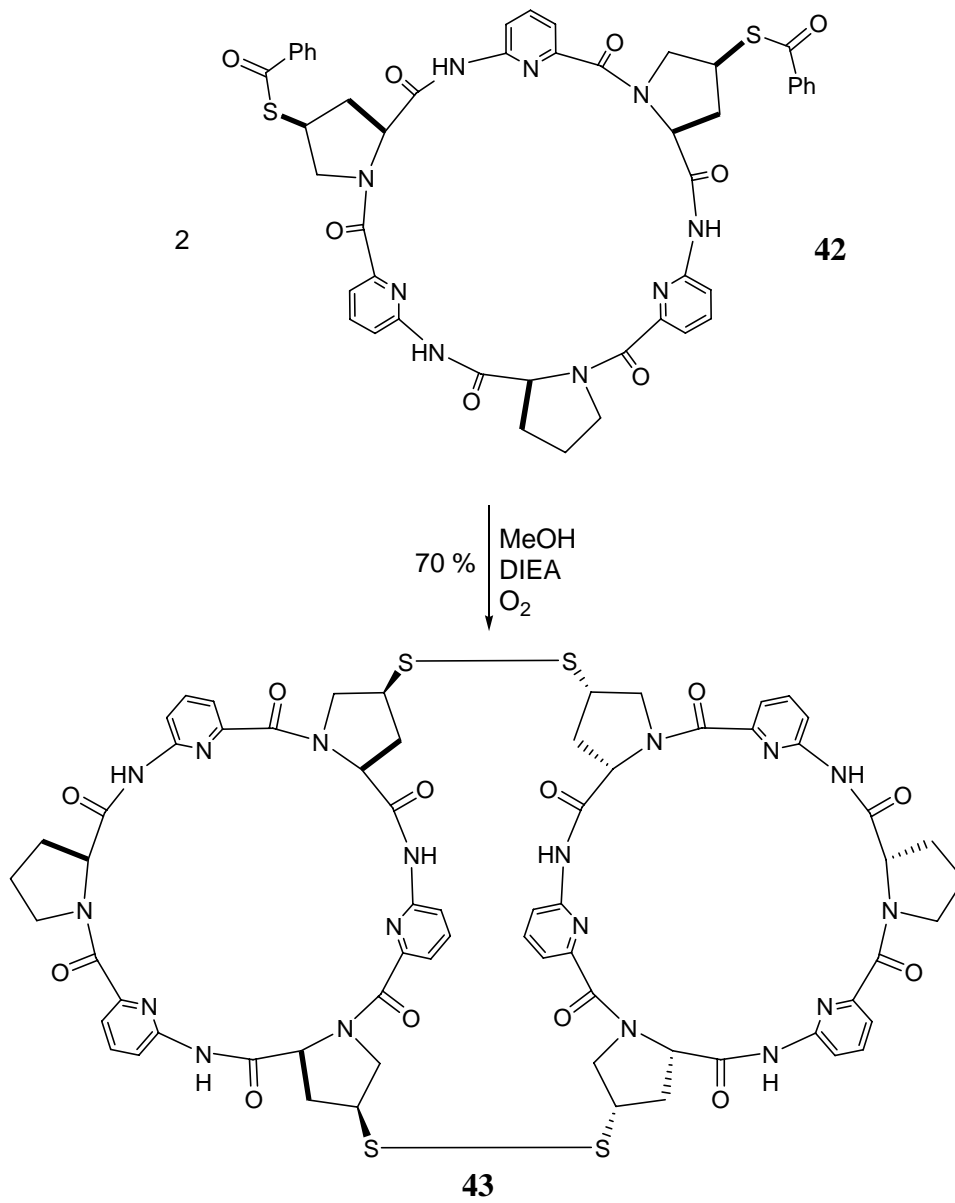


Schema 9 Darstellung der thiofunktionalisierten Hexa- und Cyclopeptide.

Zur Umgehung dieses Problems musste eine Schutzgruppe für die Thiogruppen gefunden werden, die unter den für die Cyclisierung notwendigen Bedingungen stabil ist. Voruntersuchungen zeigten, dass dies bei einem Thiobenzoat gegeben ist. Daher wurde die in Schema 8 und Schema 9 gezeigte Synthese unter Verwendung des Dipeptids **38** wiederholt.

In diesem Fall gelang die Cyclisierung und das gewünschte Cyclopeptid **42** konnte mit einer Ausbeute von 35 % nach dem Cyclisierungsschritt isoliert werden. Zunächst wurde dieses Cyclopeptid in geschützter Form zur Herstellung von dynamischen Bibliotheken eingesetzt und die Thiobenzoate unmittelbar vor Herstellung der Bibliotheken durch basische Hydrolyse gespalten. Dadurch sollten mögliche Schwierigkeiten bei der Isolierung und Aufreinigung eines freien Dithiols umgangen werden.

Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass diese Vorgehensweise zu einer schlechten Reproduzierbarkeit der Zusammensetzung der so generierten dynamischen Bibliotheken führte, was möglicherweise an Schwierigkeiten bei der exakten Kontrolle des pH-Werts lag. Die Probleme konnten umgangen werden, indem **42** zunächst vollständig geschützt wurde und als freies Dithiol oder doppelt verbrücktes Bis(cyclopeptid) in den Bibliotheken eingesetzt wurde. Nach sorgfältiger Optimierung der Reaktionsbedingungen erwiesen sich zur Hydrolyse der Thiobenzoate die analogen Bedingungen als optimal, wie sie auch zur Entschützung des einfach substituierten Cyclopeptids eingesetzt wurden (Schema 10). Die vollständige Überführung in **43** war allerdings schwierig. Auch nach sieben Tagen Reaktionszeit wurden immer noch Cyclopeptide bzw. Cyclopeptidoligomere mit Thiolgruppe im MALDI-MS nachgewiesen. Es ist bekannt, dass die Geschwindigkeit der Oxidation von freien Thiolen zu Disulfiden von alkoholischen zu dipolar aprotischen Lösungsmitteln zunimmt, wobei Methanol als Lösungsmittel für die Oxidation eher ungünstig ist.⁶⁶⁻⁶⁹ Dies erklärt die geringe Geschwindigkeit der Oxidation des freien Cyclopeptiddithiols. Durch Rühren von **42** unter einer reinen Sauerstoffatmosphäre bei Normaldruck konnte das gewünschte Bis(cyclopeptid)disulfid **43** allerdings weitgehend rein erhalten werden. Im Massenspektrum konnten keine Produkte, die auf eine Überoxidation der Thiogruppen zu z.B. Sulfonaten zurückzuführen sind, nachgewiesen werden. Nach der Entfernung des Lösungsmittel und anschließender chromatographischer Aufreinigung konnte **43** schließlich elementaranalysenrein isoliert werden.



Schema 10 Darstellung von Bis(cyclo -{[(cis-4-S-L-Pro)-APA]₂-L-Pro-APA}) 43.

2.2.2.3 Ergebnisse

Unter Verwendung des Cyclopeptids **42** bzw. des entschützten Derivates **43** wurden nun dynamische Bibliotheken erzeugt.⁷⁰ Dazu wurden Lösungen, die entweder **42** bzw. **43** und bis zu zwei Dithiolen als Linker enthielten, in 2:1 (v/v) Acetonitril/Wasser hergestellt. Diesen Lösungen wurde anschließend ein Salz zugefügt, dessen Anion als Templat dienen sollte. Nach dem Einstellen des Gleichgewichts, im Normalfall war dies nach 4 bis 7 Tagen erreicht, wurde die Zusammensetzung der Lösung mittels HPLC analysiert (siehe Kapitel 4.4.2) und mit der einer Bibliothek verglichen, die kein Templat enthielt. Die vorgestellten Untersuchungen wurden von mir in Kooperation mit S. Otto an der University of Cambridge, U.K. durchgeführt.

Am Anfang dieses Projekts bestand die Befürchtung, dass die Reinigung eines freien Cyclopeptids mit zwei Thiogruppen schwierig sein könnte. Daher sollte **42** unmittelbar vor Herstellung der dynamischen Bibliotheken *in situ* entschützt werden. Dies gelang in einem 1:1 (v/v) Acetonitril/Wasser-Gemisch bei pH = 13 innerhalb von vier Stunden. Die basische Lösung mit freiem Dithiol wurde mit einem Ionenaustauscher auf einen pH-Wert zwischen 7 und 9 gebracht. Anschließend wurden die dynamischen Bibliotheken mit dieser Lösung hergestellt. Bei dieser Vorgehensweise ergab sich aber oftmals eine schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Als Grund wurde die *in situ* Verseifung des Dithiolesters **42** und die damit verbundene erschwerte exakte pH-Wert Kontrolle gesehen. Außerdem war der Einfluss des bei der Hydrolyse gebildeten Benzoats auf die Zusammensetzung der Bibliotheken unklar. Das Problem konnte zwar umgangen werden, wenn den Bibliotheken als Katalysator (*N,N'*-Ethylen-bis(2-mercaptoacetamid) und als Puffer ein Boratpuffer zugesetzt wurde,⁷¹ allerdings war auch diese Vorgehensweise nicht befriedigend, da ein Einfluss der Anionen des Borat-Puffers auf die Bibliothekszusammensetzung nicht auszuschließen war. Aus diesem Grund war es letztlich günstiger, die Hydrolyse der Thiobenzoate in **42** vor der Erzeugung der dynamischen Bibliotheken durchzuführen, also das Bis(cyclopeptid) **43** zur Herstellung der dynamischen Bibliotheken einzusetzen.

Bei der Charakterisierung der Bibliothekszusammensetzung mittels HPLC traten in einigen Chromatogrammen zwei Peaks auf, die beide laut Massenspektrum die Zusammensetzung des Edukts besaßen. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei diesen beiden Verbindungen um Diastereomere von **43** handelt, wobei in dem einen die beiden Cyclopeptidringe wie in Abbildung 34 schematisch gezeigt *syn*-ausgerichtet sind und in dem anderen *anti*. Diese beiden Stereoisomere können nur durch Bruch von beiden S-S-Bindungen

ineinander übergehen. Experimentelle Hinweise auf diese Hypothese gibt es allerdings bisher nicht. Bei einfach verbrückten Bis(cyclopeptiden) tritt diese Stereoisomerie auf Grund der freien Drehbarkeit der Bindungen in der Brücke nicht auf.

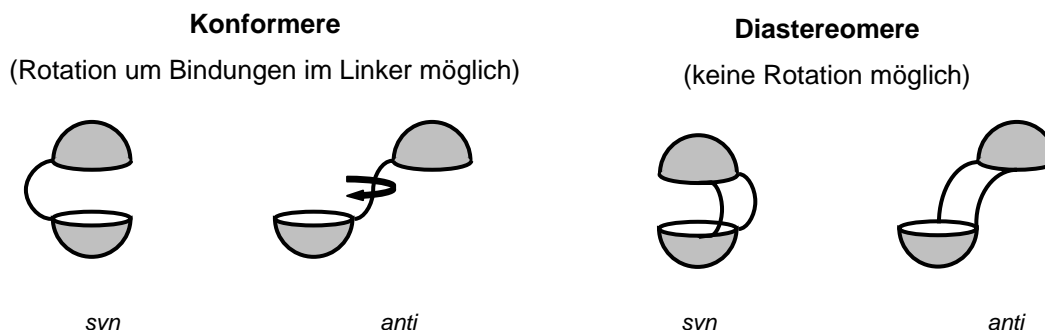


Abbildung 34 Schematische Darstellung der Konformere bzw. Diastereomere vom einfach und zweifach verbrückten Bis(cyclopeptiden). Zur besseren Übersicht wurden die Disulfidbrücken als einfache Linien und die Cyclopeptideinheiten als Halbschalen dargestellt.

Beim Aufbau der Bibliotheken kamen die in Tabelle 4 aufgeführten Dithiole als Linker zum Einsatz. Diese sind zum Teil kommerziell erhältlich oder wurden von S. Otto synthetisiert und mir freundlicherweise für die Untersuchungen überlassen. Als Templat wurde Sulfat oder Iodid eingesetzt, da diese Anionen mit den bis jetzt untersuchten Bis(cyclopeptiden) die stärksten Wechselwirkungen aufweisen.

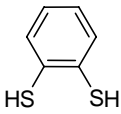
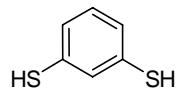
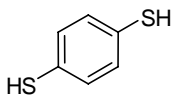
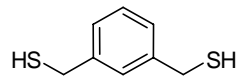
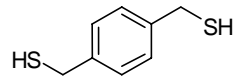
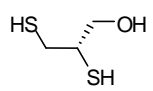
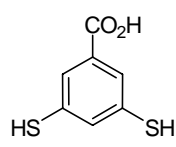
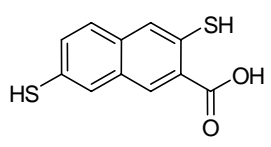
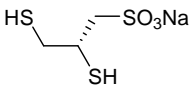
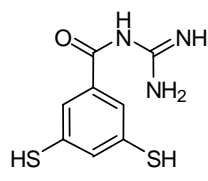
Jede Versuchsreihe bestand aus neun dynamischen Bibliotheken. Dabei enthielt jede das Bis(cyclopeptid) **42** nach *in situ* Entschützung oder **43**. Um die Analyse der Bibliothekszusammensetzung zu vereinfachen, wurden in keiner Bibliothek mehr als zwei Linker eingesetzt. Die in Tabelle 4 dargestellten Linker wurden also paarweise untersucht, wobei drei der Bibliotheken beide Linker L_A und L_B enthielten, drei nur L_A und drei nur L_B . Außerdem wurden die Template T^1 und T^2 so auf die Bibliotheken verteilt, dass sich das in Tabelle 3 dargestellte Array ergab.

Tabelle 3 Zusammensetzung eines Arrays aus neun dynamischen Bibliotheken mit zwei Linkern (L_A und L_B) und zwei Templaten (T^1 und T^2).

	-	T^1	T^2
$L_A + L_B + \text{BisCP}$	1	2	3
$L_A + \text{BisCP}$	4	5	6
$L_B + \text{BisCP}$	7	8	9

Die untersuchten Linker unterschieden sich in der Anzahl der C-Atome zwischen den SH-Gruppen und ihrer Flexibilität. Die Kohlenstoffanzahl variierte dabei von zwei bis sechs. Einige Linker enthielten Carbon- oder Sulfonsäuregruppen, wodurch die Wasserlöslichkeit der entstehenden Bis(cyclopeptide) erhöht werden sollte. Zusätzlich wurde ein Linker, der eine Guanidinseitenkette trägt, untersucht. Diese Gruppe sollte ebenfalls die Wasserlöslichkeit der entsprechenden Bis(cyclopeptide) erhöhen, da sie in wässrigen Lösungen protoniert vorliegt. Daneben ist die Guanidinruppe sowohl in natürlichen als auch synthetischen Systemen eine wichtige Bindungsstelle für Anionen wie Phosphat oder Carbonat⁷² und sie könnte die Anionenerkennung der Bis(cyclopeptide) daher kooperativ unterstützen.

Tabelle 4 In DCLs eingesetzte Dithiol-Linker **L1-L10**, sortiert nach der Anzahl der Kohlenstoffe in ihrem Rückgrat.

2-C	3-C	4-C	5-C	6-C
				
L1	L4	L7	L8	L9
				
L2	L5			L10
				
L3	L6			

Beispielhaft sind für die Ergebnisse dieser Untersuchungen in Abbildung 35 die Chromatogramme zweier DCLs mit **L4** als Linker dargestellt. Das Chromatogramm in Abbildung 35 a) zeigt, dass ohne ein Templat neben **43** zwar eine Reihe weiterer Produkte gebildet werden, diese aber nur in untergeordneten Mengen vorhanden sind. Durch die Zugabe eines Templats wie Sulfat wird die Bibliothekszusammensetzung deutlich verändert (Abbildung 35 b). Der Peak von **43** verschwindet fast vollständig und in LC-MS Untersuchungen konnte bei der entsprechenden Retentionszeit kein Massensignal mehr nachgewiesen werden, welches **43** zugeordnet werden kann. Dafür trat ein neuer intensiver Peak im Chromatogramm bei 26,5 Minuten auf, das laut Massenspektrum einer Spezies entspricht, bei der zwei Cyclopeptideinheiten **43** durch zwei Linker **L4** miteinander verknüpft sind.

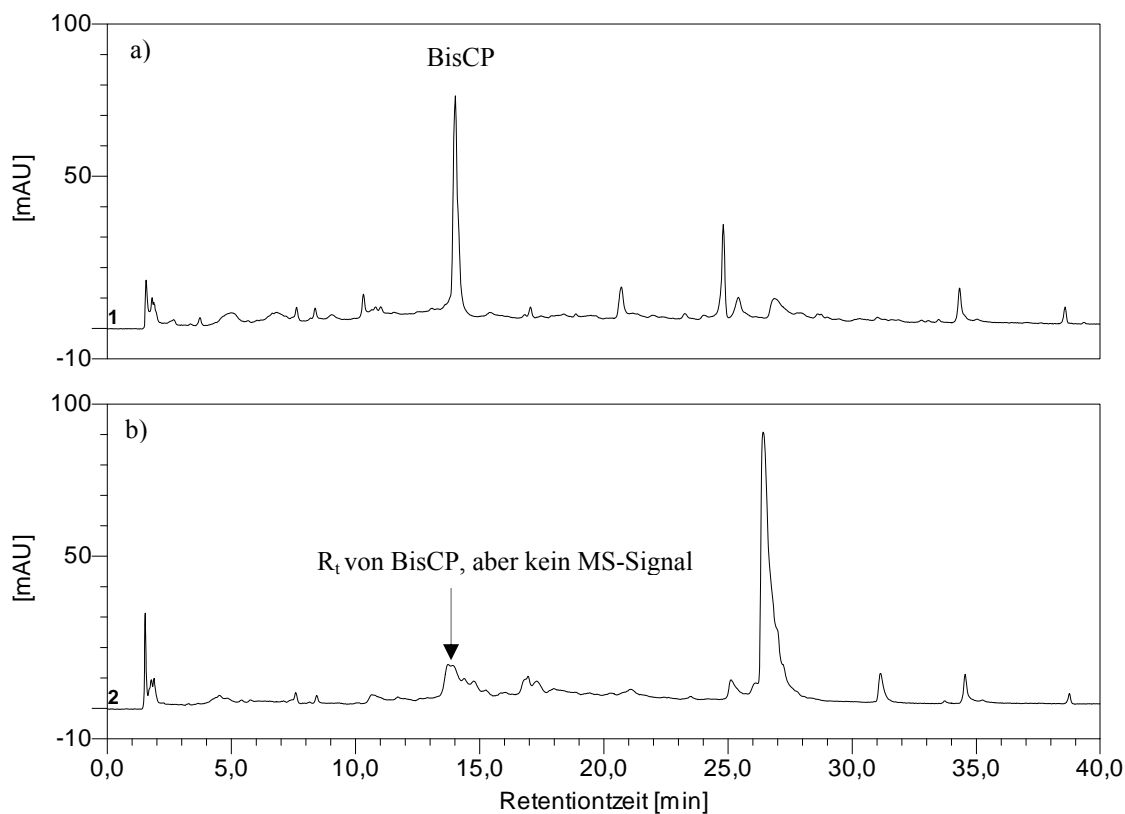


Abbildung 35 Vergleich der Chromatogramme von DCLs mit **43** und **L4** a) ohne Templat und b) mit Na_2SO_4 als Templat.

In Abbildung 36 ist als Beispiel ein LC-MS Chromatogramm einer Bibliothek mit Linker **L5** in Anwesenheit von Sulfat dargestellt. Abbildung 36 a) zeigt das Chromatogramm der entsprechenden Bibliothek, während in b) das Base Peak Chromatogramm dargestellt ist. Dieses korreliert mit Anzahl von Molekülen einer Masse, die detektiert wurden und sollte im Idealfall identisch mit dem Chromatogramm sein. In Abbildung 36 c) ist das ESI-Massenspektrum des Peaks zwischen 17,9 bis 18,6 Minuten dargestellt. Die detektierten entsprechen denen Massen eines doppelt verbrückten Bis(cyclopeptids) ($\text{BisCP}[\text{L5}]_2$).

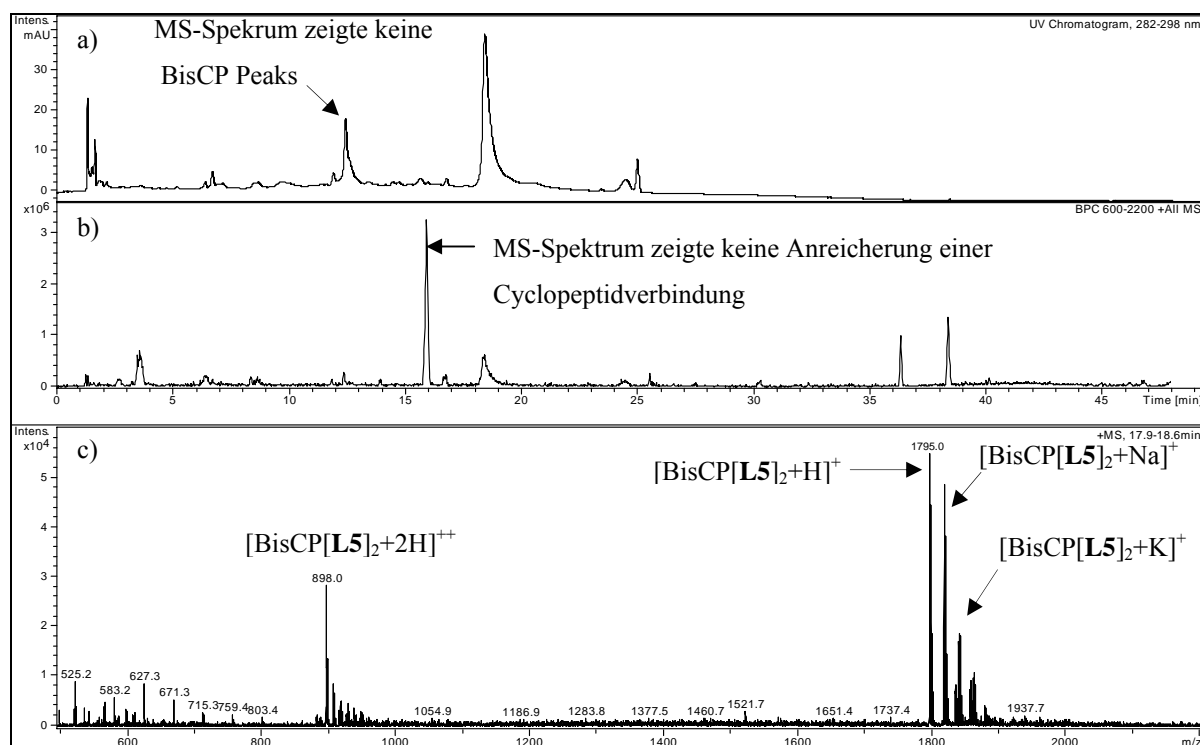


Abbildung 36 DCL mit BisCP 43, Linker L5 und Sulfat a) Chromatogramm von der DCL bei 290 nm, b) Base peak Chromatogramm des MS zwischen m/z 500-2200, c) Massenspektrum für den Peak bei 17,9 – 18,6 min, positiver Modus. Alle anderen Peaks im Total Ion Count (TIC) oder UV-Chromatogramm konnten keiner Kombination aus Cyclopeptid und Linker zugeordnet werden.

Die DCLs, welche Kombinationen zweier Linker enthielten, zeigten in Anwesenheit eines Templats nur dann die Anreicherung eines zweifach verbrückten Bis(cyclopeptids), wenn einer der beiden Linker auch in Abwesenheit des anderen dieselbe Verbindung bilden konnte. Die Massenspektren zeigten eindeutig, dass es sich um Bis(cyclopeptide) handelte, die nur eine Linkersorte enthielten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass zumindest bei den untersuchten Linkerkombinationen der Einbau zweier verschiedener Linker in ein Bis(cyclopeptid) nicht zu effizienten Anionenrezeptoren führt. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefasst. Dabei wurden Ergebnisse der DCLs mit zwei Linkern weggelassen, da sie aus den oben genannten Gründen keine neuen Informationen geliefert haben.

Tabelle 5 Zusammenfassung der Ergebnisse der DCL Untersuchungen. Die Anreicherung eines doppelt verbrückten Bis(cyclopeptids) in einer DCL durch das Templat ist mit ⊕ gekennzeichnet. Eine signifikante Anreicherung einer Spezies wird mit ⊕⊕ und die Abwesenheit eines Effektes mit ⊖ verdeutlicht.

	BisCP[L _x] ₂									
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
SO ₄ ²⁻	⊖	⊖	⊖	⊕⊕	⊕⊕	⊖	⊕	⊖	⊖	⊖
I ⁻	⊖	⊖	⊖	⊕	⊕	⊖	⊕⊕	⊖	⊖	⊖

Es zeigt sich, dass nur die drei Linker **L4**, **L5** und **L7** geeignet sind, um bei Einbau in ein doppelt verbrücktes Bis(cyclopeptid) zu Sulfat- bzw. Iodidrezeptoren zu führen. Dabei sind **L4** und **L7** Konstitutionsisomere, die sich in der Position der Thiogruppen am Benzolring unterscheiden. Linker **L4** unterscheidet sich von **L5** nur durch die zusätzliche Carboxylgruppe. Diese Gruppe könnte die Wasserlöslichkeit der Bis(cyclopeptide) günstig beeinflussen, ist aber an der Substraterkennung wahrscheinlich nicht beteiligt.

In Bibliotheken mit **L4** oder **L5** als Linker wurde das entsprechende doppelt verbrückte Bis(cyclopeptid) zwar auch durch Iodid (33 % Produkt, 38 % Startmaterial für **L4**) angereichert aber durch Sulfat (70 % Produkt, 0 % Startmaterial für **L4**) deutlich stärker. Der umgekehrte Fall war bei DCLs mit **L7** zu beobachten. Dort wurde eine stärkere Anreicherung des Bis(cyclopeptids) in Anwesenheit von Iodid beobachtet. Es scheint also, dass bei Einbau der Konstitutionsisomere **L4** und **L7** zwischen die Cyclopeptidringe Rezeptoren resultieren, die neben einer guten Affinität unterschiedliche Selektivität zeigen. Interessanterweise ist **L4** als geeigneter Linker für Anionenrezeptoren auf Basis von einfach verbrückten Bis(cyclopeptiden) identifiziert worden.⁵⁶ **L7** wurde in den damaligen Untersuchungen nicht verwendet, könnte aber auf Grund der hier erhaltenen Ergebnisse möglicherweise ebenfalls eine geeignete Linkerstruktur für einfach verbrückte Bis(cyclopeptide) darstellen.

Die von mir durchgeführten Untersuchungen zeigen eindeutig eine Abhängigkeit der Sulfat- bzw. Iodidaffinität zweifach verbrückter Bis(cyclopeptide) von der Länge der Linker (Tabelle 6). DCLs mit Dithiolen, die zwei Kohlenstoffatome im Rückgrat (**L1** bis **L3**) enthalten, zeigten nach Templatzugabe in keinem Fall eine Anreicherung eines Bis(cyclopeptids). Möglicherweise sind diese Linker zu kurz, um den zweifachen Einbau zwischen zwei Cyclopeptidringen zuzulassen. Es soll erwähnt werden, dass der Einbau des Linker **L2** zu einem effizienten anionenbindenden einfach verbrückten Bis(cyclopeptid)

geführt hat.⁵⁶ Weiterhin zeigten neuere Untersuchungen, dass doppelt verbrückte Bis(cyclopeptide) mit 1,2-Dithioethan als Linker erhalten werden können.⁷¹ Für das Ausbleiben einer Rezeptoranreicherung in den hier untersuchten DCLs mit **L2** als Linker steht der Zeit noch eine Erklärung aus.

Linker mit fünf oder sechs Kohlenstoffatomen im Rückgrat (**L8** bis **L10**) scheinen zu lang zu sein, zweifach verbrückte Bis(cyclopeptide) bilden zu können, die Sulfat oder Iodid binden. In DCLs mit Linkern, die drei oder vier Kohlenstoffatomen im Rückgrat enthalten, konnte hingegen bei Sulfat- oder Iodid-Zugabe in den meisten Fällen eine deutliche Anreicherung eines entsprechenden Bis(cyclopeptids) beobachtet werden. Die Bibliotheken mit dem guanidinfunktionalisierten Linker **L6** stellten die einzige Ausnahme dar. Die Gründe für dieses Verhalten sind allerdings unklar.

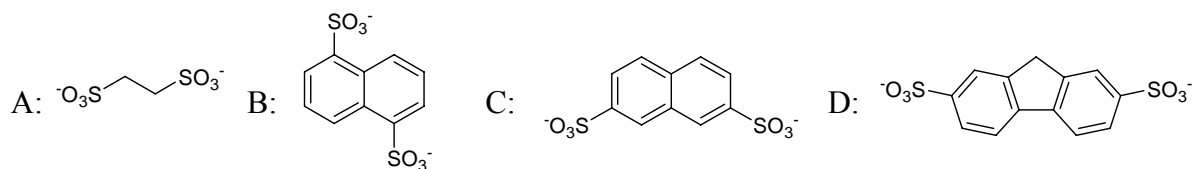
In weiteren Untersuchungen wurde geprüft, ob auch andere Template die Bildung der mit den Linkern **L4** und **L7** zweifach verbrückten Bis(cyclopeptids) induzieren. Dafür wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Anionen untersucht. Neben anorganischen Anionen wurden auch organische Bissulfonate eingesetzt. Sulfonate sollten im Prinzip ähnlich wie Sulfat gebunden werden, auch wenn die Stabilität der gebildeten Komplexe auf Grund der geringeren Ladung des Anions wahrscheinlich kleiner ist. Die verwendeten Bissulfonate unterschieden sich im Abstand zwischen den beiden Sulfonsäuren und in ihrer Flexibilität. Diese Anionen sollten zeigen, ob die Größe des Hohlrums zwischen den beiden Bis(cyclopeptiden) für ihre Komplexierung ausreicht. Möglicherweise induzieren diese Anionen aber auch Rezeptorstrukturen mit einer oligomeren Kette von Linkern zwischen den beiden Rezeptoruntereinheiten.

Theoretischer Teil

Tabelle 6 Einfluss verschiedener Anionen auf die Zusammensetzung von DCLs aus Bis(cyclopeptid) **43** und den Linkern **L4** und **L7**. Die Anreicherung der doppelt verbrückten Bis(cyclopeptide) durch das Templat ist mit \oplus gekennzeichnet, die Abwesenheit eines Effekts mit \ominus . Das Gegenion war, wenn nicht anders kenntlich gemacht, K^+ . DCLs mit B, C und D als Template wurden von Matthieu Edmond in Cambridge untersucht.

	Br^-	F^-	NO_3^-	SeO_4^{2-} *	IO_3^-	HCO_3^-	PF_6^-	BF_4^-	A*	B*	C*	D*
L4	\oplus	\ominus	\ominus	\oplus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus
L7	\oplus	\ominus	\oplus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus
L4 + L7	\oplus	\ominus	\oplus	\oplus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus	\ominus

*Gegenion Na^+



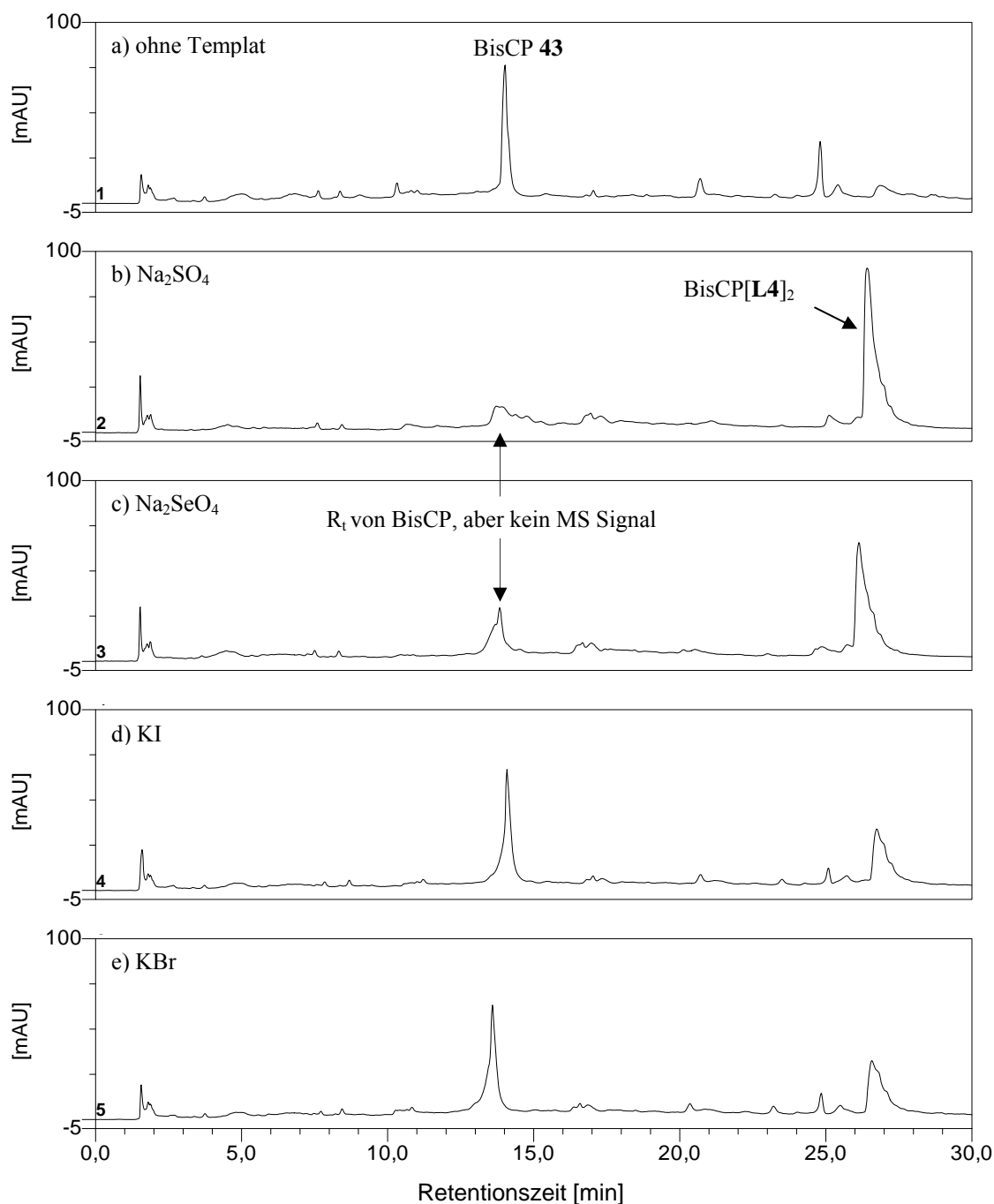


Abbildung 37 Effekt verschiedener Anionen auf die Amplifikation von BisCP[L4]₂ a)-e) Chromatogramme dieser DCLs mit und ohne die Zugabe eines Templats.

Tabelle 6 zeigt, dass zweifach verbrückte Bis(cyclopeptide) mit **L4** und **L7** als Linker anscheinend optimal für Anionen sind, die in Geometrie und Radius dem Sulfat ähneln. In Abbildung 37 sind Chromatogramme dargestellt, welche den Einfluss von Selenat und Bromid auf die Zusammensetzung der DCLs im Vergleich zu Sulfat und Iodid verdeutlichen. Bei der Zugabe von Selenat, welches in Radius (Selenat = 243 pm; Sulfat = 230 pm)³⁸, Ladung und Geometrie mit Sulfat vergleichbar ist, konnte eine Anreicherung des

Bis(cyclopeptids) BisCP[L4]₂ beobachtet werden. Im Falle von Bromid, welches wie Iodid ein sphärisches Anion jedoch mit geringerem Ionenradius ist, wird dieser Rezeptor ebenfalls, wenn auch wesentlich schwächer als im Falle von Sulfat und Selenat, amplifiziert. Außer bei diesen Anionen konnte eine geringfügige Veränderung der Bibliothekszusammensetzung nur noch im Falle von Nitrat beobachtet werden. Nitrat wurde schon zuvor von den einfach verbrückten Bis(cyclopeptiden) schwach gebunden²⁹ und scheint mit doppelt verbrückten Bis(cyclopeptiden) ebenfalls wechselwirken zu können. Dabei scheint der *para*-substituierte Linker L7 zu einem Bis(cyclopeptid) mit höherer Affinität für kleinere Anionen zu führen. Anionen mit anderen Geometrien, wie z.B. das oktaedrische Hexafluorophosphat induzierten keine Veränderung der Bibliothekszusammensetzung. Auch bei der Zugabe der Disulfonate wurde keine Amplifikation eines verbrückten Bis(cyclopeptids) beobachtet. Damit sind zumindest L4 und L7 offensichtlich ungeeignet, um Rezeptoren für sterisch anspruchsvolle Anionen auszubilden. Ob andere Linker eventuell besser geeignet sind, kann nicht ausgeschlossen werden.

Über das Ausmaß der Anreicherung in den Chromatogrammen kann allerdings nur indirekt eine Aussage über die Größe der Bindungskonstante getroffen werden, weswegen die durch dynamische kombinatorische Chemie identifizierten Rezeptoren nun isoliert und quantitative Bindungsstudien durchgeführt werden müssen. Als Zielverbindungen wurden die beiden Bis(cyclopeptide) BisCP[L4]₂ und BisCP[L7]₂ gewählt. Diese Arbeiten werden in der Gruppe unseres Kooperationspartners S. Otto derzeit durchgeführt. Sie sind noch nicht abgeschlossen, so dass bislang keine quantitativen Ergebnisse zur Anionenaffinität vorliegen. Die prinzipielle Eignung der dynamischen kombinatorischen Chemie zur Identifikation und Herstellung neuer Anionenrezeptoren auf Basis von zweifach verbrückten Bis(cyclopeptiden) konnte im Rahmen dieser Arbeit aber eindeutig demonstriert werden.

2.3 Sensoren

2.3.1 Ionenselektive Elektroden

2.3.1.1 Hintergrund

Die schnelle, zeitnahe und quantitative Detektion eines Analyts ist wichtig für viele Anwendungen in der angewandten analytischen Chemie.⁷³ Ionische Spezies, die in einer Vielzahl verschiedener Umgebungen detektiert werden müssen, sind dabei von einem besonderen Interesse. So liefert z.B. der Nachweis und die quantitative Bestimmung von Ionen in Zellen wichtige Informationen über Transportphänomene in Ionenkanälen.^{74,75}

Ein wichtiges Instrument für die Detektion von Ionen sind so genannte ionenselektive Elektroden (ISEs). Dabei wurde bei der Entwicklung von kationensensitiven Elektroden in den letzten Jahren im Gegensatz zu der von anionensensitiven Elektroden große Fortschritte gemacht,^{73,76-81} was zum Teil auf die einfachere Detektion von Kationen zurückzuführen ist.^{34,82} Anionen stellen in vielen Bereichen der Analytik jedoch sehr interessante Analyte dar. So werden z.B. Nitrat und Phosphate in der Gewässerüberwachung als Indikatoren für die Wasserqualität kontinuierlich detektiert. Dabei kommen heutzutage immer noch vorwiegend spektroskopische Methoden zum Einsatz, bei denen die Probenlösungen z.B. mit Indikatoren vorbehandelt werden müssen und die auftretende Farbänderung mit der Konzentration des Analyten korreliert werden kann. Eine zeitaufgelöste, kontinuierliche Überwachung, die mit ISEs möglich ist, gelingt mit solchen Systemen nicht.

Neben Nitrat und Phosphat, gibt es zahlreiche weitere potentiell interessante anionische Analyte, z.B. Pertechnetat (TcO_4^-). Dieses ist die stabile Oxidationsstufe von Technetium und fällt als Beiprodukt der Plutoniumproduktion an. Technetium ist ein toxisches und radioaktives Element (β -Strahler), das als Pertechnetat seine toxischen Eigenschaften nicht verliert. In den vereinigten Staaten werden Plutoniumabfälle gegenwärtig oftmals in einer festen zementartigen Form gelagert. Allerdings wird Pertechnetat in diesen so genannten CWF (cementitious waste forms) schlecht gebunden und kann so in die Umwelt gelangen.^{83,84} Die direkte, kontinuierliche Detektion von Pertechnetat zur Überwachung von Plutoniumlagern würde erheblich zur Sicherheit beitragen.

In der Praxis wird bei Messungen mit einer ISE die elektrochemische Antwort, also die Potentialänderung der Elektroden in Abhängigkeit der Konzentrationen eines Analyts, verfolgt. Die Potentiale an der Membran der Elektrode werden dabei durch die elektromotorische Kraft (EMK) hervorgerufen, welche der Summe der lokalen Potentialdifferenzen zwischen der äußeren Probenlösung und inneren Referenz-Lösung, die durch die Membran getrennt sind, entspricht. Die EMK ist bei einer solchen Messung praktisch nur von den Diffusionspotentialen der Analyte in die Membrane der ISE und von der Referenzelektrode abhängig. Der generelle Aufbau einer ISE-Messanordnung ist in Abbildung 38 dargestellt.

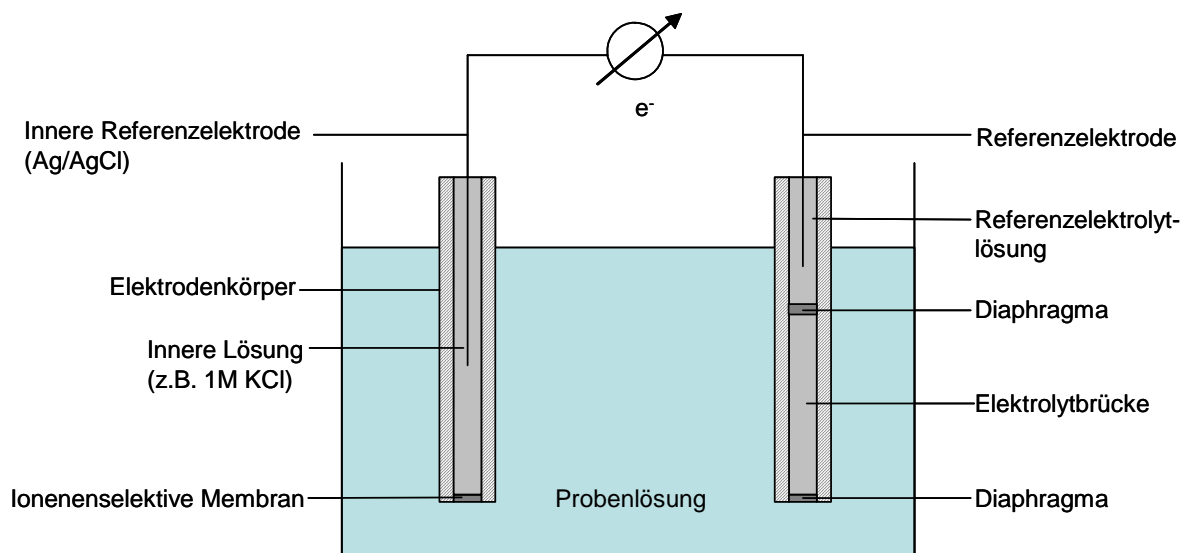


Abbildung 38 Schematischer Aufbau einer EMK-Messung (Elektromotorische Kraft) mit einer ISE.⁷³

Um die Diffusion eines anionischen Analyts in eine normalerweise unpolare Membran zu erhöhen, kann man im einfachsten Fall eine Membran verwenden, die ein Leitsalz enthält. Solche ISEs haben aber den Nachteil, dass ihre Selektivität der so genannten Hofmeister-Serie (Abbildung 39) folgt,⁸⁵ d.h. sie reagieren auf lipophile Anionen erheblich empfindlicher als auf hydrophile. Mit zunehmender Hydrophilie der Anionen wird die aufzubringende Desolvatationsenthalpie relativ zum Entropiegewinn durch den Verlust der Solvathülle des Anions beim Übergang in eine Polymermatrix immer ungünstiger, so dass solche Anionen mit ISEs schlecht detektiert werden können. In Abbildung 39 sind beispielhaft einige Anionen und ihre Position in der Hofmeister-Serie angegeben.

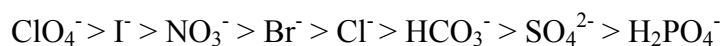


Abbildung 39 Hofmeister-Serie. Die Lipophilie fällt von links nach rechts.

Eine Strategie zur Herstellung von selektiven, nicht der Hofmeister-Serie folgenden ISEs ist daher, einen Rezeptor, der spezifisch den gewünschten Analyt erkennt, in die Polymermembran einzulagern - man bezeichnet solche Rezeptoren als Ionophore. Auf diese Weise kann die Konzentration des Analyts in der Polymermembran im Vergleich zu einer Membran ohne Ionophor deutlich erhöht werden (Abbildung 40), da die attraktiven Wechselwirkungen zwischen Ionophor und Analyt nun den Enthalpieverlust der Dehydratisierung kompensieren. Die Selektivität der ISE hängt somit von der intrinsischen Selektivität des Rezeptors/Ionophors ab.

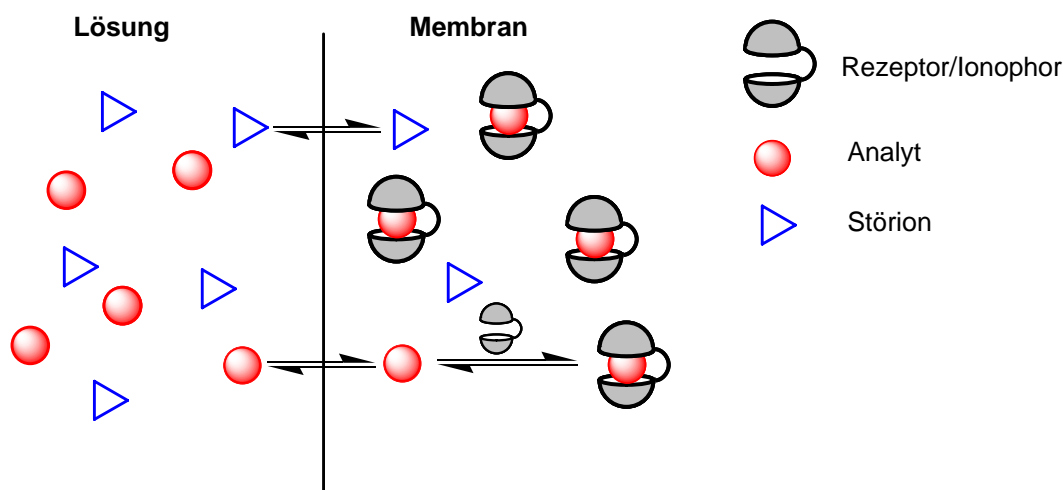


Abbildung 40 Mechanismus einer ISE Membran mit Ionophoren zur selektiven Erkennung eines Analyts.

ISEs, die eine Anti-Hofmeisterselektivität aufweisen, sind in der Literatur kaum bekannt. Schmidtchen und Pretsch setzten z.B. auf Bis(guanidinium) basierende Ionophore ein und konnten, abhängig vom Ionophor, einen selektiven Sensor für Hydrogenphosphat und Sulfat herstellen (Abbildung 41 a) und b)).^{86,87} In der Gruppe von Berrocal wurden ISEs entwickelt, die durch die Einlagerung eines mit Harnstoff funktionalisierten tripodalen Ionophors in die Membran ebenfalls selektiv für Sulfat waren (Abbildung 41 c).⁸⁸ Rezeptoren, wie der in Abbildung 41 c dargestellte, deren Anionenerkennung auf Wasserstoffbrücken beruht und die in ISEs eingesetzt werden, sind in der Literatur jedoch selten zu finden.⁸⁹⁻⁹³

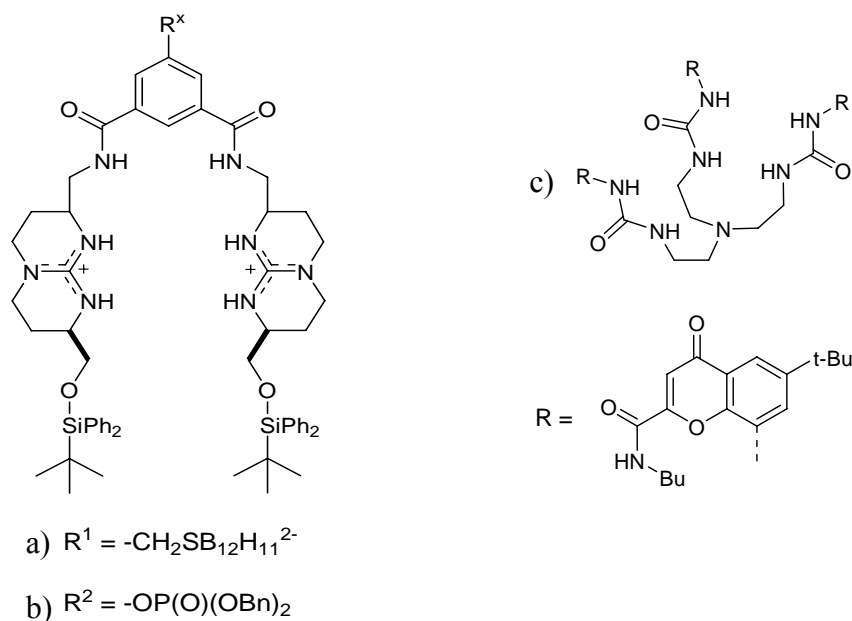


Abbildung 41 a) und b) Bis(guanidinium) Ionophore selektiv für Hydrogenphosphat oder Sulfat.⁸⁶ Im Falle von b) wurde das Dichloridsalz eingesetzt. c) Tripodaler Ionophor für Sulfat.⁸⁸

Aufgrund der vielseitigen Einsatzmöglichkeiten von ISEs mit Anti-Hofmeister Selektivität stellen die im Arbeitskreis entwickelten Anionenrezeptoren basierend auf Cyclopeptiden prinzipiell interessante Ionophore dar. So besitzen sie in Lösung die höchste Affinität für Sulfat, einem sehr hydrophilen Anion. Wenn diese Selektivität auch bei Einlagerung des Cyclopeptids in eine Polymermembran erhalten bliebe, könnte auf Basis dieses Systems eine sulfatselektive Elektrode erhalten werden. Ausgehend von diesen Überlegungen sollte die Eignung von anionenbindenden Cyclopeptiden für den Einsatz als Ionophore in ionenselektiven Elektroden überprüft werden.

Für diese Zwecke bieten sich insbesondere die einfach verbrückten Bis(cyclopeptide) an, da deren Lipophilie und damit die Löslichkeit in einer Polymermembran durch die Linkerstruktur zwischen den beiden Cyclopeptiduntereinheiten gesteuert werden kann. Durch die Verwendung von hydrophoben Bis(cyclopeptiden) könnte dem so genannten „bleeding“, d.h. dem Herauslösen des Ionophors aus der Membran, vorgebeugt werden. Dies ist ein entscheidender Faktor für die Langzeitstabilität einer Elektrode. Ein weiterer Vorteil beim Einsatz von verbrückten Bis(cyclopeptiden) ist, dass sich durch die Verbrückung die beiden zur Anionenkomplexierung notwendigen Cyclopeptidringe bereits in räumlicher Nähe befinden und die Bildung des Sandwich-Komplex nicht von der behinderten Diffusion der Cyclopeptide in der Polymermembran abhängt.

2.3.1.2 Eigene Arbeiten

Für die Herstellung von ISEs mit Polymermembranen findet man in der Literatur eine Vielzahl von Vorschriften. Die Membrane besitzen in vielen Fällen allerdings eine ähnliche Zusammensetzung, nämlich 33 % Polyvinylchlorid, 1 % Ionophor, 66 % 2-Nitrooctylphenylether als Weichmacher und 0,07 % Tetraoctylammoniumbromid als Leitsalz. Diese Mischung wurde auch für die Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Membrane verwendet. Als Ionophor wurde das mit Diphensäure verbrückte Bis(cyclopeptid) **21** ausgewählt. Rezeptor **21** stellt durch die Aryleinheiten im Biphenyllinker eine eher hydrophobe Verbindung dar, die erst ab einem Anteil von 70 % Methanol in Wasser/Methanol-Gemischen löslich ist. Mit diesem Rezeptor wurden keine Bindungsstudien in Lösung durchgeführt. Allerdings wurde ein ähnliches Derivat **22**, welches sich nur durch zwei Nitrogruppen in den Aryluntereinheiten des Linkers von **22** unterschied, untersucht. Rezeptor **22** zeigt die gewohnte Anionenaffinität mit einem Anstieg in der Reihenfolge $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{SO}_4^{2-}$. Ein analoges Verhalten kann für **21** erwartet werden, wodurch dieses Bis(cyclopeptid) einen attraktiven Ionophor für ISEs darstellt, der u.U. ein Anti-Hofmeister Verhalten induzieren könnte. Zusätzlich minimiert die Hydrophobizität des Rezeptors das Bleeding aus der Membran. Um mögliche Effekte der Flexibilität des Linkers in einfach verbrückten Bis(cyclopeptiden) auf das Ansprechverhalten von ISEs zu studieren, wurden zusätzlich auch Membrane untersucht, welche als Ionophor das mit dem Adipinsäurelinker verbrückte Bis(cyclopeptid) **2** enthielten. Weiterhin wurden Membrane in die Untersuchungen einbezogen, die das monotope Cyclopeptid **1** als Ionophor enthielten bzw. keinen Ionophor. Diese Membrane dienten als Referenzsysteme, um den Einfluss des Ionophors und dessen Struktur auf die Elektrodeneigenschaften zu studieren.

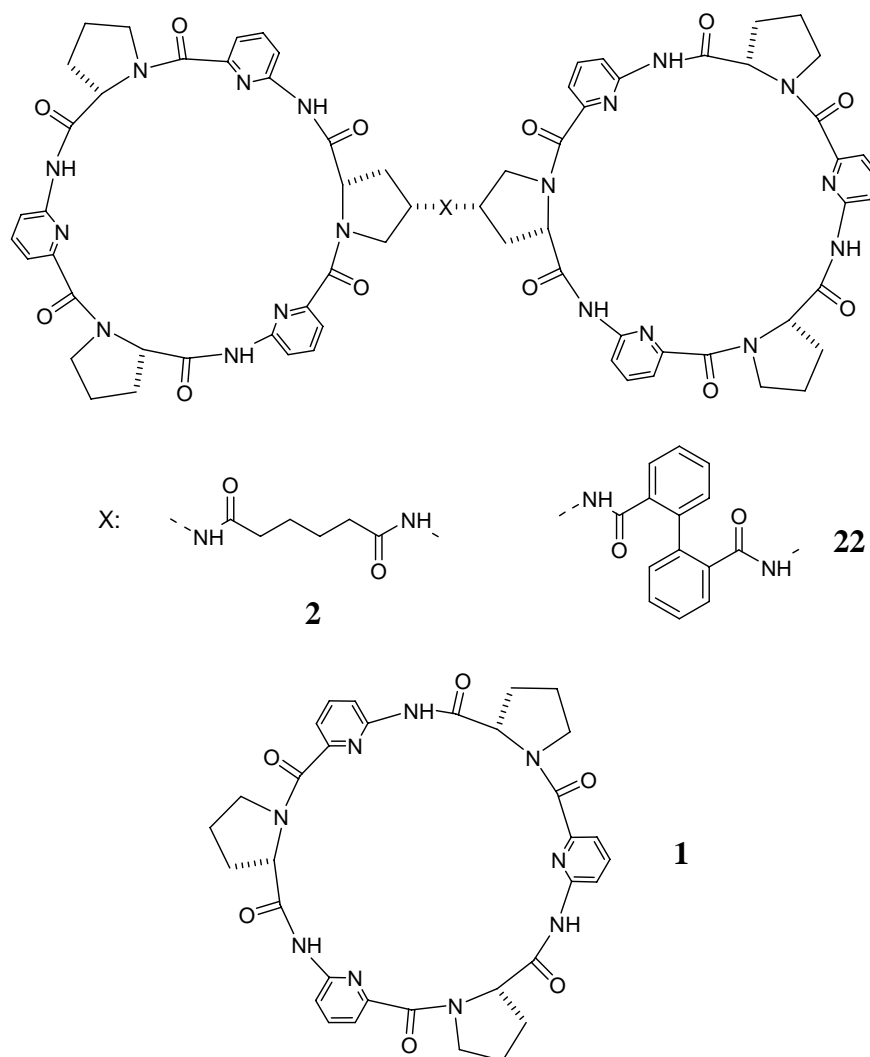


Abbildung 42 Ionophore, die zum Einsatz in den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten ISEs gekommen sind.

Alle in der Arbeit hergestellten Membranen wurden in einen Philips Elektrodenkörper eingebaut, in dem sich als Innenelektrolyt eine 1M KCl-Lösung befand. Diese Elektroden wurden mit einer Quecksilber/Quecksilbersulfat-Elektrode als Referenzelektrode kombiniert. Die Bestimmung des Potentials erfolgte in einem Versuchsaufbau, welcher dem in Abbildung 38 ähnelt. Die Messungen wurden in wässriger Lösung unter Verwendung verschiedener Anionen durchgeführt und die Konzentration des Analyts wurde systematisch variiert. Alle Experimente wurden in einem Faraday'schen Käfig durchgeführt, um eventuelle Störströme aus der Umgebung vollständig auszuschließen. In Abbildung 43 ist die gemessene Abhängigkeit des Elektrodenpotentials von der Anionenkonzentration für einige ausgewählte Messungen dargestellt.

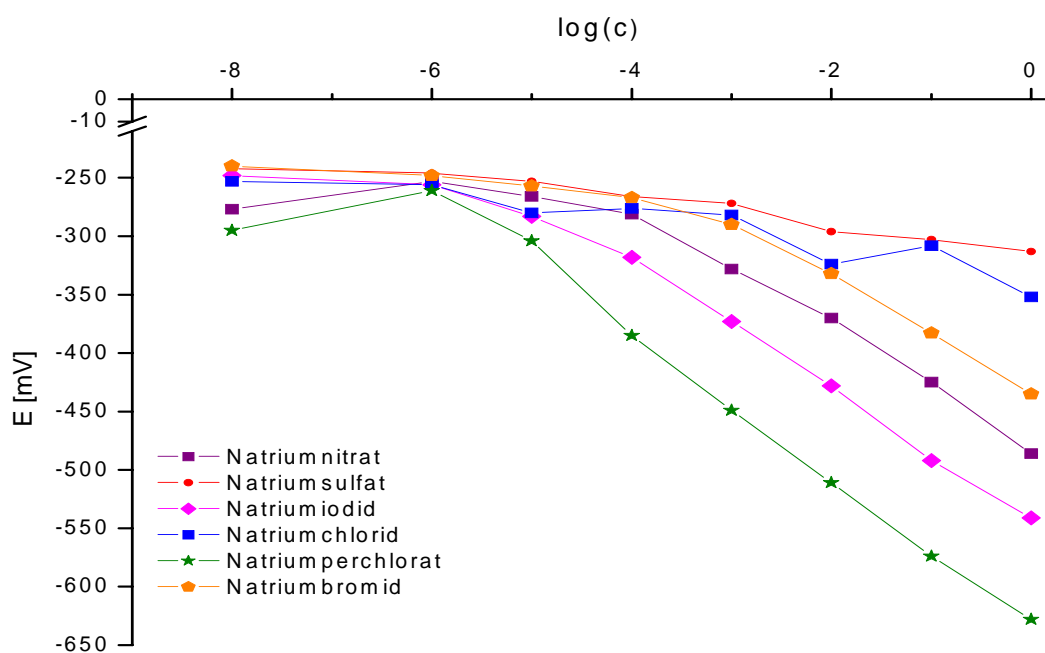


Abbildung 43 Ausgewählte $\text{Potential} \cdot \log(c)^{-1}$ Kurven für Elektroden mit 2 als Ionophor und Natriumsulfat, Natriumchlorid, Natriumbromid, Natriumnitrat, Natriumiodid und Natriumperchlorat als Analyte.

Die beobachteten Kurvenverläufe entsprechen dem für ISEs typischen Verhalten. So flacht die Kurve unterhalb eines charakteristischen Schwellenwerts ab, man spricht vom unteren Detektionslimit. Bei einer zu hohen Konzentration des Analyten wird ebenfalls ein Abflachen der Kurve beobachtet, dies ist das obere Detektionslimit. Zwischen diesen beiden Punkten verlaufen die Kurven linear. Typischerweise liegt dieser Bereich für die meisten Elektroden zwischen 10^{-5} und $10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.⁹⁴ In diesem Bereich wird die Kurve durch die Nernst'sche Gleichung (13) beschrieben, d.h. die Steigung beträgt für monovalente Anionen $-59 \text{ mV}/\log(c)$, während sie für divalenten Anionen $-29,5 \text{ mV}$ beträgt.

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{c(\text{Referenz})}{c(\text{Ion, Lösung})} \quad (13)$$

E = Elektrodenpotential

E₀ = Normalpotential

R= allgemeine Gaskonstante (8,31451 J·K⁻¹·mol⁻¹)

z = Anzahl der ausgetauschten Elektronen

F= Faradaykonstante (96485 C·mol⁻¹)

c = Konzentration

Membrane mit **21** als Ionophor zeigten leider kein zufrieden stellendes Ansprechverhalten. So konnte bei Sulfat als Analyt überhaupt keine Änderung des Elektrodenpotentials beobachtet werden und bei Bromid wurde erst bei Erhöhung des Ionophorkonzentration in der Membran auf 3 % eine Potentialdifferenz sichtbar, deren Abhängigkeit von der Analytenkonzentration mit -40,2 mV/log(c) (Tabelle 7) aber stark vom theoretischen Wert abwich. Da durch die Erhöhung der Ionophorkonzentration keine Verbesserung zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass die Ionophorenkonzentration keinen Einfluss auf die Eigenschaften dieser ISEs hat. Einzig für Iodid wurde ein Kurvenverlauf beobachtet, der mit einer Steigung von -50,7 mV/log(c) in akzeptabler Übereinstimmung mit der Nernst'schen Steigung liegt. Dieses Ergebnis deuteten an, dass der Linker in Bis(cyclopeptid) **21** möglicherweise zu starr ist, um die Anionenkomplexierung in einer Polymermatrix zu erlauben. Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen mit **21** als Ionophor eingestellt.

In den durchgeführten Messungen konnten allerdings reproduzierbare Ansprechverhalten für ISEs mit **2** als Ionophor für die Anionen Sulfat, Perchlorat, Bromid, Nitrat und Chlorid erhalten werden. Alle Messungen wurden mehrmals wiederholt. Im linearen Bereich wurden die erhaltenen Messwerte durch eine lineare Regression gefittet. Die beobachteten unteren Detektionsschwellen lagen bei ca. 10⁻⁵ mol⁻¹. Dies entspricht, wie zuvor bereits erwähnt, der typischen unteren Detektionsschwelle für ISEs. Die Steigungen der erhaltenen Titrationskurven bei der Zugabe von Perchlorat, Bromid und Nitrat entsprachen einem typischen Nernst-Verhalten mit -47 mV/log(c) bis -56 mV/log(c) und liegen in einem ähnlichen Bereich wie die Literaturbekannten Systeme. Geringfügige Abweichungen sind nicht selten.⁷³ Die für die Anionen Sulfat und Chlorid erhaltenen Daten stehen dagegen nicht im Einklang mit einem Nernst'schen Verhalten. Offensichtlich sind also ISEs bei denen **2** als Ionophor verwendet wurde, zur Detektion von Sulfat und Chlorid ungeeignet.

Das Ansprechverhalten der Elektroden mit **2** als Ionophor, also keine Empfindlichkeit für Sulfat, aber eine klare für z.B. Perchlorat, steht im Widerspruch zu der Anionenaffinität von **2** in Lösung. In homogener Lösung bildet **2** die stabilsten Komplexe mit Sulfat und im Vergleich dazu deutlich weniger stabile Komplexe mit Perchlorat. Offensichtlich korreliert die Selektivität der ISEs mit diesem Bis(cyclopeptid) als Ionophor also nicht mit der intrinsischen Anionenaffinität des Rezeptors in Lösung. Vielmehr zeigen die Elektroden typisches Hofmeister-Verhalten.

Zur Untersuchung, ob die Bis(cyclopeptide) überhaupt einen Einfluss auf das Ansprechverhalten der Elektroden besitzen, wurden weitere Elektroden hergestellt, die das monotope Cyclopeptid **1** bzw. den Dipeptidbaustein **26** als Ionophor enthielten. **26** zeigt nur eine äußerst geringe, unspezifische Anionenaffinität, was sich in einem deutlich anderem Ansprechverhalten der entsprechenden Elektroden äußern sollte, sofern eine spezifische Wechselwirkung der Bis(cyclopeptide) in den Polymermembranen die Eigenschaften der Elektroden tatsächlich beeinflusst.

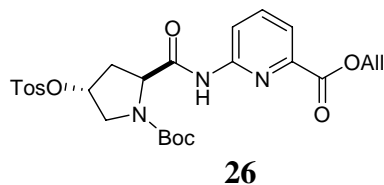


Abbildung 44 Referenzdipeptid, das für die Herstellung einer PVC-Membran eingesetzt wurde.

Alle Elektroden mit **1** bzw. **26** als Ionophore zeigten eine vergleichbare Selektivität und ein analoges Ansprechverhalten wie zuvor untersuchten Elektroden mit den verbrückten Bis(cyclopeptiden) (Tabelle 7). Dies ist ein starker Hinweis, dass die Bis(cyclopeptide), wenn überhaupt, nur einen sehr geringen spezifischen Effekt auf die elektrochemische Anionendetektion haben. Ein letzter überzeugender Hinweis darauf ist, dass Membrane ohne Ionophor ebenfalls praktisch das gleiche Verhalten zeigten wie solche mit einem Ionophor.

Tabelle 7 Abhängigkeit des Elektrodenpotential von der Analytkonzentration von ISEs mit **1**, **2**, **21** und **26** als Ionophore bzw. ohne Ionophor gegenüber verschiedener Anionen.

Ionophor	Steigung [$\text{mV} \cdot \log(c)^{-1}$]					
	Na_2SO_4	NaI	NaBr	NaNO_3	NaCl	NaClO_4
2 (1%)	-12,4	-55,9	-48,6	-50,0	-14,0	-64,2
21 (1 %)	keine	-50,7	-40,2	/	/	/
21 (3%)	keine	-50,1	-38,6	/	/	/
1 (1 %)	-9,5	-54,6	-44,3	/	/	/
26 (1 %)	/	-56,7	-37,9	/	/	/
ohne	/	-53,5	/	/	/	/

Die Ergebnisse lassen also den Schluss zu, dass ein Einbau von monotopen oder ditopen Anionenrezeptoren auf Basis unserer Cyclopeptide in PVC-Membrane kein viel versprechender Weg für die Herstellung von ISEs ist. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die effiziente Anionenbindung der Cyclopeptide in Lösung in hohem Maße auf das Lösungsmittel zurückzuführen ist. Während die Anionenbindung in polaren protischen Lösungsmitteln sehr effizient ist, ist diese in unpolaren Lösungsmitteln eher schwach und wird durch eine unsymmetrische, über intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisierte Cyclopeptidkonformation in diesen Lösungsmitteln weiter erschwert.³⁰ Der geringe Einfluss der Cyclopeptide auf die Eigenschaften der ISEs könnte darauf zurückzuführen sein, dass in einer unpolaren Polymermatrix ähnliche Effekte auftreten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die hier untersuchten ISEs ein der Hofmeister-Serie analoges Ansprechverhalten zeigten und ihre Selektivität nicht der für die Cyclopeptide in polaren Lösungsmittel beobachten entspricht. Weitere Arbeiten in diesem Zusammenhang schienen wenig aussichtsreich, so dass dieses Projekt an dieser Stelle nicht weiter verfolgt wurde.

2.3.2 Fluoreszenzsensor

2.3.2.1 Hintergrund

Für optische Nachweise anionischer Substrate durch Bindung an geeignete Sensoren gibt es in der Literatur eine Vielzahl von Beispielen.⁹⁵⁻⁹⁸ Diese Art der Anionendetektion ist vor allem deshalb reizvoll, da sie einen einfachen apparativen Aufwand erfordert und im Idealfall sogar qualitativ mit dem bloßen Auge erfolgen kann. Das Prinzip beruht auf der Veränderung des UV/Vis- oder Fluoreszenz-Spektrums eines synthetischen Rezeptors bei Bindung an den Analyten. Diese Änderung kann auf eine im Rezeptor vorliegende Signaleinheit, die sensitiv auf die Substratbindung reagiert, zurückzuführen sein. Dabei kann es sich z.B. um einen Fluorophor, einen Chromophor oder ein optisch aktives Zentrum handeln. Neben dem Einbau der signalgebenden Einheit in einen Rezeptor kann zur optischen Detektion des Bindungsvorgangs auch das so genannte *indicator displacement* Verfahren verwendet werden. Dabei bildet der Rezeptor mit einem Farbstoff, dem Indikator, einen Komplex. Bei Bindung des Analyten an den Rezeptor wird der Farbstoff aus diesem Komplex verdrängt und verändert dadurch seine optischen Eigenschaften. Voraussetzung für das Gelingen eines *indicator displacement assays* ist, dass der Analyt stärker an den Rezeptor bindet als der Farbstoff.

Beim Einbau einer signalgebenden Einheit kann ein Rezeptor z.B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher funktionalisiert werden. Bei Substratbindung werden Wechselwirkungen dieser beiden Untereinheiten entweder verstärkt oder unterbunden, so dass es zu einer Löschung oder Verstärkung der Fluoreszenz des Farbstoffs kommt. Auf diesem Prinzip basiert ein von Still et al. beschriebenes verbrücktes Bislactam, bei dem eine Lactamuntereinheit mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dansylsulfonamid und der Linker mit dem Quencher Dabcy-N-hydroxysuccinamid funktionalisiert wurden (Abbildung 45 a)).⁹⁹ In Abwesenheit eines Substrats befindet sich der Fluoreszenzfarbstoff in dem durch die beiden Lactame aufgespannten Hohlraum und seine Fluoreszenz wird durch die räumliche Nähe zum Quencher gelöscht. Bei Zugabe eines Substrats z.B. eines Tripeptids, wird der Farbstoff aus dem Hohlraum verdrängt, wodurch sich der Abstand zum Quencher vergrößert und sich die Fluoreszenz verstärkt. In diesem Beispiel konnte die beobachtete Fluoreszenzintensität mit dem Ausmaß der Komplexbildung korreliert werden. Ein anderes Beispiel für einen optischen Sensor mit eingebauter Signaleinheit stellten Fabbrizi et al. vor. Sie verwendeten ein Dizinkcryptat, das selektiv Azid bindet (Abbildung 45 b)).¹⁰⁰ Der

Rezeptor ist durch eine Anthracenuntereinheit stark fluoreszierend. Bei Zugabe von Azid, das von den Metallionen im Hohlraum des Cryptanden gebunden wird, kommt es zu einer Fluoreszenzlöschung, welche wahrscheinlich auf einem Elektronentransfer-Prozess beruht. Auch in Anwesenheit einer Reihe anderer Anionen, wie Sulfat, Nitrat, Hydrogencarbonat, Chlorid und Bromid, war dieser Rezeptor selektiv für Azid.

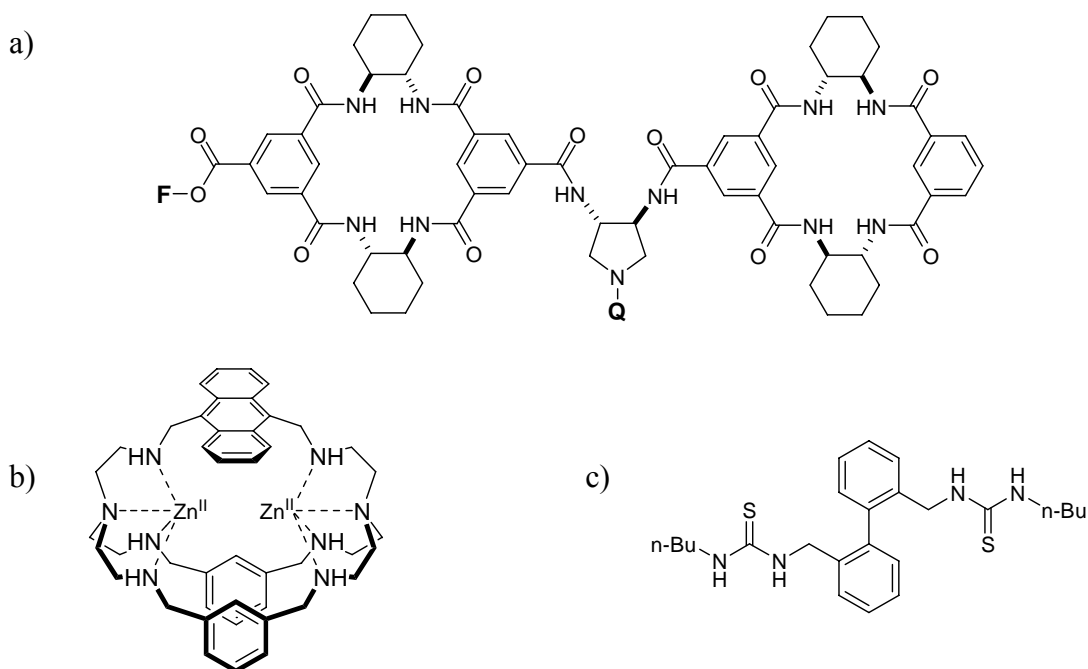
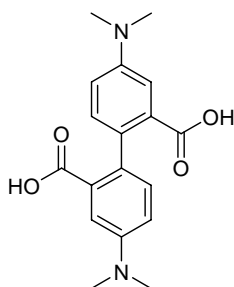


Abbildung 45 a) Von Still et al. entwickelter fluoreszenzaktiver ditoper Bislactam Rezeptor. $Q = C(O)C_6H_4N=NC_6H_4NMe_2$; $F = (CH_2)_2NH-SO_2C_{10}H_6NMe_2$.⁹⁹ b) Fluoreszenzaktiver Sensor basierend auf einem Cryptat.¹⁰¹ c) Biaryl basierender Fluoreszenzsensor für Fluorid.¹⁰²

Die Änderung der Fluoreszenz eines Rezeptors mit signalgebender Einheit kann auch durch die substratinduzierte Änderung seiner Konformation hervorgerufen werden. So zeigten Hong und Mitarbeiter, dass sich bei Zugabe von Fluorid zu dem in Abbildung 45 c) dargestellten Biarylfluorophor die Fluoreszenz erhöht.¹⁰² Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Verringerung der konformatiellen Beweglichkeit des Rezeptors bei Bindung beider Thioharnstoffeinheiten an das Anion.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte ein fluoreszenzaktives verbrücktes Bis(cyclopeptid) hergestellt werden, in dem sich ein Fluoreszenzchromophor im Linker befindet. Diese Verbindung leitet sich von Bis(cyclopeptid) **22** ab, enthält aber zwei zusätzliche Dimethylaminogruppen an der Aryleinheit des Linkers (Abbildung 46). Von 4,4'-Bis(dimethylamino)diphenylsäurederivaten ist bekannt, dass sie stark fluoreszieren und ihre

Fluoreszenzeigenschaften vom Diederwinkel zwischen den Aryleinheiten abhängen.¹⁰³ Unter der Voraussetzung, dass sich während der Komplexbildung der Diederwinkel zwischen den Aryleinheiten im Linker des entsprechenden Bis(cyclopeptids) ändert, sollte sich dies in der Veränderung der Fluoreszenzintensität bzw. der Lage des Emissionsmaximums bemerkbar machen. Ein weiterer Vorteil der Dimethylaminogruppen könnte sein, dass sie die Wasserlöslichkeit des Rezeptors im Vergleich zu der von **22** günstig beeinflussen.



44

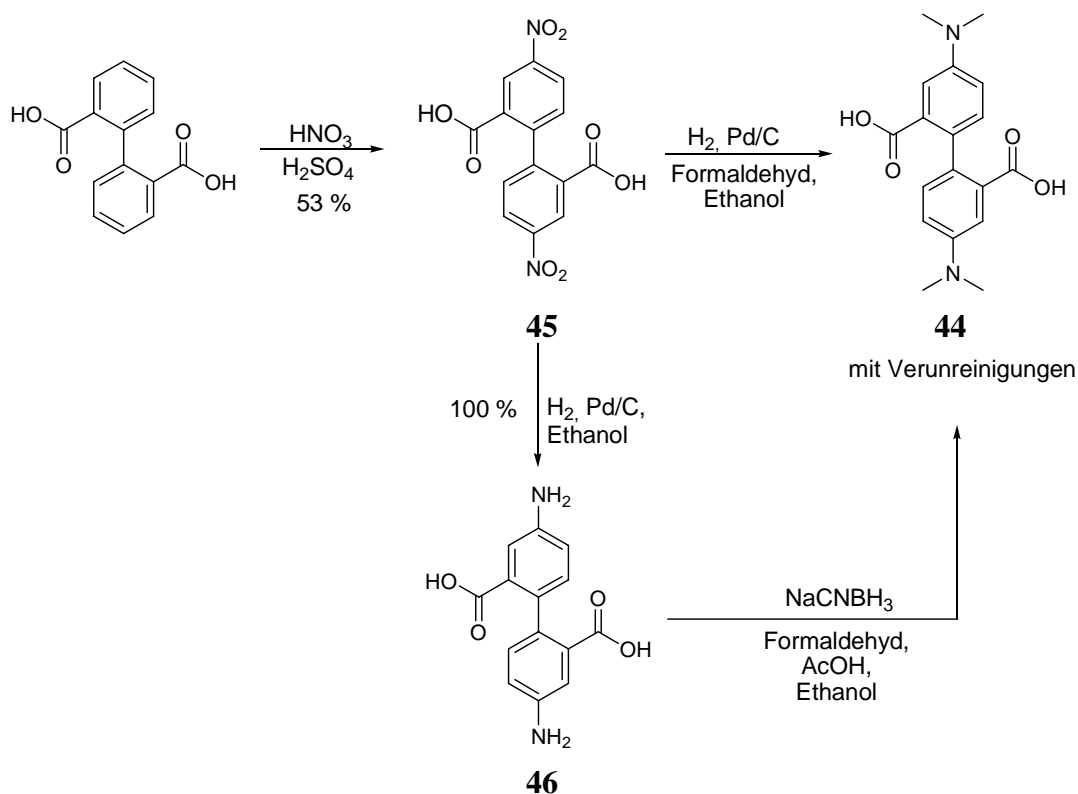
Abbildung 46 Fluoreszenzaktive Linkerstruktur **44** zur Verbrückung von zwei Cyclopeptideinheiten.

2.3.2.2 Synthesen

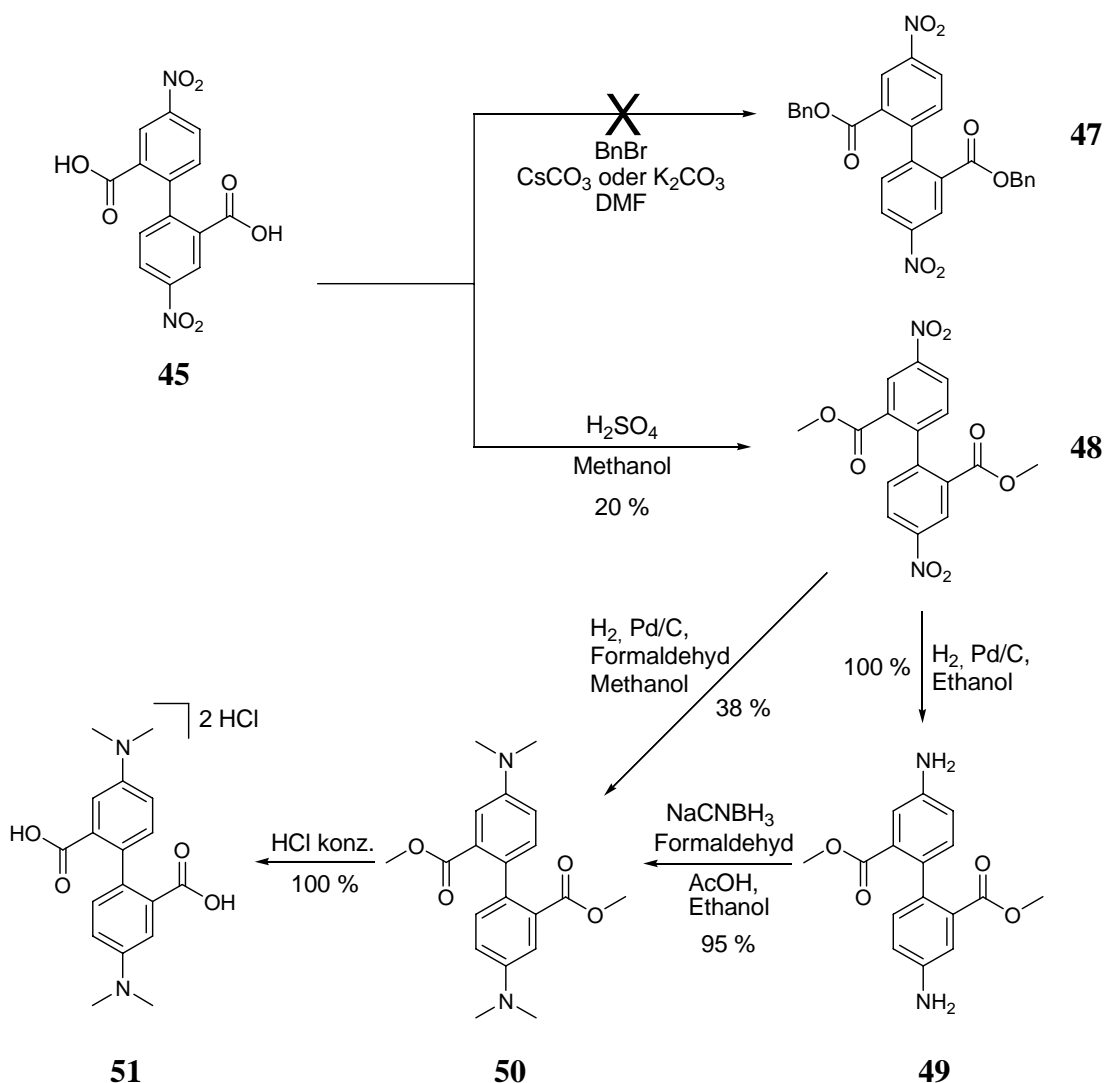
Für die Darstellung des gewünschten Anionensensors musste zunächst die Disäure **44** synthetisiert werden. Die Synthese des 4,4'-Dimethylaminodiphensäuremethylesters **50** ist bekannt.^{69,104} Ausgehend von Diphensäure wird in dieser Synthese zunächst 4,4'-Dinitrodiphensäure **45** hergestellt. Diese Verbindung wird in den entsprechenden Dimethylester überführt, der dann unter hydrogenolytischen Bedingungen zum Dimethylaminoderivat reaktiv alkyliert wird. Unter analogen Bedingungen sollte **45** dargestellt werden, wobei jedoch zunächst versucht wurde, die freie Disäure ohne Umweg über den Ester zu erhalten. Dazu wurde Diphensäure zunächst wie bekannt doppelt nitriert. Anschließend wurde versucht, das Produkt **45** durch eine reduktive Aminoalkylierung mit Wasserstoff, Pd/C und Formaldehyd direkt in die Disäure **44** zu überführen (Schema 11). Das Produkt wurde auf diesem Weg jedoch nur mit vielen Verunreinigungen erhalten, die weder durch Extraktions- noch durch chromatographische Methoden abgetrennt werden konnten. Daher wurde versucht, die reduktive Aminoalkylierung zweistufig durchzuführen, indem zunächst die Nitrogruppen unter hydrogenolytischen Bedingungen in Amine überführt und diese anschließend mit Natriumcyanoborhydrid und Formaldehyd alkyliert wurden. Allerdings wurde auch auf diesem Weg das Produkt **44** nur verunreinigt erhalten. Offensichtlich ist die intermediäre Veresterung der freien Carboxylgruppen also doch von Vorteil, da sie die Reinigung der Produkte erleichtert.

Zum Schutz von Carboxylgruppen sind insbesondere Benzylester von Vorteil, da sie auf einfache Weise hydrogenolytisch gespalten werden können. Leider gelang die doppelte Veresterung von **45** mit Benzylbromid in DMF unter Verwendung von Cäsiumcarbonat oder anderen Basen wie Natriumcarbonat nicht. Daher wurde der literaturbekannte Methylester hergestellt. Unter den beschriebenen Bedingungen konnte der Methylester **48** aus **45** in reiner Form nur nach sorgfältiger Umkristallisation in unbefriedigenden Ausbeuten von 20 % erhalten werden. Die in der Literatur beschriebene einstufige reduktive Aminoalkylierung von **48** gelang zunächst nicht, allerdings konnte das gewünschte 4,4'-Bis(dimethylamino)derivat des Diphensäuredimethylesters in einer zweistufigen Sequenz in zufrieden stellenden Ausbeuten erhalten werden. Verbindung **50** konnte problemlos chromatographisch gereinigt werden. Die abschließende Hydrolyse der Estergruppen erfolgte durch Behandeln von **50** mit konzentrierter Salzsäure in der Siedehitze. Das Produkt fällt als Dihydrochlorid **51** an. In späteren Versuchen konnte durch Variation der in der Literatur beschriebenen Bedingungen

die reduktive Aminoalkylierung von **48** auch einstufig durchgeführt werden, was die Synthese um einen Schritt reduziert (Schema 12), insgesamt jedoch mit einer deutlich schlechteren Ausbeute verbunden ist. Der Linker **51** wurde mit Hilfe dieser Synthesestrategie analysenrein erhalten.



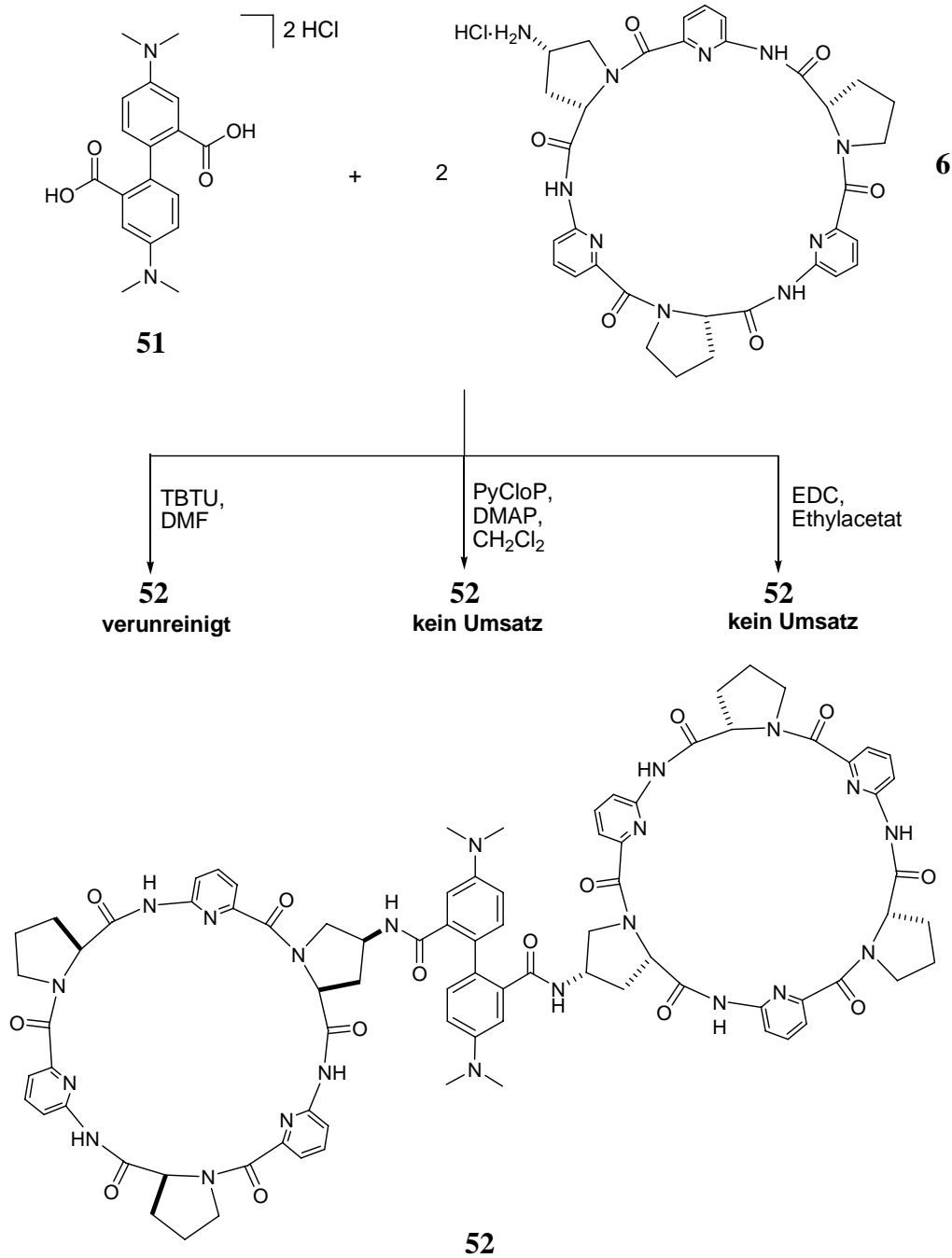
Schema 11 Versuche zur Darstellung von **44** ausgehend von **45**.



Schema 12 Synthese zur Darstellung von **51**.

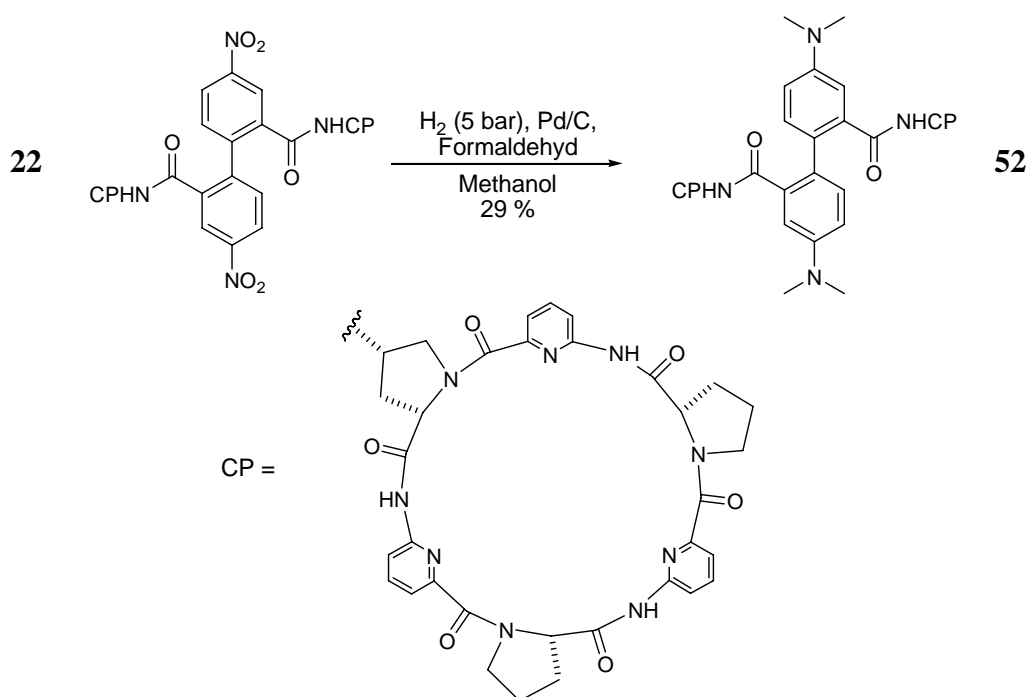
Linker **51** wurde anschließend unter den in Kapitel 2.2.1.2.2 beschriebenen Bedingungen mit Cyclopeptid **6** zum Bis(cyclopeptid) **52** umgesetzt (Schema 13). Die Bildung des gewünschten Produkts wurde durch MALDI-MS und HPLC-Analyse der Reaktionslösung bestätigt. Allerdings konnte bei der chromatographischen Aufreinigung nur verunreinigtes Produkt isoliert werden. LC-MS Untersuchungen zeigten, dass das Produktgemisch als Nebenprodukte Verbindungen enthielt, die demethylierten oder quaternisierten Derivaten zugeordnet werden konnten. Auch durch systematische Veränderungen der Kupplungsbedingungen, d.h. Wahl anderer Lösungsmittel, Kupplungsreagenzien (PyCloP, Methylchlorid; EDC, Ethylacetat) (Schema 13) sowie Einsatz des Pentafluorphenolesters von **44** zur Umgehung jeglicher Kupplungsreagenzien, konnte diese Nebenproduktbildung, deren Ursache ungeklärt ist, nicht unterdrückt werden bzw. es konnte keine Produktbildung beobachtet werden. Da die Abtrennung des gewünschten Produkts aus der anfallenden

Mischung auch mit Hilfe von semipräparativer HPLC nicht realisiert werden konnte, wurde die Synthesestrategie vollständig umgestellt.



Schema 13 Erfolgreiche Synthesestrategien zur Darstellung von **52**.

Zur Synthese der Zielverbindung **52** wurde nun das bereits bekannte Bis(cyclopeptid) **22** mit Formaldehyd, Wasserstoff und Pd/C in Methanol umgesetzt. Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen und Nebenproduktbildung zu verringern, wurde die reductive Aminoalkylierung bei 5 bar Wasserstoffdruck durchgeführt. Nach 3 Tagen konnte **52** mit Hilfe von HPLC und MALDI-MS nachgewiesen werden. Allerdings war auch in diesem Fall das Produkt verunreinigt, ließ sich aber nun über eine semipräparative HPLC Reinigung isolieren. Die Ausbeute war zwar mit 29 % nicht zufrieden stellend, es konnten jedoch ausreichende Mengen für die folgenden Bindungsstudien erhalten werden.



Schema 14 Darstellung von **52** ausgehend von **22**.

2.3.2.3 Ergebnisse

Nach der erfolgreichen Synthese von **52**, wurde die Verbindung auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber verschiedenen Anionen untersucht. Zunächst wurden analog dem Vorgehen bei einfach verbrückten Bis(cyclopeptiden) (siehe Kapitel 2.2.1.3) ESI-MS Spektren aufgenommen, die einen Hinweis auf die Bildung von Komplexen und auf deren Stöchiometrie geben sollten. Als Gäste wurden Natriumsulfat und -iodid verwendet. In Abbildung 47 ist das ESI-Massenspektrum von **52** (0,1 mM) in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol nach der Zugabe von 5 Äquivalenten Na_2SO_4 abgebildet. Man erkennt bei einem m/z Verhältnis von 860,3 das Signal einer Verbindung der Zusammensetzung $[\mathbf{52}+\text{SO}_4]^{2-}$, die auf die Bildung eines 1:1 Komplexes hinweist. Peaks, die auf Komplexe mit anderer Zusammensetzung hinweisen, sind in dem Massenspektrum nicht zu erkennen. Neben Signalen des Komplexes sind allerdings noch Signale mit einer um 14 verringerten bzw. erhöhten Masse erkennbar. Diese könnten Komplexen entsprechen, die demethylierte oder quaternisierte Derivate von **52** enthalten. Da keine Hinweise in den ^1H - oder ^{13}C -NMR Spektren bzw. in den Chromatogrammen auf das Vorliegen solcher Spezies im analysenreinen isolierten Produkt gefunden wurden, ist es wahrscheinlich, dass ihre Bildung auf Reaktionen in der Gasphase zurückzuführen ist.

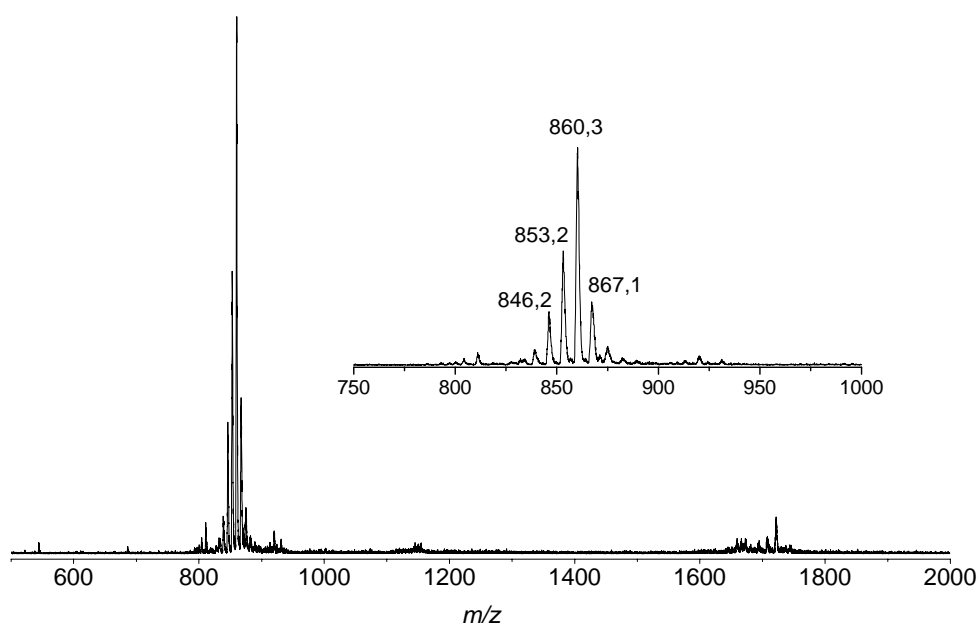


Abbildung 47 ESI-MS Spektrum von **52** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol (0,1 mM) nach der Zugabe von 5 Äquivalenten Na_2SO_4 . $[\mathbf{52}+\text{SO}_4-2\text{CH}_3]^{2-}$ (846,2); $[\mathbf{52}+\text{SO}_4-\text{CH}_3]^{2-}$ (853,2); $[\mathbf{52}+\text{SO}_4]^{2-}$ (860,3); $[\mathbf{52}+\text{SO}_4+\text{CH}_3-\text{H}]^{2-}$ (867,1).

Das ESI-Massenspektrum von **52** nach Zusatz von Natriumiodid ist in Abbildung 48 dargestellt. Unter denselben Bedingungen ist darin neben einem Signal, das dem 1:1 Komplex von **52** mit Iodid zugeordnet werden kann ($[\mathbf{52}+\text{I}]^- = 1751,6$) auch ein Peak sichtbar, der einem Komplex entspricht, in dem zwei Iodidanionen an ein Rezeptormolekül binden ($[\mathbf{52}+2\text{I}]^{2-} = 939,2$). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Kooperativität der beiden Cyclopeptiduntereinheiten von **52** bei der Anionenbindung schwächer ausgeprägt ist als die der anderen untersuchten Bis(cyclopeptide). Neben den erwähnten Signalen wurden auch in diesem Spektrum solche beobachtet deren m/z Verhältnis auf die Bildung demethylierter und quaternisierter Derivate von **52** hinweisen.

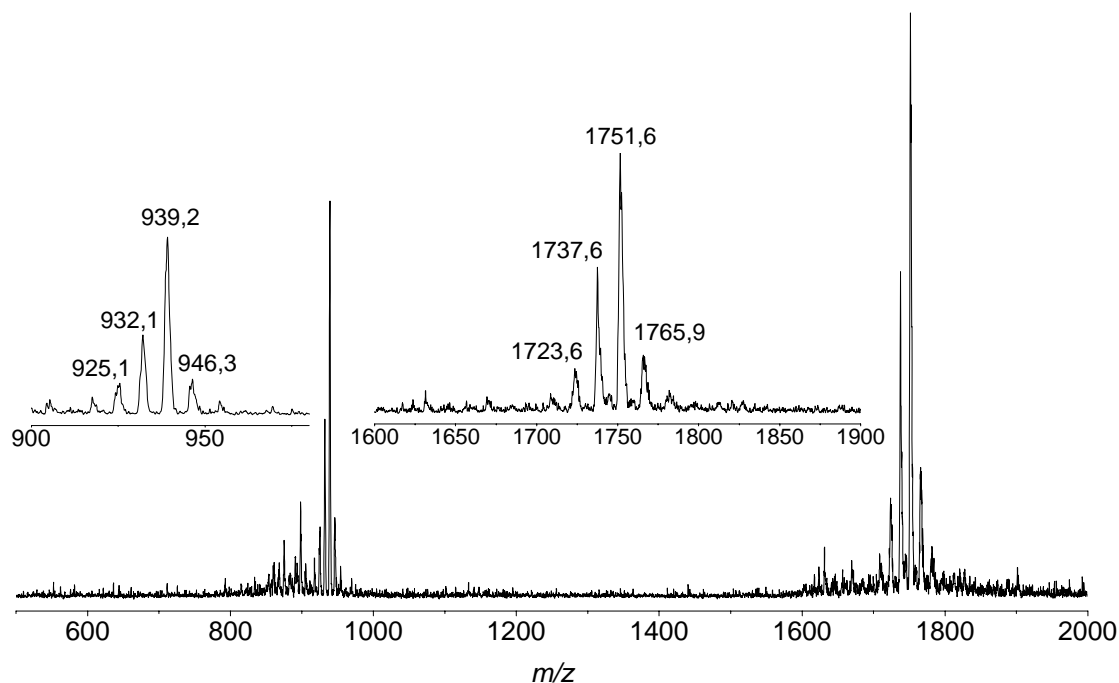


Abbildung 48 ESI-MS Spektrum von **52** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol (0,1 mM) nach der Zugabe von 5 Äquivalenten NaI. $[\mathbf{52}+2\text{I}-2\text{CH}_2]^{2-}$ (925,2); $[\mathbf{52}+2\text{I}-\text{CH}_2]^{2-}$ (932,1); $[\mathbf{52}+2\text{I}]^{2-}$ (939,2); $[\mathbf{52}+2\text{I}+\text{CH}_3-\text{H}]^{2-}$ (946,3); $[\mathbf{52}+\text{I}-2\text{CH}_2]^-$ (1723,6); $[\mathbf{52}+\text{I}-\text{CH}_2]^-$ (1751,6); $[\mathbf{52}+\text{I}]^-$ (1751,6); $[\mathbf{52}+\text{I}+\text{CH}_3-\text{H}]^-$ (1765,9).

Die ^1H -NMR Spektroskopie wurde wiederum herangezogen, um zu überprüfen, ob die Anionenkomplexe von **52** eine analoge Struktur besitzen wie die der anderen untersuchten einfach verbrückten Bis(cyclopeptide). In Abbildung 49 sind die ^1H -NMR Spektren von **52** in 1:1 (v/v) $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ in Abwesenheit (a) und in Anwesenheit (b) von 5 Äquivalenten Natriumsulfat dargestellt. Man erkennt die charakteristische Entschirmung der Protonen am

C(α) bei der Zugabe des Salzes, die auf die räumliche Nähe dieser Protonen zu dem gebundenen Anion hinweist.

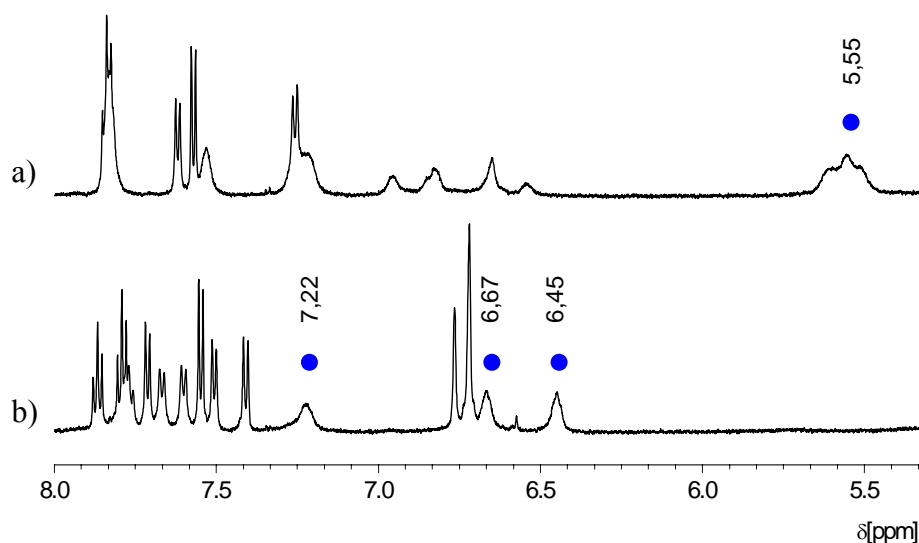


Abbildung 49 NMR-Spektren von **52** (0,25 mM) ohne Gast (a) bzw. mit 5 Äquiv. Natriumsulfat (b) in 1:1 (v/v) $D_2O/MeOD$. Die Signale der Protonen an den C(α)-Atomen der Aminoprolin- und Prolinuntereinheiten sind kenntlich gemacht.

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurden zunächst ITC-Titrationsen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Für den Sulfatkomplex wurde ein $\log K_a$ von $3,87 \pm 0,02$ und für den Iodidkomplex ein $\log K_a$ von $2,68 \pm 0,03$ ermittelt. Es muss darauf hingewiesen werden, dass bei Auswertung der Daten in beiden Fällen die Bildung eines 1:1 Komplexes angenommen wurde auch wenn die ESI-Messungen bei der Iodidbindung Hinweise auf höhere Komplexstöchiometrien gegeben haben. Vergleicht man die Stabilitätskonstanten mit denen von Rezeptor **22**, welcher anstelle der beiden Dimethylaminogruppen zwei Nitrogruppen im Linker enthält, so ist zu erkennen, dass die Komplexe von **52** um mindestens eine Größenordnung weniger stabil sind. Dies ist überraschend, da nicht damit zu rechnen war, dass der Austausch von Substituenten im Linker, also an einer von der Bindungsstelle weit entfernten Position des Rezeptors, signifikante Auswirkungen auf die Anionenaffinität hat.

Tabelle 8 *Thermodynamische Daten der Komplexbildung von Sulfat und Iodid durch die verbrückten Bis(cyclopeptide) 52 und 22 in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol. Es wurden die Natriumsalze verwendet. ΔG , ΔH und $T\Delta S$ in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $T = 298\text{ K}$.*

		52	22
SO₄²⁻	log K_a	$3,87 \pm 0,02$	$5,32 \pm 0,06$
	ΔG	$-22,2 \pm 0,1$	$-30,3 \pm 0,2$
	ΔH	$-14,0 \pm 0,6$	$-8,6 \pm 0,5$
	$T\Delta S$	$8,2 \pm 0,8$	$21,7 \pm 0,7$
I	log K_a	$2,68 \pm 0,03$	$3,61 \pm 0,07$
	ΔG	$-15,3 \pm 0,2$	$-20,6 \pm 0,4$
	ΔH	$-6,7 \pm 3,1$	$-4,2 \pm 1,5$
	$T\Delta S$	$8,6 \pm 3,0$	$15,4 \pm 3,4$

Vergleicht man die durch ITC ermittelten enthalpischen und entropischen Beiträge zur Komplexbildung von **52** mit denen von **22**, so sind deutliche Unterschiede erkennbar. So ist die Sulfatbindung bei **52** hauptsächlich enthalpisch kontrolliert während bei **22** vorwiegend entropische Einflüsse die Bindung begünstigten. Einen analogen, wenn auch weniger stark ausgeprägten Trend beobachtet man bei der Iodidbindung. Da bei Übergang von **22** zu **52** der Betrag der Komplexbildungsenthalpie aber weniger stark ansteigt als $T\Delta S$ sinkt, ergibt sich für **52** eine insgesamt geringere Komplexstabilität als für **22**.

Im nächsten Schritt wurde die Veränderung der Fluoreszenz von **52** bei Zusatz verschiedener Anionen untersucht. Als anionische Gäste wurden Sulfat, Selenat, Iodid, Bromid, Nitrat, Hydrogenphosphat, Perrhenat, Perchlorat und Chlorid (jeweils als Natriumsalz) ausgewählt, also solche deren Wechselwirkung mit verbrückten Bis(cyclopeptiden) bereits in anderen Zusammenhängen untersucht wurden. Die Messungen wurden im Lösungsmittelgemisch 1:1 (v/v) Wasser/Methanol durchgeführt.

Im Fluoreszenzspektrum besitzt **52** bei Anregung bei 300 nm eine intensive Emissionsbande bei 505 nm, die auf den Bis(dimethyl-amino)diphensäurelinker zurückzuführen ist.^{103,105} Durch Aufnahme des Fluoreszenzspektrums in Ab- und in Anwesenheit von 1 bzw. 10 Äquivalenten eines Salzes in einer 12,5 μM Lösung von **52** wurde untersucht, inwieweit die Anionen der Salze das Emissionsspektrum von **52** beeinflussen. Dabei zeigte sich, dass nur Natriumsulfat eine Veränderung des Fluoreszenzspektrums verursacht. Alle anderen verwendeten Anionen beeinflussen das Spektrum praktisch nicht (Abbildung 50). Bei Zusatz von Natriumsulfat kommt es zu einer

deutlichen Abnahme der Intensität der Fluoreszenzbande. Daneben beobachtet man bei Zugabe von 36 Äquivalenten Natriumsulfat zusätzlich den Shift des Maximums der Bande von 505 nm nach 480 nm. Auch wenn die Ursachen für dieses Verhalten zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht geklärt waren, zeigt dieses Ergebnis bereits eindeutig, dass **52** als Sensor für Anionen eingesetzt werden kann. Darüber hinaus wird die Fluoreszenz von **52** nur in Anwesenheit von Sulfat gelöscht, während acht andere untersuchte Anionen keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenz ausüben. Damit handelt es sich bei **52** um einen hochselektiven Sulfatsensor.

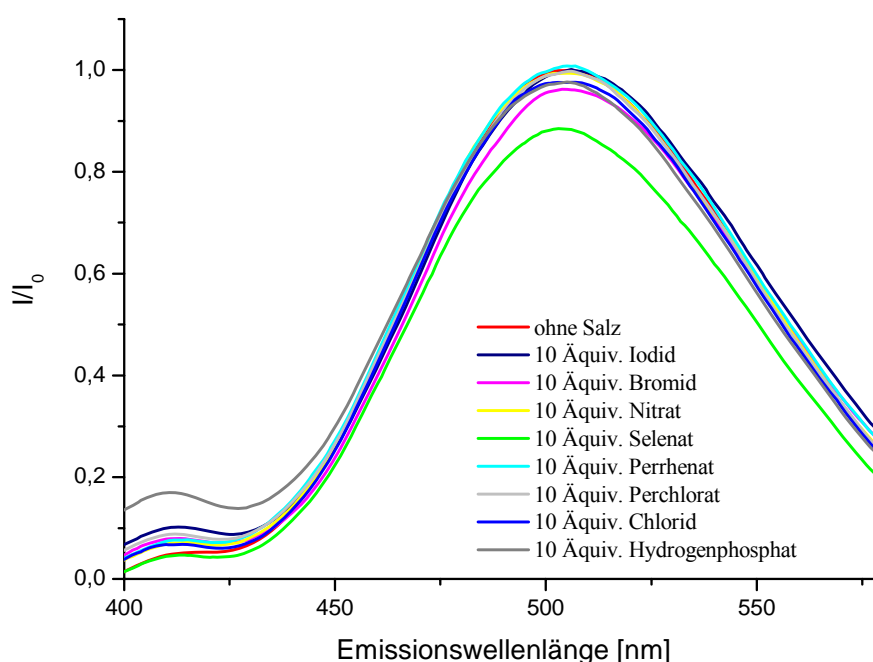


Abbildung 50 Emissionsspektren von **52** ($12,5 \mu\text{M}$) zwischen 400 und 580 nm in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol in Anwesenheit von 10 Äquivalenten der Natriumsalze von Iodid, Bromid, Nitrat, Selenat, Perrhenat, Perchlorat, Chlorid und Hydrogenphosphat.

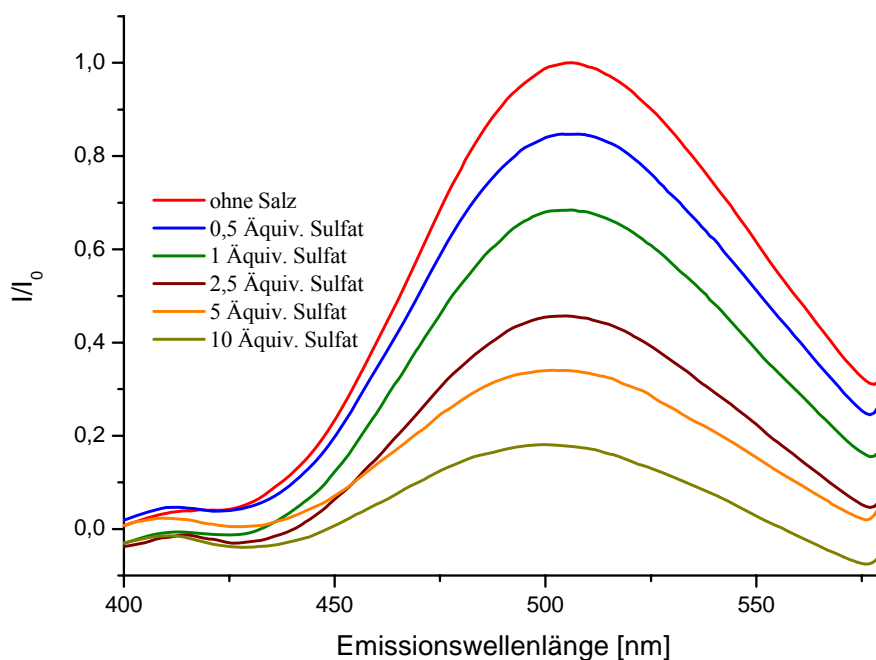


Abbildung 51 Emissionsspektren von **52** ($12,5 \mu\text{M}$) zwischen 400 und 580 nm in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol in Anwesenheit von 0 bis 10 Äquiv. Natriumsulfat.

Die Abnahme der Fluoreszenz von **52** bei Sulfatzugabe konnte ausgenutzt werden, um die Stabilitätskonstante des Sulfatkomplexes auch mit Hilfe einer Fluoreszenztitration zu bestimmen. Hierfür wurden zu einer Lösung von **52** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol steigende Mengen Natriumsulfat hinzugefügt und die Abnahme der Intensität der Emissionsbande bei 505 nm verfolgt. Die erhaltenen Messwerte wurden auf die Intensität des reinen Rezeptors normiert. Nach Auftragung gegen das Verhältnis von Wirt zu Gast ergibt sich eine Sättigungskurve, aus der die Bindungskonstante des Komplexes durch nicht-lineare Regression auf Grundlage des mathematischen Modells für einen 1:1 Komplex berechnet werden kann.^{34,106} Die Veränderungen der Rezeptor- und Salzkonzentration während der Titration wurde dabei berücksichtigt. In Abbildung 52 ist eine typische Titrationskurve einer solchen Messung und deren Fit abgebildet. Mit Hilfe dieser Methode wurde für den Sulfatkomplex eine Bindungskonstante $\log K_a$ von $4,15 \pm 0,02$ bestimmt. Diese steht in zufrieden stellender Übereinstimmung mit der durch ITC-Titrations bestimmten Bindungskonstante von $3,87 \pm 0,02$.

In praktischen Anwendungen ist es oft notwendig, einen Analyten selektiv in Gegenwart anderer, die möglicherweise in erheblichem Überschuss vorliegen, quantitativ zu bestimmen. So ist Chlorid ein Anion, welche in vielen Systemen in deutlich höheren Konzentrationen vorliegt als Sulfat. Die vorangegangenen Untersuchungen haben aber gezeigt, dass Chlorid

die Fluoreszenz von **52** nicht zu löschen vermag. Es war daher interessant zu untersuchen, ob die qualitative und quantitative Detektion von Sulfat auch in Gegenwart eines Überschusses von Chlorid gelingt. Die Fluoreszenztitrations wurden dementsprechend wiederholt, die Lösungen enthielten aber zusätzlich 100 Äquivalente Chlorid bezogen auf die Rezeptormenge. Unter diesen Bedingungen wurde für den Sulfatkomplex eine Bindungskonstante $\log K_a$ von $4,12 \pm 0,04$ bestimmt, also praktisch dieselbe, die auch bei der Titration in Abwesenheit von Natriumchlorid erhalten wurde. Dies zeigt zweierlei: Zum einen gelingt die qualitative Detektion von Natriumsulfat in wässrigen Lösungsmitteln auch in Anwesenheit eines großen Überschusses von Natriumchlorid. Zweitens konkurriert Chlorid praktisch nicht um die Bindungsstellen am Rezeptor, da es die quantitative Messung praktisch nicht beeinflusst. Auch dieses Ergebnis belegt die hohe Sulfatselektivität von **52**.

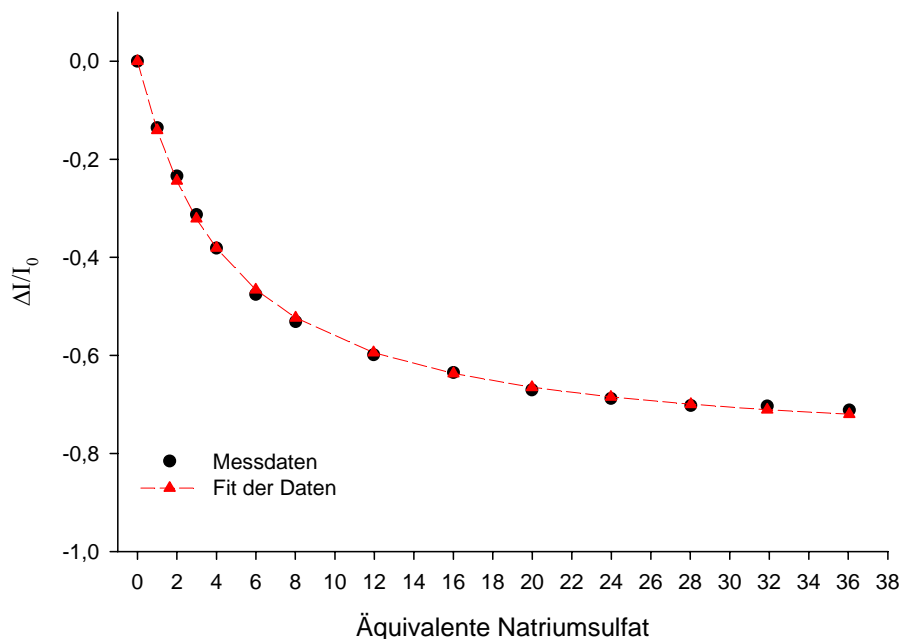


Abbildung 52 Typische Titrationskurve von **52** bei Zugabe von 0 bis 36 Äquivalenten Natriumsulfat in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol.

Die deutlich geringere Anionenaffinität von **52** im Vergleich zu **22** muss ihre Ursache in den unterschiedlichen elektronischen Effekten der Substituenten im Biarylsystem haben. Der $-M$ -Effekt der Nitrogruppen in **22** sollte den Doppelbindungscharakter der Bindung zwischen den Aryluntereinheiten schwächen während die Dimethylaminogruppen in **52**, welche in Konjugation zu den Carboxylgruppen stehen, auf Grund ihres $+M$ -Effekts den Doppelbindungscharakter erhöhen müssten. Dies könnte sich in einem unterschiedlichen

Torsionswinkel an der zentralen Bindung der Diphenylsäurelinker in **22** und **52** äußern. Um zu überprüfen, ob diese Hypothese richtig ist, wurden theoretische Berechnungen an Modellsystemen durchgeführt. Hierbei wurden die Vorzugskonformationen der in Abbildung 53 dargestellten 4,4'-disubstituierten 2,2'-Diformylbiphenylen mit Hilfe der DFT-Methode (B3LYP) unter Verwendung des 6-31G* Basissatzes berechnet. Die Torsionswinkel zwischen den Aryluntereinheiten, die bei diesen Rechnungen erhalten wurden, sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

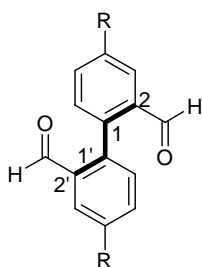


Abbildung 53 Modellsystem für die Torsionswinkelberechnungen mit $R = H, NO_2, NMe_2$.

Tabelle 9 Durch DFT Berechnungen ermittelte Torsionswinkel $C^2-C^1-C^{1'}-C^{2'}$ der Vorzugskonformationen von 4, 4' disubstituierten 2,2'-Diformylbiphenylderivaten.

R	Torsionswinkel [°]
H	-119,1
NO ₂	-83,8
NMe ₂	-125,4

Tabelle 9 zeigt, dass im unsubstituierten Biphenylsystem ein Torsionswinkel von $-119,1^\circ$ bevorzugt wird, während der Winkel im Dinitroderivat auf $-83,8^\circ$ verkleinert wird. Man kann davon ausgehen, dass der Torsionswinkel an den Aryleinheiten von Biphenylen den Versuch des Systems widerspiegelt, eine optimale Konjugation bei gleichzeitig minimaler sterischer Wechselwirkung zu erreichen. Der Torsionswinkel des unsubstituierten Systems wird ausschließlich durch Effekte der Substituenten in 2 und 2' Stellung kontrolliert. Zusätzliche elektronische Effekte sind nicht vorhanden.

Bei dem 4,4'-dinitrosubstituierten Derivat kommen die $-M$ -Effekte der Nitrogruppen hinzu. Diese sollten die Konjugation zwischen den beiden Arylringen weiter schwächen. Dadurch können die beiden Ringe sich praktisch in einem 90° Winkel zueinander anordnen, was sterische Wechselwirkungen minimieren sollte.

Genau das Gegenteil ist beim 4,4'-Bis(dimethylamino)-substituierten Biphenylderivat der Fall. Hierfür wurde ein Torsionswinkel von $-125,4^\circ$ berechnet. Dies spricht dafür, dass in dieser Verbindung die im Vergleich zum unsubstituierten Derivat verstärkte Konjugation (Abbildung 54) der beiden Aryleinheiten versucht, die Ringe soweit wie möglich in eine coplanare Anordnung drängt.

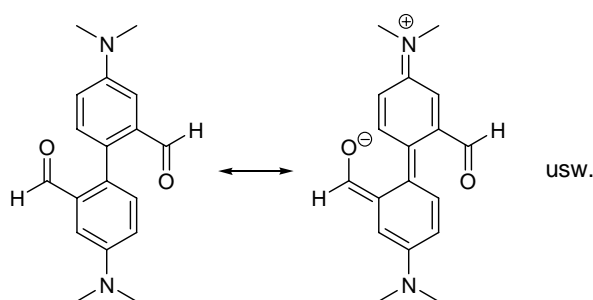


Abbildung 54 Resonanzstrukturen in einem 4,4'-Dimethylamino-2,2'-diformylbiphenyl.

Die Berechnungen legen also nahe, dass 4,4'-dinitrosubstituierte 2,2'-Diformylbiphenyle signifikant andere Vorzugskonformationen besitzen sollten als die entsprechenden 4,4'-dimethylaminosubstituierten Analoga. Arbeiten, die sich mit der Abhängigkeit der Torsionswinkel in Biarylen von den Substituenten beschäftigen und diese Annahme bestätigen, wurden leider nicht gefunden. Solche Verbindungen werden zwar auch in einer Reihe von Fluoreszenzsensoren verwendet, die entsprechenden Arbeiten gehen auf Torsionswinkel jedoch nicht ein. Eine Recherche in der Cambridge Crystallographic Database lieferte aber Kristallstrukturen dreier Derivate (Abbildung 55), die mit den hier untersuchten strukturell verwandt sind. Die aus den Kristallstrukturen bestimmten Torsionswinkel ($C^2-C^1-C^{1'}-C^{2'}$) sind in Abbildung 55 angegeben.

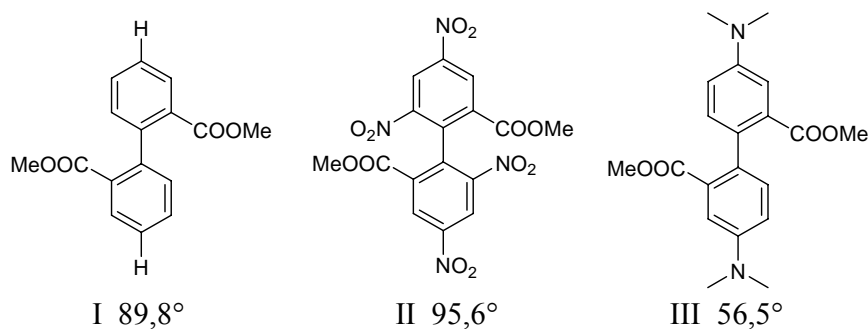


Abbildung 55 Die durch eine Recherche in der Cambridge Crystallographic Database gefundenen Biphenylderivate und ihre Torsionswinkel zwischen $C^2-C^1-C^{1'}-C^{2'}$.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

Der Winkel im unsubstituierten Dimethyldicarboxylat **1** von $89,8^\circ$ weicht von dem berechneten Winkel im entsprechenden Diformylderivat von $119,1^\circ$ deutlich ab.¹⁰⁷ Das in Abbildung 55 dargestellte Dinitroderivat hat, wie das berechnete Dinitrodiformylbiphenyl, einen Torsionswinkel von ca. 90° ,¹⁰⁸ die Verbindungen sind auf Grund der zusätzlichen Nitrogruppen in 6 und 6'-Position im Dimethyldicarboxylat, deren sterische Effekte nicht vernachlässigt werden dürfen, jedoch nicht direkt vergleichbar. Der sehr kleine Winkel in Struktur III ist darauf zurückzuführen, dass die beiden Substituenten in 2-Position im Kristall *syn* angeordnet sind.¹⁰⁹ Die Berechnungen wurden aber für das *anti*-Konformer durchgeführt. Vergleicht man also den Torsionswinkel $C^4-C^1-C^{1'}-C^6$ in der Kristallstruktur des 4,4'-Bis(dimethylamino)-diphensäuredimethylesters von $125,4^\circ$ mit dem berechneten Torsionswinkel im entsprechenden Diformylderivat, so ist die Übereinstimmung sehr gut. Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Torsionswinkel in den Kristallstrukturen zusätzlich durch Packungseffekte beeinflusst werden, ist die Abhängigkeit des Torsionswinkels zwischen den Aryleinheiten von Biphenylderivaten vom Substitutionsmuster deutlich erkennbar. Der bei den Berechnungen beobachtete Trend, dass Elektronendonatoren in 4 und 4' Position eine mehr coplanare Anordnung der Arylringe induzieren ist, in den Kristallstrukturen der publizierten Biphenylderivate ebenfalls nachvollziehbar.

Welche Auswirkungen haben die unterschiedlichen Vorzugskonformationen der Linker in **22** und **52** nun auf die Anionenaffinität dieser beiden Bis(cyclopeptide)? Hierfür wurde zusätzlich die Struktur des Iodidkomplexes von Bis(cyclopeptid) **20**, das unsubstituierte Diphensäure als Linker enthält, berechnet. Je nach Methode ergaben sich Torsionswinkel ($C^2-C^1-C^{1'}-C^{2'}$) der beiden Aryleinheiten im Linker von $-83,6^\circ$ (Kraftfeld, MMFF) und $-89,3^\circ$ (semiempirisch, AM1). Die berechnete Struktur des Komplexes ist in Abbildung 56 gezeigt.

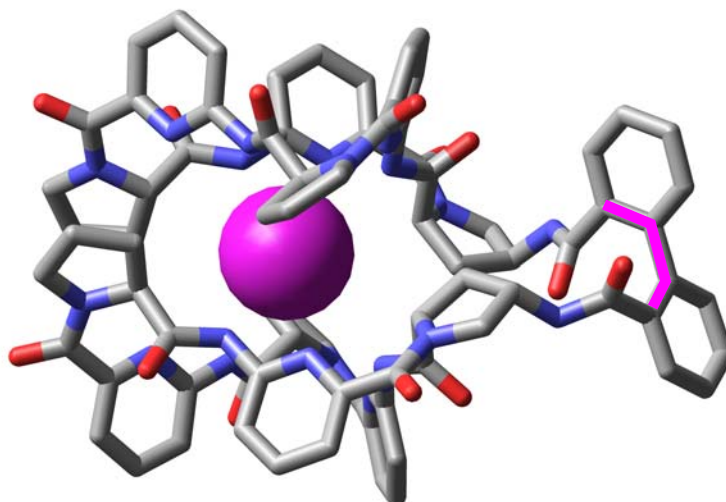


Abbildung 56 Berechnete Struktur des Iodidkomplexes von **20** (semiempirisch, AM1). Es wurden die Bindungen, zwischen denen der Torsionswinkel ermittelt wurde, hervorgehoben. Wasserstoffe an C-Atomen wurden zur besseren Übersichtlichkeit ausgeblendet.

Der Torsionswinkel der Aryleinheiten im Linker von **20** bzw. den substituierten Derivaten **22** und **52** wird in den Anionenkomplexen durch die relative Anordnung der Cyclopeptidringe bestimmt. Man kann davon ausgehen, dass Linker, in denen die Aryleinheiten auch in Abwesenheit eines Anions bereits in der richtigen Orientierung angeordnet sind, für die Komplexbildung günstiger sein sollten, als solche, deren Vorzugskonformation weit von der notwendigen Konformation im Komplex abweicht. Auf Basis dieser Überlegungen ist die höhere Affinität von **22** leicht verständlich, denn das 4,4'-Dinitrodiphenylsäurederivat sollte auch in Anwesenheit von Anionen die beiden Cyclopeptidringe in einer für die Anionenkomplexierung günstigen Konformation vororganisieren. Im Komplex weist die Konformation der beiden Aryleinheiten wenig von der optimalen Konformation ab. Anders ist dies bei **52**. Für die Komplexbildung muss der Winkel zwischen den beiden Aryleinheiten auf ca. -90° verkleinert werden. Nimmt man an, dass der optimale Torsionswinkel -125° (berechnete *anti*-Form) bzw. 55° (*syn*-Form) beträgt. Ist eine Verdrillung der Arylringe um ca. 30° notwendig, was einer Konformation entsprechen sollte, die ein lokales Maximum auf der Potentialkurve darstellt. Dieser energetisch ungünstige Prozess äußert sich klar in der im Vergleich zu **22** deutlich geringeren Anionenaffinität von **52**.

Im Einklang mit dieser Annahme steht die Tatsache, dass es bei Komplexbildung von **52** zu einer Löschung der Fluoreszenz des Biphenyllinkers kommt. Bei der Komplexbildung müssen die beiden Aryleinheiten im Linker nämlich einen Torsionswinkel von fast 90°

annehmen. Dabei wird die Konjugation der Aryleinheiten völlig unterbunden und die Fluoreszenz damit einhergehend ebenfalls. Schwerer verständlich ist allerdings das Ergebnis der ITC-Titrations. Hier hat sich gezeigt, dass die Komplexbildung von **52** enthalpisch günstiger ist als die von **22**. Ist die Komplexbildung von **52** mit einer energetisch ungünstigen Linkerkonformation verbunden, so sollte man eigentlich einen enthalpisch ungünstigeren Enthalpiebeitrag bei der Komplexbildung erwarten. Da man allerdings davon ausgehen muss, dass **22** und **52** in Abwesenheit von Anionen unterschiedliche Ausgangskonformationen besitzen, sind bei der Komplexbildung dieser beiden Rezeptoren die enthalpischen und entropischen Faktoren der Lösungsmittelreorganisation wahrscheinlich ebenfalls völlig unterschiedlich. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen thermodynamischen Parameter der Komplexbildung von **52** und **22** im Wesentlichen auf diesen Effekt zurückzuführen ist. Die günstigere Komplexbildungsentropie bei **22** ist aber mit einer besseren Vororganisation dieses Rezeptors und einem damit verbundenen weniger stark ausgeprägten Verlust von konformativen Freiheitsgraden bei der Komplexbildung vereinbar.

Zusammenfassend konnte mit Rezeptor **52** ein neuartiger Fluoreszenzsensor entwickelt werden, der eine hohe Selektivität für Sulfat besitzt. Diese Selektivität ist darauf zurückzuführen, dass die Anionenaffinität von **52** im Vergleich zu **22** auf ein Maß reduziert wurde, dass nur noch die Bindung des besten Gastes, des doppelt geladenen Sulfatanions möglich ist. Durch theoretische Betrachtungen wurde die Reduktion der Anionenaffinität von **52** im Vergleich zu der von **22** auf elektronische Einflüsse der Dimethylaminosubstituenten im Linker zurückgeführt. Diese Betrachtungen lieferten auch eine Erklärung, warum die Fluoreszenz von **52** bei Sulfatbindung gelöscht wird. Interessanterweise ermöglicht **52** die qualitative und quantitative Sulfatdetektion auch in Gegenwart eines 100fachen Überschuss von Chloridionen, was für praktische Anwendungen außerordentlich wichtig sein könnte.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen meiner Promotion sollten neue Anionenrezeptoren auf Basis der in der Arbeitsgruppe von Kubik untersuchten Bis(cyclopeptide) entwickelt werden. Meine Arbeit gliedert sich dabei in vier Kapitel. Im ersten habe ich den Einfluss der Linkerstruktur auf die Anionenaffinität einfach verbrückter Bis(cyclopeptide) systematisch untersucht. Dazu habe ich die Rezeptoren **3**, **20** und **22** erstmals synthetisiert.

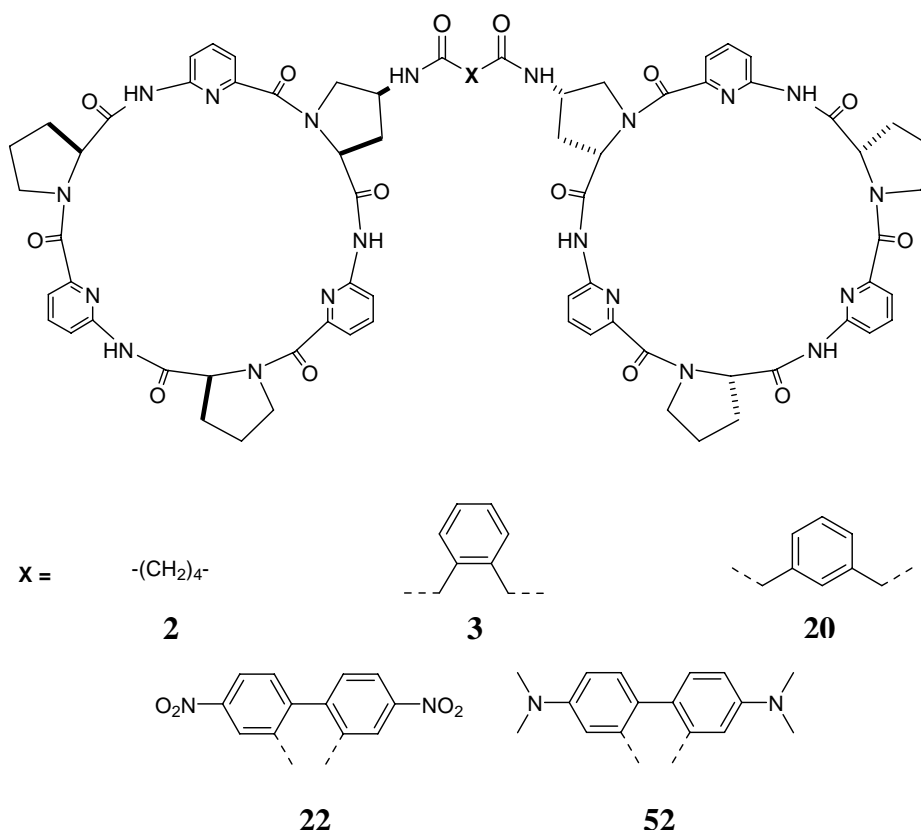


Abbildung 57 Das bekannte Bis(cyclopeptid) **2** und die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Bis(cyclopeptiden) **3**, **20** und **22** sowie der Fluoreszenzsensor **52**.

Die Bis(cyclopeptide) **3** und **22** enthalten Linker mit gleicher Anzahl C-Atome wie das vor meiner Arbeit bereits publizierte Bis(cyclopeptid) **2**, die Linker werden aber zunehmend starrer. Der Linker in Bis(cyclopeptid) **20** wurde durch ein strukturbasiertes *de novo* Design mit Hilfe der HostDesigner Software in Kooperation mit B. Hay entworfen. Es handelt sich um ein Konstitutionsisomer des Linkers in **3**.

Die Charakterisierung der Komplexierungsgleichgewichte dieser Rezeptoren mit den Anionen Chlorid, Bromid, Iodid und Sulfat in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol mit Hilfe der

isothermen Titrationskalorimetrie zeigten zunächst, dass alle Rezeptoren wie Bis(cyclopeptid) **2** die stabilsten Komplexe mit Iodid und Sulfat bilden, was auf die Größe des zur Verfügung stehenden Hohlraums zurückzuführen werden kann. Durch die verschiedenen Linker wird die Affinität der Rezeptoren für jedes einzelne Anion wenig beeinflusst, die Stabilitäten der Sulfatkomplexe der Bis(cyclopeptide) **2**, **3**, **20** und **22** unterscheiden sich z.B. um nicht einmal eine Größenordnung. Allerdings hat die Variation der Linkerstruktur einen deutlichen Einfluss auf die enthalpischen und entropischen Beiträge zur Komplexbildung. Allgemein wird beobachtet, dass die Komplexbildungsentropie mit Zunahme der konformativen Rigidität des Linkers günstig beeinflusst wird. Gleichzeitig kommt es aber zu einer Abnahme des Beitrags der Bindungsenthalpie, so dass ähnliche Komplexstabilitäten resultieren. Der beste Rezeptor in dieser Reihe ist Bis(cyclopeptid) **20**. Interessanterweise wurde hierbei beim Iodidkomplex sowohl eine günstigere Bindungsenthalpie als auch –entropie im Vergleich zum flexiblen Rezeptor **2** beobachtet, wodurch letztlich eine hohe Bindungskonstante resultiert. Rezeptor **20** ist darüber hinaus einer der effizientesten neutralen Rezeptoren für Sulfat in wässrigen Lösungsmitteln, obgleich die durch dynamische kombinatorische Chemie identifizierten einfach verbrückten Bis(cyclopeptide) eine noch höhere Sulfataffinität besitzen.⁵⁶

Im zweiten Teil meiner Promotion habe ich mich mit der Identifizierung von Anionenrezeptoren auf Basis zweifach verbrückter Bis(cyclopeptide) beschäftigt. Hierzu habe ich zunächst das Bis(cyclopeptid) **43** synthetisiert, das als Cyclopeptidkomponente zur Herstellung von dynamischen kombinatorischen Bibliotheken dienen konnte. Diese Bibliotheken wurden erzeugt, indem **43** mit verschiedenen Dithiolen, die als potentielle Linker zwischen zwei Cyclopeptidringe eingebaut werden können, gemischt wurde. Als reversible Reaktion, die für die Einstellung des dynamischen Gleichgewichts zwischen den Bibliotheksbestandteilen verantwortlich war, diente der Disulfidaustausch, der durch Veränderung des pH Werts von basisch auf sauer zum Erliegen gebracht werden kann. Durch Vergleich der Zusammensetzung einer dynamischen Bibliothek in Ab- und Anwesenheit eines Salzes, dessen Anion mit den in der Bibliothek potentiell vorhandenen Anionenrezeptoren wechselwirken kann, sollten Linker identifiziert werden, deren Einbau zwischen zwei Cyclopeptidringe zu effizienten Rezeptoren führt.

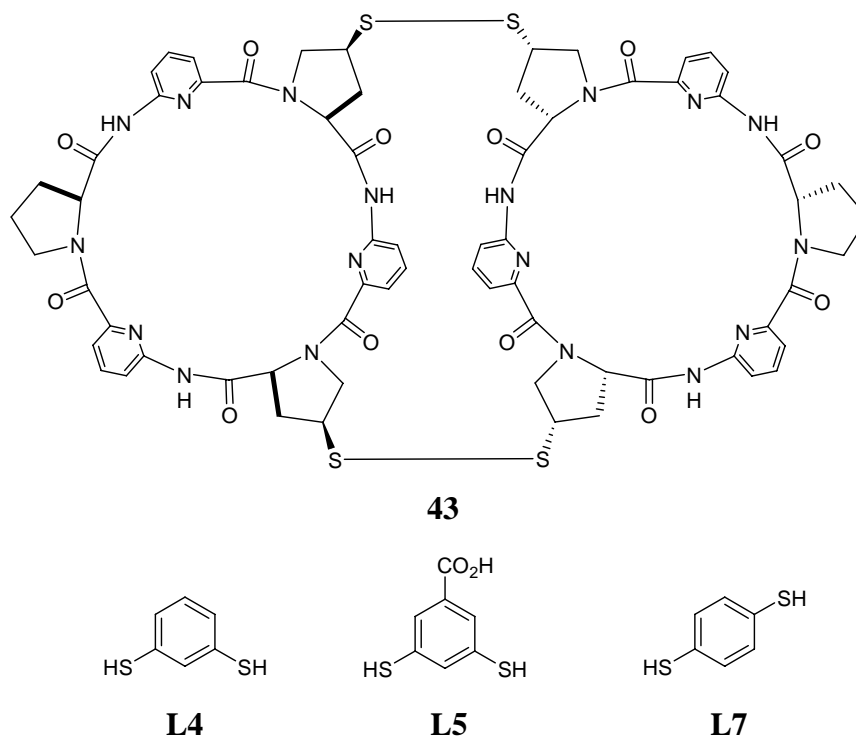


Abbildung 58 Zum Einsatz in DCLs verwendetes Bis(cyclopeptid)disulfid **43** und die identifizierten Linker **L4**, **L5** und **L7**.

In systematischen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass der Einbau der Linker **L4**, **L5** und **L7** zu Anionenrezeptoren führt. Dabei enthalten die Rezeptoren immer nur eine Art von Linker. Die Bildung zweifach verbrückter Bis(cyclopeptide) mit verschiedenen Linkern wurde nur bei den strukturell analogen Linkern **L4** und **L5** beobachtet. In weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass die so gebildeten zweifach verbrückten Bis(cyclopeptide) am besten mit Anionen wechselwirken, die in der Geometrie und dem Radius Sulfat und Iodid ähneln. Rezeptoren für größere organische Anionen konnten nicht identifiziert werden. Die in diesen Untersuchungen identifizierten Verbindungen BisCP[**L4**]₂ und BisCP[**L7**]₂ mussten nun in größerem Maßstab synthetisiert und ihre Bindungseigenschaften quantitativ charakterisiert werden. Diese Untersuchungen werden zurzeit von unserem Kooperationspartner in Cambridge, U.K. durchgeführt und sind noch nicht abgeschlossen. Auf Grund dessen sind detaillierte Aussagen über die Bindungsaffinität und –selektivität noch nicht möglich.

In den letzten beiden Teilen meiner Dissertation habe ich mich mit der Entwicklung von Sensoren auf Basis von Bis(cyclopeptiden) beschäftigt. Dabei habe ich zunächst überprüft, ob sich Bis(cyclopeptide) für den Einsatz als Ionophore in ionenselektiven Elektroden eignen. In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass eine Einlagerung von Bis(cyclopeptiden) in die

Polymermembranen von Elektroden nicht zu Systemen führt, deren Antwortverhalten die intrinsische Anionenselektivität der Bis(cyclopeptide) widerspiegelt. Das in Lösung effizient gebundene Sulfat kann z.B. durch eine entsprechende Elektrode nicht detektiert werden. Dieses Ergebnis wurde auf die deutlich geringere Anionenaffinität der Bis(cyclopeptide) in der unpolaren Umgebung einer Polymermembran im Vergleich zu polar, protischen Umgebungen zurückgeführt.

Durch Einbau eines fluoreszenzaktiven Linkers zwischen zwei Cyclopeptidringe ist es mir aber gelungen, ein einfach verbrücktes Bis(cyclopeptid) **52** zu synthetisieren, das in wässriger Lösung einen hochselektiven Fluoreszenzsensor für Sulfat darstellt. Dabei kommt es in Anwesenheit von Sulfat zu einer Löschung der Fluoreszenz von **52**, auch in Anwesenheit von 100 Äquivalenten Chlorid, während kein anderes der insgesamt acht untersuchten Anionen einen ähnlichen Effekt induziert. Die Bindungseigenschaften von **52** wurden mit Hilfe von ITC-Messungen auch quantitativ charakterisiert. Interessanterweise ist die Anionenaffinität von **52** im Vergleich zu der von **22** signifikant kleiner. Durch theoretische Betrachtungen wurde dies auf elektronische Effekte der Substituenten im Linker zurückgeführt, die eine deutlich andere Vorzugskonformation des Rezeptors in Lösung induzieren als die Nitrogruppen in **22**. Diese Betrachtungen lieferten auch eine Erklärung für die Löschung der Fluoreszenz von **52** bei Komplexbildung von Sulfat.

In der vorliegenden Arbeit war es mir also möglich, grundlegende Beiträge zum Verständnis der Thermodynamik der Komplexbildung von verbrückten Bis(cyclopeptide) zu erarbeiten. Weiterhin habe ich mit Hilfe der dynamischen kombinatorischen Chemie erstmals einen Zugang zu zweifach verbrückten Bis(cyclopeptiden) eröffnet. Im Zuge dieser Untersuchungen konnten erste viel versprechende Anionenrezeptoren identifiziert werden. Auf diesen Arbeiten können nun weitere Projekte aufbauen, die sich mit der Charakterisierung der Bindungseigenschaften dieser Rezeptoren bzw. mit der Entwicklung dreifach verbrückter Bis(cyclopeptide) beschäftigen. Im letzten Teil meiner Arbeit habe ich erfolgreich den ersten Fluoreszenzsensor basierend auf den in der Gruppe Kubik verwendeten Cyclopeptiden entwickelt. Dieser Sensor ist in wässrigen Lösungsmitteln hochselektiv für Sulfat. Damit eröffnen sich erste praktische Anwendungen für die Bis(cyclopeptide).

4 Experimenteller Teil

4.1 Apparatives

^1H -NMR	Bruker Avance 600 (600 MHz)
	Bruker Avance DRX 500 (500 MHz)
	Bruker DPX 400 (400 MHz)
	Bruker DPX 200 (200 MHz)
	Bruker Avance DRX 200 (200 MHz)
^{13}C -NMR	Bruker Avance DRX 500 (125 MHz)
	Bruker Avance 600 (151 MHz)
	Bruker DPX 400 (101 MHz)
Massenspektrometrie	Finnigan MAT 8200 (FAB)
	Varian MAT 311a (EI)
	Bruker Daltonics 3000 Esquire (ESI)
	Bruker APEX III FTICR-MS mit Apollo ESI-Quelle (ESI)
	ZQ4000-ESI-Massenspektrometer (Single-quadrupol) (ESI)
	Bruker Ultraflex TOF/TOF (MALDI/TOF)
HPLC	Dionex: P680 HPLC Pumpe, ASI-100 Autosampler, TCC-100 Säulenofen, UVD 170U UV/Vis Detektor, Chromeleon V6.70 Software
	Agilent 1100 Serie: Microvacuum Degasser G1379A, High Pressure Binary Pumpe G1312A XY, Autosampler G1313A, Säulenofen G1316A, DAD (Dioden Array) Detector G1315B mit einer Semimicro-Durchflussszelle (6 mm, 5 μL , 120 bar) Wellenlängenbereich 191 - 949 nm.
HPLC/ESI-MS	HPLC: Agilent 1100 Serie: Microvacuum Degasser G1379A, High Pressure Binary Pumpe G1312A XY, Autosampler G1313A, Säulenofen G1316A, DAD (Dioden Array) Detector

	<p>G1315B mit einer Semimicro-Durchflusszelle (6 mm, 5 μL, 120 bar) Wellenlängenbereich 191 - 949 nm.</p> <p>LC/MSD Trap XCT G2446A mit einer ESI-Quelle, Ultrascan: Bereich (m/z) 50 - 2200, Geschwindigkeit 26000 m/z\cdotsec⁻¹, Standard Enhanced Bereich (m/z) 50-2200, Geschwindigkeit 8100 m/z\cdotsec⁻¹</p>
Präparative HPLC	Merck Hitachi L-6200A Intelligent Pump, L-4000A UV-Detektor
HPLC-Säulen	Zorbax Eclipse XDB-C8, 4,6 x 150 mm, 5 μ m Acclaim® 120 C18, 4.6x150 mm, 5 μ m, 120 Å
Präparative Säulenchromatographie	<p>Kieselgelsäulen:</p> <p>Kieselgel 63-200 (60 Å) von MP SiliTech Kieselgel 60 (230-400 Mesh ASTM) von Merck</p> <p>RP-Säulen:</p> <p>Lobar® Fertigsäule von Merck, Größe B (310-25) Lichroprep® RP-8 (40-63 μm)</p> <p>HPLC-Säulen:</p> <p>LiChroCART® 250-10, Purospher®STAR RP-18 endcapped (5 μm)</p>
Dünnschichtchromatographie	<p>Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminiumträger (Merck) RP-8 F₂₅₄ auf Glasträger (Merck) RP-18 F₂₅₄ auf Glasträger (Merck)</p>
IR	<p>Bruker Vektor 22 FT-IR Perkin Elmer FT-IR Spectrometer, Spectrum 1000</p>

Experimenteller Teil

C,H,N-Analyse	Institut für Pharmazeutische Chemie Heinrich Heine Universität Düsseldorf Analytik-Abteilung des Fachbereichs Organische Chemie Technische Universität Kaiserslautern (Perkin-Elmer 2400 CHN Elemental Analyzer)
Schmelzpunktbestimmung	Büchi B-545 Wagner und Münz, Kupferblock Müller SPM-X300
Fluoreszenzspektrometer	JASCO FP-6200 Spektrofluorometer
Potentionmeter	Metrohm 691 pH Meter
Mikrokalorimeter	MicroCal VP-ITC

4.2 Chemikalien

Acros	Natriumcyanoborhydrid Kaliumpermanganat p.a. <i>p</i> -Toluolsulfonylchlorid Tetrakis[triphenylphosphin]palladium(0) Phosphorpentoxid Natriumazid 99 % Phosphoroxychlorid
Aldrich	1,2-Phenylendiessigsäure 99 % 1,3-Phenylendiessigsäure 97 % Diphensäure 97 % 4-Dimethylaminopyridin Thiobenzoensäure techn. 90 % Natriumbromid p.a. Diisopropylethylamin Tetrabutylammoniumiodid 98 % Kaliumhexafluorophosphat, 98 %
BASF	1,4-Dioxan z.S. Methanol
Berkel	Ethanol p.a.
Brenntag	Aceton Essigsäureethylester z. S. Methylenchlorid z. S. Toluol z.S.
Degussa-Hüls	Diethylether z. S.
Euriso-top	Chloroform- <i>d</i> ₁

	Methanol- d_4
	Dimethylsulfoxid- d_6
	Deuteriumoxid
Fluka	2-Amino-6-picolin
	Celite® Filter Cel
	<i>trans</i> -4-Hydroxy-L-prolinmethylester-hydrochlorid
	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
	Chlorameisensäurebenzylester
	Kaliumhydrogensulfat
	2,5-Dihydroxybenzoesäure
	Palladium auf Aktivkohle 10 %
	Pyrrolidin p.a.
	TBTU
T.J. Baker	Hexan z. S.
	Salzsäure konz (37 %) p.a.
	NaOH Plätzchen
	KOH Plätzchen
	Pentan z. S.
	Tetrahydrofuran z. S.
Merck:	3-Brom-1-propen z.S.
	Chloroform- d_1
	Cäsiumcarbonat
	<i>N,N</i> -Dimethylformamid z.S.
	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
	Kaliumhydrogensulfat
	Kaliumiodid z.S.
	Kaliumhydrogensulfat p.a.
	Kaliumpermanganat
	Natriumiodid reinst.
	Natriumbromid

	Natriumcarbonat, wasserfrei
	Natriumhydrogencarbonat, reinst
	Natriumnitrat
	Natriumsulfat wasserfrei p.a.
	Natriumchlorid p.a.
	Salzsäure, Titrisol 1N
	Tetramethylsilan
	Triethylamin
MP SiliTech	Kieselgel 63 – 200 (60 Å)
Nova-Biochem	Prolin
	TBTU
	WSC·HCl (EDC)
	H-Hyp-OH
	Boc-Pro-OH
Riedel-de-Haën	Morpholin
	Pyridin
VWR	Acetonitril, HPLC-Grade
	Chloroform z. S.
	Methanol, HPLC-Grade
	Wasser, HPLC-Grade

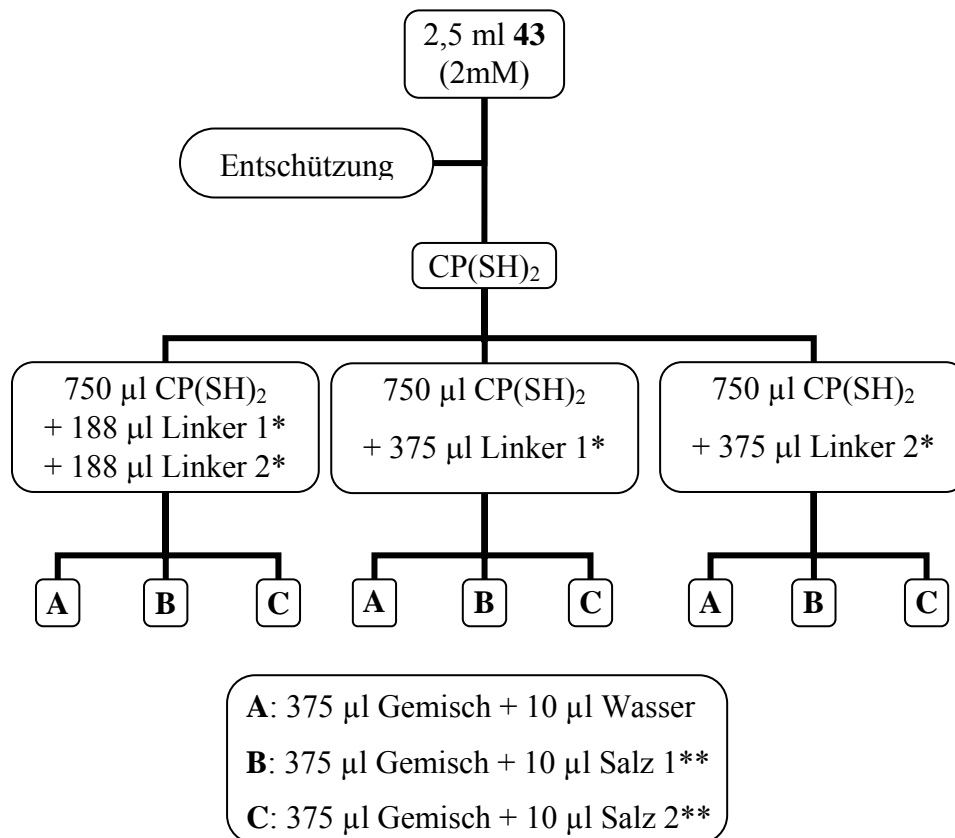
4.3 DCLs

4.3.1 Erzeugung von dynamischen Bibliotheken mit *in situ* Entschützung von Cyclopeptid **43**

Im Folgenden soll die prinzipielle Vorhergehensweise für die Herstellung von dynamischen Bibliotheken beschrieben werden. Zunächst wurden 2,5 ml einer 2 mM Lösung des geschützten Dithiols **43** in 1:1 (v/v) Acetonitril/Wasser bei pH 13 hergestellt. Der pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxid eingestellt. Danach wurde diese Lösung für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, um eine vollständige Entschützung von **43** zu gewährleisten. Anschließend wurde (ca. 30 % des Gesamtvolumen) Ionentauscher (DOWEX 8x50 H⁺-Form) hinzugegeben und die Lösung weitere 30 Minuten ohne Rühren stehen gelassen. Die Lösung wurde mit Hilfe einer Spritze abgesaugt und in drei gleiche Teile zu je 750 µl aufgeteilt. Eine dieser Lösungen wurde nun mit 375 µl einer 4 mM Lösung eines Dithiollinkers in Acetonitril versetzt, die zweite mit 375 µl einer 4 mM Lösung eines anderen Linkers und die dritte mit je 188 µl der beiden Linkerlösungen. Durch die Zugabe der Linker wurde das Lösungsmittelgemisch von 1:1 (v/v) Acetonitril/Wasser auf 2:1 (v/v) Acetonitril/Wasser verändert. Die Komponenten-Konzentrationen nach den Zugaben sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Jede dieser drei Lösungen wurde jeweils in drei Portionen zu je 375 µl aufgeteilt und in HPLC Vials mit einem Volumen von 1,5 ml überführt. Eine Vial jedes Triplets wurde mit 10 µl Wasser, eine mit 10 µl einer 375 mM Kaliumsulfatlösung in Wasser und die dritte mit 10 µl einer 375 mM Kaliumiodid in Wasser versetzt. Die Gastkonzentration sollte nach der Zugabe 10 mM betragen. Als Resultat ergab sich ein Array von neun Bibliotheken. Die Vorgehensweise ist graphisch in Schema 15 dargestellt. Das Volumen jeder Bibliothek sollte mindestens 350 µl betragen, um einen ausreichend hohen Füllstand des HPLC Gefäßes für die Probenentnahme zu gewährleisten. Dies resultiert aus der gerätespezifischen Eintauchtiefe der Nadel des HPLC Autosamplers in das Probengefäß.

Bei Verwendung der carbonsäure- und sulfonsäurehaltigen Linker wurden diese in Wasser mit einem pH von 7,5 – 8,5 anstatt in Acetonitril gelöst. In diesen Fällen wurde die Entschützung von **43** in einem 3:1 (v/v) Acetonitril/Wasser-Gemisch durchgeführt und die entsprechenden Mengen Acetonitril zusammengegeben, um die oben beschriebenen Konzentrationen zu erhalten. Die Äquilibrationszeiten der Bibliotheken lagen zwischen zwei und sieben Tagen.



* 4 mM; ** 375 mM

Schema 15 Vorgehensweise zur Erzeugung eines Arrays von dynamischen Bibliotheken.

Tabelle 10 Konzentrationen der Komponenten einer Bibliothek. Das Lösungsmittel war 2:1 (v/v) Acetonitril/Wasser.

Komponente	Konzentration
44 (entschützt)	1,33 mM*
Linker	a) 1,33 mM* bei einem Linker b) 0,67 mM* bei zwei Linkern
Gast	10 mM*

* Die durch Gastzugabe verursachte Volumenänderung wurde vernachlässigt.

4.3.2 Erzeugung von dynamischen Bibliotheken unter Verwendung des Cyclopeptid-derivats **44**

Zunächst wurde eine Lösung des Bis(cyclopeptids) **44** mit einer Konzentration von 1,25 mM in 2:1 (v/v) Acetonitril/Wasser pH = 9 hergestellt. Dazu wurde soviel der Lösung der Linker mit einer Konzentration von typischerweise 8 bis 10 mM im entsprechenden Lösungsmittel (entweder Acetonitril oder Wasser pH = 9) sowie entsprechende Mengen an purem Acetonitril oder Wasser pH = 9 hinzugefügt, dass das Lösungsmittelgemisch weiterhin das gewünschte 2:1 (v/v) Verhältnis besaß und die Konzentrationen des dimeren Dithiols **44** 0,66 mM und des Linkers 1,32 mM betragen. Diese Lösung wurde anschließend in 350 µl große Teile aufgeteilt und 10 µl Gastlösungen (360 mM) bzw. Wasser pH = 9 hinzugefügt. Daraus ergibt sich analog zu 4.3.1 eine Konzentration des Gasts in der Bibliothek von 10 mM.

4.4 Messungen

4.4.1 Isotherme Titrations Kalorimetrie

Alle Untersuchungen wurden in einem Lösungsmittelgemisch 1:1 (v/v) Wasser/Methanol (HPLC-Grade) bei 298 K durchgeführt. Zunächst wurde der Rezeptor in Methanol (HPLC-Grade) und der Gast in Wasser HPLC-Grade gelöst und anschließend diese Stammlösung jeweils mit Wasser oder Methanol aufgefüllt, so dass 1:1 (v/v) Wasser/Methanol-Mischungen entstanden. Die Konzentration der Rezeptorlösung wurde bis auf die in Tabelle 11 markierten Ausnahmen zu 0,25 mM gewählt. Die Salzkonzentrationen können aus derselben Tabelle entnommen werden. Für eine Messung wurde die Messzelle bis zur maximalen Füllhöhe (1,4584 ml) mit der Rezeptorlösung befüllt. Die Gastlösung wurde in Portionen von 10 µl in 25 Injektionen mit einer Zugabegeschwindigkeit von 0,5 µl/sec injiziert. Der Abstand zwischen den Zugaben betrug 180 s. Nur bei Rezeptor **3** wurden 15 Injektionen à 8 µl mit 1µl/sec Zugabegeschwindigkeit und 360 s Abstand zwischen den einzelnen Injektionen verwendet. Im Falle von Rezeptor **3** und Natriumchlorid als Gast betrug die Rezeptorkonzentration 0,5 mM. Neben den in Tabelle 11 angegebenen Salzen wurden für Rezeptor **20** zusätzlich Natriumfluorid (40 mM), Natriumnitrat (15 mM), Natriumperchlorat (40 mM) und Natriumperrhenat (15 mM) als Gäste untersucht. Von den beobachteten Wärmetönungen bei den Messungen mit Rezeptor wurden die Verdünnungswärmen, die bei der Titration der Gastlösung in das reine Lösungsmittel auftraten, abgezogen.

Zur Auswertung wurden die aus den Integralen der Peakflächen erhaltenen Enthalpiewerte gegen den Molenbruch aufgetragen. Durch Regression der erhaltenen Kurve mit einer geeigneten Fit-Funktion (siehe Kapitel 2.2.1.3.1) wurden die thermodynamischen Daten ermittelt. Als Auswertsoftware diente eine von der Firma MicroCal angepasste Version von Origin 7.0. Bei Bindungskonstanten $< 500 \text{ M}^{-1}$ wurde der Faktor während der Regression nicht angepasst, sondern auf 1 festgelegt. Jede Messung wurde mindestens dreimal wiederholt. Als Ergebnisse wurden die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen berechnet.

Tabelle 11 Salzkonzentrationen in den ITC-Untersuchungen mit den verschiedenen Rezeptoren.

	Sulfat [mM]	Iodid [mM]	Bromid [mM]	Chlorid [mM]
3*	14	14	14	40**
20	2.5	2.5	5	15
22	2.5	5	15	40
52	5	40	-	-

* 0.45 mM Rezeptor

**0.5 mM Rezeptor

4.4.2 HPLC- und LC/MS-Messungen

Die HPLC Messungen der DCLs wurden mit Geräten der Firma Agilent Model 1100 durchgeführt. Als Säule kam eine Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150 mm, 5 µm) zum Einsatz. Die Chromatogramme wurden bei 290 nm mittels eines UV-Detektors aufgenommen. Die Trennung auf der Säule erfolgte mit einem Wasser/Acetonitril Gemisch in Anwesenheit von 0,1 Vol% Trifluoressigsäure. Dabei wurden die relativen Anteile der Lösungsmittel über die Zeit variiert. Das entsprechende Gradientenprogramm ist in Tabelle 12 dargestellt. Die Säule wurde während der Messung auf eine Temperatur von 40 °C temperiert und die Flussrate des Eluens betrug 1ml/min.

Tabelle 12 Gradientenprogramm für die HPLC Analyse der DCLs.

Zeit/ min	Wasser (0,1 Vol % TFA)/ Vol %	Acetonitril (0,1 Vol % TFA)/ Vol %
0	75	25
20	50	50
25	40	60
35	10	90
40	3	97
48	3	97
50	75	25
60	75	25

Im Falle der LC/MS-Messungen wurden dieselbe Säule und dasselbe Gradientenprogramm verwendet. Allerdings erfolgte die Detektion zusätzlich zur UV-Detektion mittels eines ESI-Massenspektrometers der Firma Agilent. Die Verwendung von Trifluoressigsäure im Eluens kann zu nachhaltigen Problemen bei der MS-Detektion führen, weswegen nach den Messungen das Gerät äußerst sorgfältig gereinigt werden muss und die verwendeten Schläuche ausgetauscht wurden.

4.4.3 Darstellung und Charakterisierung der Membrane für ISEs

Alle zur Herstellung der Membrane verwendeten Chemikalien wurden von Fluka bezogen und waren von Selectophor-Güte, d.h. speziell für solche Anwendung ausgewiesene Chemikalien. Die eingesetzten Membranen wurden mit den folgenden Mengen der Einzelkomponenten hergestellt:

- 33 mg PVC-Granulat
- 1 bzw. 3 mg Rezeptor
- 0,09 mg Tetraoctylammoniumbromid als Leitsalz
- 63,5 µl 2-Nitrophenyloctylether als Weichmacher
- 700 µl THF

Ausnahmen bildeten nur die Membranen, in denen der Ionophor fehlte. Bei der Herstellung wurde das PVC-Granulat, das Leitsalz und der Ionophor in der angegebenen Menge THF gelöst. Dazu wurde die anfängliche Suspension in einem Ultraschallbad so lange behandelt, bis eine klare Lösung entstand. Zu dieser Lösung wurde der Weichmacher hinzugegeben und die Lösung in einen auf einer Glasplatte befestigten Glasring (Durchmesser 2 cm) gegossen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels über Nacht wurde der entstandene Film vorsichtig aus dem Glasring gelöst und mittels eines geeigneten Werkzeugs fünf Membrane mit einem Durchmesser von 6 mm aus dieser Membran ausgestochen. Jede dieser Membrane wurden in einem Philips Elektrodenbody IS 561 (Glasbläserei Möller, CH-8050, Schweiz) eingebaut. Als Innenelektrolyt kam eine 1M Kaliumchlorid-Lösung zum Einsatz.

Anschließend wurde das Ansprechverhalten der so hergestellten Elektroden auf verschiedene Anionen charakterisiert. Dazu wurden drei Stammlösungen mit Konzentrationen von 15 mM, 100mM und 1 M der Salze in bidestilliertem Wasser hergestellt. Die Messungen wurden in einem Faraday'schen Käfig durchgeführt, um eventuell vorhandene Störströme auszuschließen. Als Referenzelektrode wurde eine Hg/Hg₂SO₄ Elektrode mit einem Potential von 650 mV verwendet.

In ein geeignetes Glasgefäß wurden 40 ml bidestilliertes Wasser gegeben und das Ausgangspotential bestimmt. Anschließend wurde zu dieser Lösung entsprechende Mengen der Salzlösungen hinzugefügt, um die Potentiale der Elektrode bei log(c)-Werten von -6, -5, -4, -3, -2 und -1 zu bestimmen. Die durch die Zugabe der Stammlösung entstandene Volumenänderung wurde bei der Berechnung der log(c)-Werte berücksichtigt. Das Potential für die verschiedenen Konzentrationen wurde nach einer Equilibrierungszeit von 5 Minuten abgelesen.

4.4.4 Fluoreszenzmessungen

Für die qualitativen Messungen wurde eine 0,1 mM Stammlösung des Rezeptors **52** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol angesetzt. 500 µl dieser Stammlösung wurden mit 50 µl (1 Äquivalent) oder 500 µl (10 Äquivalente) einer 1 mM Salzlösung versetzt. Anschließend wurde mit 1:1 (v/v) Wasser/Methanol auf 4 ml aufgefüllt. In dieser Lösung beträgt die Rezeptorkonzentration 12,5 µM. Das Fluoreszenzspektrum wurde im Bereich von 350 – 600 nm aufgenommen, wobei als Anregungswellenlänge 300 nm verwendet wurde. Die Sensitivität des Detektors wurde auf high gesetzt. Die Bandbreite betrug 5 nm bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 250 nm/min.

Im Falle der quantitativen Untersuchungen wurde ebenfalls eine 0,1 mM Stammlösung von **52** in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol angesetzt und 500 µl dieser Lösung in eine Messküvette überführt. Zu dieser Lösung wurden 2,5 ml 1:1 (v/v) Wasser/Methanol gegeben und das Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Im Anschluss wurde eine 2 mM Natriumsulfatlösung portionsweise so zugegeben, dass die resultierenden Lösungen 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 und 36 Äquivalente Natriumsulfat enthielten. Von jeder einzelnen Lösung wurde das Fluoreszenzspektrum wie beschrieben aufgenommen. Bei der Bestimmung der Bindungskonstante in Anwesenheit von 100 Äquivalenten Natriumchlorid wurden zu 500 µl der Rezeptorlösung in der Messküvette 2 ml 1:1 (v/v) Wasser/Methanol und 500 µl einer 10 mM Natriumchloridlösung in 1:1 (v/v) Wasser/Methanol hinzugefügt. Die resultierende Lösung wurde analog zur zuvor beschriebenen Vorgehensweise vermessen.

Zur Bestimmung der Bindungskonstante wurden die I/I_0 Werte (I : gemessene Fluoreszenzintensität, I_0 : Fluoreszenzintensität des reinen Rezeptors) der Spektren bei 505 nm bestimmt und die resultierende Titrationskurve mit dem Programm SigmaPlot 2001 Version 7.0 unter Verwendung des mathematischen Modells für 1:1 Komplexe mit einer nicht linearen Regression gefittet.¹⁰⁶ Die während der Titration veränderten Konzentrationen der Rezeptor- und Gastlösungen wurden dabei berücksichtigt. Die Titrationskurven wurden jeweils dreimal wiederholt. Als Ergebnisse wurden die Mittelwerte dieser Messungen mit den entsprechenden Standardabweichungen angegeben.

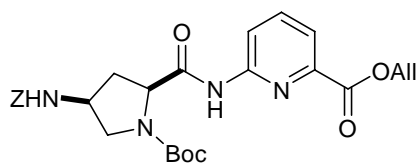
4.5 Synthesen

4.5.1 Allgemeines

Zur Benennung der Sequenzen der hergestellten Peptide wird folgende Systematik verwendet:

- es wird ein Drei-Buchstaben-Code für die verwendeten Aminosäuren benutzt (Pro = Prolin, APA = Aminopicolinsäure),
- am Anfang steht das N-terminale Ende, wobei H- oder R- die freie bzw. geschützte Aminosäure indizieren,
- am Ende steht das C-terminale Ende, wobei -OH oder -OR die freie bzw. die mit der Schutzgruppe R geschützte Aminosäure indizieren,
- als Stereoindikatoren wurden D/L- für Prolin bzw. *cis/trans* für die relative Konfiguration der Substituenten am Prolin in 4-Position verwendet (nach CIP entspricht in diesen Fällen *cis* einer *4S* und *trans* einer *4R* Konfiguration),
- das Kürzel für substituierte Prolinderivate wurden innerhalb von runden Klammern zusammengefasst,
- die Substitutionsposition in den Prolinderivaten wurde gemäß IUPAC-Konventionen vorgenommen und war immer Position 4.

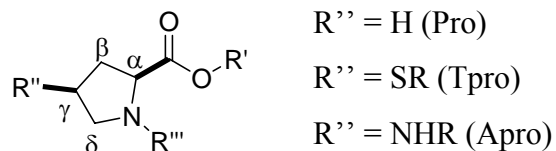
Bsp.:



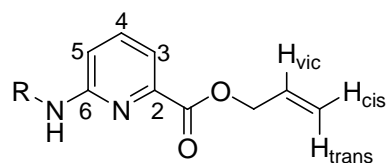
Boc-(*cis*-4-(*Z*)Amino-L-Pro)-APA-OAll

Die in den NMR Interpretationen verwendeten Abkürzungen für die Protonen können aus den folgenden Abbildungen für die entsprechenden Teilstrukturen entnommen werden.

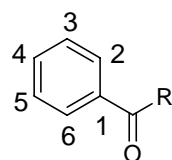
Prolinderivate



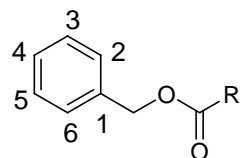
Aminopicolinsäure (APA) und Allylgruppe (All)



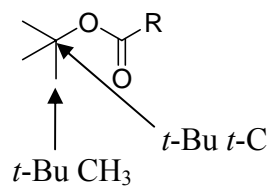
Benzoatgruppe (Bz)



Benzyloxycarbonylgruppe (Z)



tert-Butoxycarbonylgruppe (Boc)



Trockene Lösungsmittel wurden nach Standardmethoden hergestellt. Die zur Entschützung notwendige 6N HCl in 1,4-Dioxan Lösung wurde durch Einleiten von Chlorwasserstoff in trockenes 1,4-Dioxan unter Eiskühlung hergestellt. Es wurde so lange Gas eingeleitet bis die Lösung eine Konzentration von mindestens 6N hatte. Dies wurde durch eine Titration überprüft.

Das verwendete Kupplungsreagenz PyCloP wurde analog zu den Vorschriften von T. Yvernault, G. Yvernault und J.C. Bollinger bzw. Coste, Frérot und Jovin über zwei Stufen dargestellt.^{110,111}

Das Kupplungsreagenz TBTU wurde käuflich erworben. In einigen Fällen wurde auch HBTU eingesetzt, was auf die Durchführung der Reaktion allerdings keinen Einfluss hatte.

Für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix verwendet. Die Spektren wurden bei einer Spannung von 25 kV im positiven Modus bzw. bei 20 kV im negativen Modus aufgenommen.

4.5.2 Allgemeine Arbeitsweisen

Abspalten der Benzylschutzgruppe. Eine Lösung des benzylgeschützten Peptid in 9:1 (v/v) 1,4-Dioxan/Wasser (20 ml pro 1 mmol Edukt) wurde mit 100 mg 10 % Pd/C versetzt und unter einer Wasserstoffatmosphäre etwa 18 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC Kontrolle) wurde der Katalysator über Celite abfiltriert, mit 1,4-Dioxan gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Methylenchlorid aufgenommen und das Lösungsmittel wieder im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Produkt wurde abschließend an der Ölpumpe getrocknet.

Abspalten der Boc-Schutzgruppe. Zu einer Lösung des Boc-geschützten Peptid in 1,4-Dioxan (5 ml pro 1 mmol Edukt) wurde unter Eiskühlung tropfenweise 30 ml 6 N HCl in 1,4-Dioxan hinzugefügt. Es wurde noch zwei Stunden - bei Hexapeptiden vier Stunden - in der Kälte gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei einer Wasserbadtemperatur $\leq 40^{\circ}\text{C}$ im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde über P_4O_{10} getrocknet.

Entschützen des Allylesters. Ein Schlenkkolben mit dem zu entschützenden Peptid wurde dreimal sekuriert. Dabei wurde der Kolben nicht ausgeheizt, da die Boc-Gruppe thermolabil ist. Im Stickstoffgegenstrom wurden nacheinander 20 ml entgastes THF p.a., eine Spatelspitze Tetrakis[triphenylphosphin]palladium(0) und 2 Äquivalente Morpholin hinzugefügt. Der Umsatz wurde mittels DC nach 5 Min. überprüft. Bei nicht vollständigem Umsatz wurde erneut Katalysator hinzugefügt. Das THF wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat - im Falle der Hexapeptide mit Methylenchlorid - aufgenommen. Die organische Phase wurde anschließend dreimal mit 3 %iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Lösungsmittel wurde abschließend im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt.

4.5.3 Allgemeine Synthesen

Darstellung von *N*-Acetyl-2-amino-6-picolin.¹¹² 27 g (0,25 mol) 2-Amino-6-picolin wurden in 125 ml Chloroform gelöst. Es wurden 35 ml (0,375 mol) Acetanhydrid zugegeben und eine halbe Stunde unter Reflux gerührt. Nach Abkühlen wurde die Lösung vorsichtig zweimal mit 10 %iger Na₂CO₃-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet und das Lösungsmittel vollständig im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Petrolether (60/80)/Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute: 30,9 g (82,3 % d.Th)

Darstellung von *N*-Acetyl-2-amino-6-picolinsäure.¹¹³ 20 g (0,13 mol) *N*-Acetyl-2-amino-6-picolin wurden in 200 ml Wasser suspendiert und die Suspension auf 75 °C erhitzt, wobei das Edukt in Lösung ging. Portionsweise wurde nun 50 g (0,31 mol) Kaliumpermanganat zugegeben, wobei die Temperatur 80 °C nicht überschreiten soll. Danach wurde noch drei Stunden lang bei 75 °C gerührt und anschließend die heiße Lösung über Celite abfiltriert. Das Filtrat wurde in einem Eisbad abgekühlt und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH von 4-5 gebracht, wobei das Produkt ausfiel. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig Eiswasser gewaschen und ohne weiteres Trocknen direkt weiter umgesetzt.

Darstellung von 6-Aminopicolinsäure.¹¹⁴ 20 g (0,11 mol) *N*-Acetyl-2-amino-6-picolinsäure wurden in 200 ml 10 %iger NaOH vier Stunden zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung unter Eiskühlung mit konz. Salzsäure auf einen pH von 4-5 angesäuert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und einmal mit wenig Eiswasser, zweimal mit Aceton und einmal mit Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 9,50 g (62 % d.Th.)

Darstellung von 6-Aminopicolinsäurebenzylester.²⁸ 6,9 g (5 mmol) 6-Aminopicolinsäure und 5,9 g (70 mmol) Natriumhydrogencarbonat wurden in 300 ml DMF suspendiert. Nach Zugabe von 8,3 ml (70 mmol) Benzylbromid wurde sieben Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das nicht gelöste Edukt wurde abfiltriert, mit Wasser, Aceton und Diethylether gewaschen und konnte nach dem Trocknen für weitere Umsätze wieder eingesetzt werden. Das Filtrat wurde im Ölpumpenvakuum auf etwa 100 ml eingengt. Es wurde mit 200 ml 10 %iger Na₂CO₃-Lösung verdünnt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit Hexan angerieben und das Rohprodukt abfiltriert. Es wurde aus Hexan/Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute: 3,70 g (32,5 % d.Th.)

Darstellung des Dipeptid Boc-L-Pro-APA-OBn.²⁸ 1,71 g (7,5 mmol) 6-Aminopicolinsäurebenzylester, 2,42 g (11,3 mmol) Boc-L-Prolin und 4,74 g (11,3 mmol) PyCloP wurden in 85 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 3,9 ml (22,6 mmol) Diisopropylethylamin zugetropft und die Reaktionsmischung wurde anschließend sieben Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel vollständig im Vakuum entfernt und das Produkt aus dem Rückstand mittels Flash-Chromatographie mit 1:1 (v/v) Ethylacetat/Hexan als Eluens isoliert.

Ausbeute: 3,07 g (96 % d.Th.)

Darstellung des Tetrapeptids Boc-(L-Pro-APA)₂-OBn.²⁸

1. Benzyl-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemeine Arbeitsweisen. Es wurden 1,55 g (3,66 mmol) Boc-L-Pro-APA-OBn eingesetzt.

Ausbeute: 1,28 g (100 % d.Th.)

2. Boc-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemeine Arbeitsweisen. Es wurden 1,55 g (3,66 mmol) Boc-L-Pro-APA-OBn eingesetzt.

Ausbeute: 1,37 g (94 % d.Th.)

3. Kupplungsreaktion

1,28 g (3,82 mmol) Boc-L-Pro-APA-OH, 1,37 g (3,44 mmol) H-L-Pro-APA-OBn · 2 HCl und 1,93 g (4,50 mmol) PyCloP wurden in 68 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 2,63 ml (15,1 mmol) Diisopropylethylamin zugetropft und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt mittels Flash-Chromatographie mit Ethylacetat als Eluens isoliert. Das Produkt wurde mit Hexan angerieben, filtriert und getrocknet.

Ausbeute: 2,07 g (94 % d.Th.)

4.5.3.1 Darstellung von *cyclo*-{(cis- 4-Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂}-hydrochlorid

Darstellung von 6-Aminopicolinsäureallylesters (7).¹¹⁵ 6,9 g (50 mmol) 6-Aminopicolinsäure und 8,4 g (100 mmol) Natriumhydrogencarbonat wurden in 125 ml DMF suspendiert. Zu der Suspension wurden 13,1 ml (150 mmol) 3-Brompropen zugetropft und die Reaktionsmischung anschließend sieben Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde einmal mit 10 %iger Natriumcarbonatlösung und dreimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einer Kieselgelsäule unter Verwendung von 1:1 (v/v) Ethylacetat/Hexan als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 5,52 g (62 % d.Th.)

Darstellung von Boc-(trans-4-Hydroxy-L-prolin)-methylester (8).¹¹⁶ 5,02 g (27,6 mmol) (trans-4-Hydroxy-L-prolin)-methylesterhydrochlorid wurden in 90 ml 2:1 (v/v) 1,4-Dioxan/Wasser suspendiert und es wurden unter Eisbadkühlung 6,64 g (30,4 mmol) Di-tert-butyl-dicarbonat und 5,78 ml (41,5 mmol) Triethylamin zugegeben. Anschließend wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach das 1,4-Dioxan im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat versetzt. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend zweimal Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 0,5N Salzsäure, Wasser, 5 %iger Natriumcarbonatlösung, Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 6,53 g (96 % d.Th.)

Synthese von Boc-(*trans*-4-Tosyloxy-L-prolin)-methylester (9).¹¹⁶ 6,53 g (26,6 mmol) Boc-(*trans*-4-Hydroxy-L-prolin)-methylester wurden in 50 ml einer Mischung aus Pyridin und trockenem Methylenchlorid im Verhältnis 1:1 gelöst. 25,4 g (133 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid wurden zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit 10 %iger Natriumcarbonatlösung und dreimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit 2:1 (v/v) Pentan/Ethylacetat als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 9,96 g (94 % d.Th.)

Darstellung von Boc-(*cis*-4-Azido-L-prolin)-methylester (10).¹¹⁶ 9,96 g (25 mmol) Boc-(*trans*-4-Tosyloxy-L-prolin)-methylester wurden in 300 ml DMF gelöst. Es wurden 3,24 g (50 mmol) Natriumazid zugegeben und drei Stunden bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser, 5 %iger Natriumcarbonat-Lösung und schließlich mit gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen und getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 6,23 g (94 % d.Th.)

Darstellung von Boc-(*cis*-4-Amino-L-prolin)-methylester (11).¹¹⁶ 2,15 g (8 mmol) Boc-(*cis*-4-Azido-L-prolin)-methylester wurden in 50 ml Methanol gelöst. Es wurden 8,7 ml 1N Salzsäure und 500 mg Pd/C zugegeben und 18 Stunden bei Normaldruck unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat und Wasser aufgenommen und das organische Lösungsmittel abgetrennt. Die wässrige Lösung wurde nochmals mit Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mit Wasser gewaschen und danach die organische Phase verworfen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden anschließend mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 9

eingestellt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und getrocknet. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,50 g (77 % d. Th.)

Darstellung von Boc-(*cis*-4-(*Z*)Amino-L-prolin)-methylester (12).¹¹⁶ 1,50 g (6 mmol) Boc-(*cis*-4-Amino)-L-prolinmethylester wurden in 120 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung wurde 1,6 ml (9 mmol) Diisopropylethylamin und 1,73 ml (12 mmol) Chlorameisensäurebenzylester zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit 1:1 (v/v) Ethylacetat/Pentan als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 2,23 g (96 % d. Th.)

Darstellung von Boc-*cis*-4-(*Z*)Amino-L-prolin (13).¹¹⁶ Unter Eiskühlung wurden zu 2,23 g (6 mmol) Boc-(*cis*-4-(*Z*)Amino-L-prolin)-methylester in 150 ml Methanol, 14,7 ml (15 mmol) 1N NaOH zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung unter Eiskühlung mit 1N Salzsäure neutralisiert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und dieses erneut im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung im Ölpumpenvakuum getrocknet und für die nächste Stufe direkt eingesetzt.

Darstellung des Dipeptids Boc-(*cis*-4-(*Z*)Amino-L-Pro)-APA-OAll (14). 2,15 g (6 mmol) Boc-*cis*-4-(*Z*)Amino-L-prolin, 1,05 g (6 mmol) 6-Aminopicolinsäure und 2,75 g (6,5 mmol) PyCloP wurden in 100 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Es wurden 2,05 ml (11,8 mmol) DIEA zugegeben und eine Woche bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt durch zweimalige Säulenchromatographie zunächst mit Ethylacetat und dann mit 1:1 (v/v) Ethylacetat/Pentan als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 3,48 g (62 % d.Th.)

Schmelzpunkt	68-75 °C
¹ H-NMR	[600 MHz, DMSO-d ₆ , 80°C] δ 1,37 (s, 9H, <i>t</i> -Butyl), 1,93-2,08 (m, 1H, ProC(β)H), 2,54-2,60 (m, 1H, ProC(β)H), 3,28 (dd, 1H, ² J _H = 10,6 Hz, ³ J _H = 6,5 Hz, ProC(γ)H), 3,74 (dd, 1H, ² J _H = 10,6 Hz, ³ J _H = 6,8 Hz, ProC(δ)H), 4,10-4,13 (m, 1H, ProC(δ)H), 4,53 (dd, 1H, ³ J _H = 8,3 Hz, ³ J _H = 6,5 Hz ProC(α)H), 4,86 (d, 2H, ² J _H = 5,58 Hz, Z-CH ₂), 5,03-5,08 (m, 2H, AllCH ₂), 5,31 (d, 1H, ³ J _H = 10,50 Hz, AllH _{cis}), 5,43 (dd, 1H, ³ J _H = 17,22 Hz, ² J _H = 1,44 Hz, AllH _{trans}), 6,02-6,09 (m, 1H, AllH _{vic}), 6,95 (s, 1H, NH Z), 7,27-7,37 (m, 5H, PhH Z), 7,78 (d, 1H, ³ J _H = 7,44 Hz, APAC(3)H), 7,97 (t, 1H, ³ J _H = 7,92 Hz, APAC(4)H), 8,27 (d, 1H, ³ J _H = 8,34 Hz, APAC(5)H), 10,61 (m, 1H, NH)
¹³ C-NMR	[151 MHz, DMSO-d ₆] δ 28,3 + 28,5 (<i>t</i> -Bu-CH ₃ -C), 35,5 + 36,3 (Apro-C(β)), 49,2 + 49,8 (Apro-C(γ)), 51,4 + 52,0 (Tpro-C(δ)), 58,8 + 59,2 (Apro-C(α)), 65,9 + 66,1 (Z-CH ₂ -C + All-CH ₂ -C), 65,9 (All-CH ₂ -C), 79,4 + 79,6 (<i>t</i> -Bu <i>t</i> -C), 117,8 + 118,0 (All-C _(trans/cis)), 119,1 (APA-C(3)), 121,1 (APA-C(5)), 128,3 (Z-C(2+4+6)), 128,8 (Z-C(3+5)), 132,9 (Ally-C _{vic}), 134,3 (SBz-C(4)), 137,4 (Z-C(1)), 140,1 + 140,3 (APA-C(4)), 146,2 + 146,3 (APA-C(2)), 152,4 (APA-C(6)), 153,2 + 153,8 (<i>t</i> -Bu-CO), 156,2 (Z-CO)), 164,4 (APA-CO), 172,3 + 172,9 (Pro-CO)
Massenspektrum	MALDI/TOF (m/z): [M+H] ⁺ 525,2 (100 %), [M+Na] ⁺ 547,2 (69 %), [M+K] ⁺ 563,2 (15 %)

Darstellung des Hexapeptids Boc-(*cis*-4-(*Z*)Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂-OAll (17)

1. Allyl-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemeine Arbeitsweisen. Es wurden 1,44 g (2,5 mmol) Boc-(L-Pro-APA)₂-OAll eingesetzt.

Ausbeute: nicht bestimmt, 100 % angenommen

2. Boc-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemeine Arbeitsweisen. Es wurden 1,31 g (2,5 mmol) Boc-(*cis*-4-(*Z*)Amino-L-Pro)-APA-OAll.

Ausbeute: 1,24 g (100 % d.Th.)

3. Kupplung

Das Produkt der Allyl-Entschützung von Boc-(L-Pro-APA)₂-OAll (2,5 mmol) und 1,24 g (2,5 mmol) H-(*cis*-4-(*Z*)Amino-L-Pro)-APA-OAll wurden mit 882 mg (2,75 mmol) TBTU in 90 ml DMF p.a. gelöst. 1,83 ml (10,5 mmol) Diisopropylethylamin wurden zugetropft und die Reaktionsmischung zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde sie auf 900 ml Wasser gegossen und die entstehende Suspension mit 1N HCl auf einen pH-Wert von 4 eingestellt. Es wurde noch 10 Minuten gerührt und der Niederschlag danach abfiltriert. Er wurde gründlich mit Wasser gewaschen und zunächst auf der Fritte und anschließend im Exsikator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 1,63 g (70 % d.Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): [M+H]⁺ 958,4 (23 %), [M+Na]⁺ 981,4 (100 %), [M+K]⁺ 997,4 (33 %)

Darstellung des Cyclopeptids *cyclo*-{(cis- 4-(Z)Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂} (19).

1. Allyl-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemeine Arbeitsweisen. Es wurden 959 mg (1 mmol) Boc-(cis-4-(Z)Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂-OAll eingesetzt.

Ausbeute: nicht bestimmt, 100 % angenommen

2. Boc-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemeine Arbeitsweisen. Es wurde 1 mmol Boc-(cis-4-(Z)Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂-OH eingesetzt.

Achtung es wurde vier Stunden lang gerührt, da sich das Edukt bzw. Produkt nicht vollständig während der Reaktion löste!

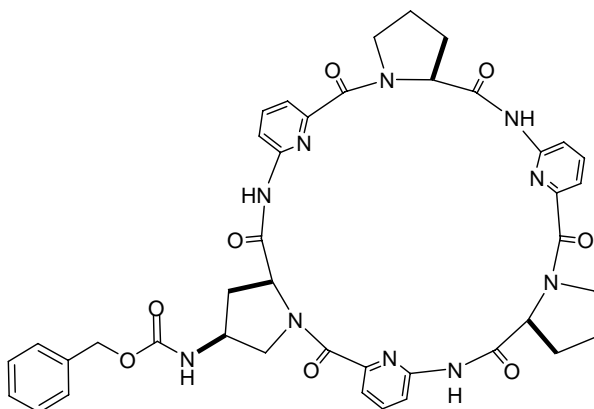
Ausbeute: nicht bestimmt, 100 % angenommen

3. Cyclisierung

1,60 g (5 mmol) TBTU wurden in einem 500 ml Dreihalskolben eingewogen. Der Kolben wurde dreimal sekuriert. Im Stickstoffgegenstrom wurden nun 200 ml entgastes DMF p.a. zugegeben. Nach Zugabe von 0,42 ml (2,40 mmol) Diisopropylethylamin wurde die Reaktionslösung in einem vorgeheizten Ölbad auf 80 °C erwärmt. Nun wurde eine Lösung aus dem Rückstand (1 mmol) der Entschützungen von H-(trans-4-(Z)Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂-OH · 4 HCl und 1,04 ml (6 mmol) Diisopropylethylamin in 40 ml entgasten DMF p.a. mittels eines Perfursors über einen Zeitraum von vier Stunden hinzugegeben. Anschließend wurde der pH der Reaktionsmischung gegebenenfalls durch Zugabe von DIEA auf ca. 9 eingestellt und eine weitere Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und das Produkt chromatographisch aus dem Rückstand isoliert. Zunächst erfolgte eine Vorreinigung über eine Kieselgelsäule mit Aceton als Eluens. Anschließend wurde das so erhaltene Rohprodukt in wenig DMF gelöst und auf eine RP-8 Säule aufgetragen. Die Säule war mit 1,4-Dioxan/Wasser 1:10

vorkonditioniert. Das Elutionsmittel wurde langsam von 1,4-Dioxan/Wasser 1:5 über 1,4-Dioxan/Wasser 1:2 auf 1,4-Dioxan/Wasser 1:1 umgestellt. Bei dieser Lösungsmittelzusammensetzung eluierte das Produkt. Abschließend wurde es in Methanol aufgenommen und mit Diethylether ausgefällt, abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 380 mg (47 % d.Th.)



Schmelzpunkt 184 – 190 °C

$^1\text{H-NMR}$ [600 MHz, DMSO- d_6] δ 1,76-1,88 (m, 4H, ProC(γ)H), 1,88-1,96 (m, 1H, ProC(β)H), 2,00-2,07 (m, 2H, ProC(β)H + AproC(β)H), 2,52-2,60 (m, 2H, ProC(β)H), 2,83-2,92 (AproC(β)H) 3,39-3,41 (m, 1H, AproC(δ)H), 3,53-3,61 (m, 2H, ProC(δ)H), 3,65-3,72 (m, 2H, ProC(δ)H), 3,86-3,93 (m, 1H, AproC(γ)H), 4,98-5,03 (m, 2H, Z-CH₂-H), 5,47-5,54 (s, 2H, ProC(α)H), 5,60-5,62 (s, 1H, ProC(α)H), 7,16 (d, 1H, $^3J_{\text{H}} = 8,10$ Hz, APAC(3)H), 7,21 (d, 2H, $^3J_{\text{H}} = 8,10$ Hz, APAC(3)H), 7,27-7,35 (m, 5H, ZC(2)H + ZC(3)H + ZC(4)H + ZC(5)H + ZC(6)H), 7,39-7,46 (m, 3H, APAC(5)H), 7,52-7,57 (m, 1H, Z-NH), 7,69-7,77 (m, 3H, APAC(4)H), 9,54 + 9,57 + 9,66 (3 x s, 3x 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ [151 MHz, DMSO- d_6] δ 22,8 + 22,9 (Pro-C(γ)), 32,9 + 33,0 (Pro-C(β)), 37,6 (Apro-C(β)), 48,3 (Apro-C(γ)), 48,5 + 48,6 (Pro-C(δ)), 52,5 (Apro-C(δ)), 61,0 (Apro-C(α)), 61,9 (Pro-C(α)), 65,9 (Z-CH₂-C), 15,9 + 116,3 + 116,6 (APA-C(3)), 120,1 + 120,2 (APA-C(5)), 128,2 (Z-C(2)), 128,3 (Z-C(4)), 128,8 (Z-C(3)), 137,4 (Z-C(1)), 139,4 + 139,5 (APA-C(4)), 148,9

+ 149,03 (APA-C(2)), 152,0 + 152,3 + 152,5 (APA-C(6)), 156,2 (Z-CO),
166,3 + 166,5 (APA-CO), 170,9 (Apro-CO), 171,4 + 171,5 (Pro-CO)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): [M+H]⁺ 801,3 (98 %), [M+Na]⁺ 823,3 (100 %),
[M+K]⁺ 839,3 (93 %)

C, H, N ber C: 58,22 % H: 5,36 % N: 16,56 %
gef C: 58,09 % H: 5,32 % N: 16,45 %
F_w(C₄₁H₄₀N₁₀O₈ · 2,5 H₂O): 845,87

IR [KBr, cm⁻¹] 3404(b,w), 3288(b,w), 3034(w), 2971(w), 2867(w), 1707(s),
1663(s), 1575(s), 1522(s), 1463(s), 1398(s), 1299 (m), 1257(w), 1157(w),
1082(w), 990(w), 821(w), 760(m), 698(m), 592(w)

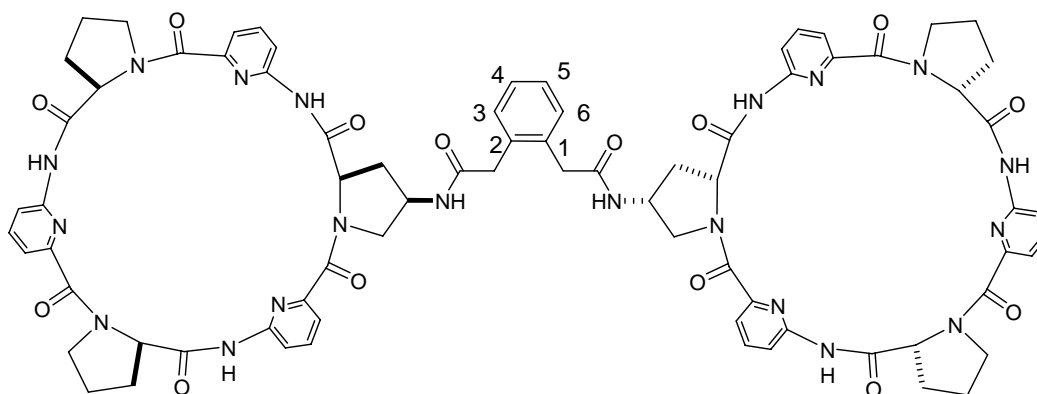
Darstellung von Cyclopeptid *cyclo*-{(4-*cis*-Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂}-hydrochlorid (6). 360 mg (0,45 mmol) *cyclo*-{(4-*cis*-(Z)Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂} wurden in einer Mischung aus 40 ml Methylenchlorid und 40 ml Methanol gelöst. Nach der Zugabe von 120 mg 10 % Pd/C und 494 µl (0,45 mmol) 1N HCl wurde 18 Stunden lang unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde der Palladiumkatalysator über Celite abfiltriert und der Filterkuchen sorgfältig mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum vollständig entfernt. Auf diese Weise wurde das Produkt sauber erhalten und konnte ohne weitere Aufreinigung weiter eingesetzt werden.

Ausbeute 295 mg (94 % d. Th.)

4.5.4 Darstellung der Bis(cyclopeptide)

Darstellung von (CP)₂1,2-PDE (3). 280 mg (0,4 mmol) *cyclo*-{(cis-4-Amino-L-Pro)-APA-(Pro-APA)₂·HCl} und 40 mg (0,2 mmol) 1,2-Phenylendiessigsäure wurden in 30 ml entgasten DMF p.a. gelöst. Zu dieser Lösung wurden 141 mg (0,44 mmol) TBTU und 222 µl (12,8 mmol) DIEA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde chromatographisch mit einer RP-8 Säule gereinigt. Dazu wurde das Elutionsmittel von Wasser/1,4-Dioxan 10:1 langsam über 5:1, 2:1 auf 1:1 umgestellt. Die Fraktionen mit sauberem Produkt wurden zur Trockne eingedunstet und der Rückstand aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Dazu wurde das Rohprodukt in wenig Methanol aufgenommen und in der Siedehitze so lange Wasser hinzugefügt, bis eine Suspension entstand. Nach dem Abkühlen wurde der Niederschlag abgesaugt und gründlich mit Wasser gewaschen.

Ausbeute: 150 mg (50 % d.Th.)

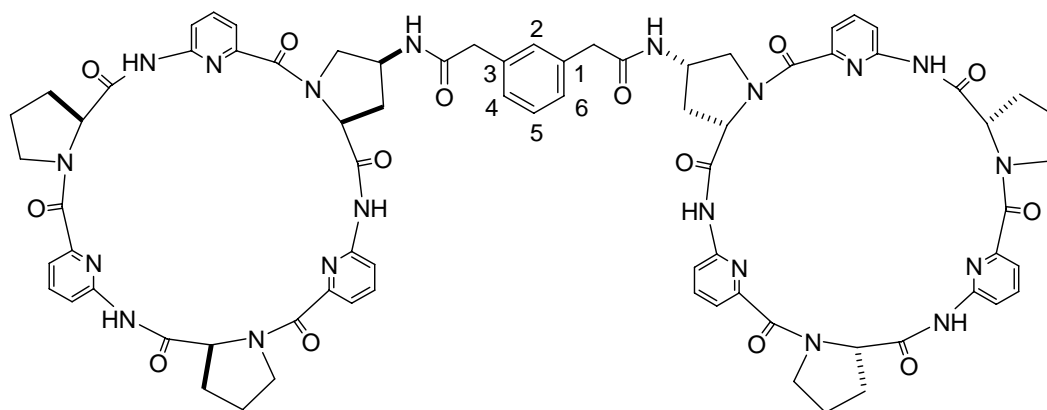


Schmelzpunkt >300 °C

¹ H-NMR	[500 MHz, DMSO-d ₆] δ 1,75-1,91 (m, 8H, ProC(γ)H), 1,95-2,09 (m, 6H, ProC(β)H + AproC(β)H), 2,52-2,61 (m, 4H, ProC(β)H), 2,78-2,85 (m, 2H, AproC(β)H), 3,31-3,32 (m, 4H, CH ₂ -1,2-PDE), 3,44-3,52 (m, 2H, AproC(δ)H), 3,53-3,61 (m, 4H, ProC(δ)H), 3,66-3,74 (m, 4H, ProC(δ)H), 3,82-3,90 (m, 2H, AproC(δ)H), 4,22-4,32 (m, 2H, AproC(γ)H), 5,50-5,60 (m, 6H, ProC(α)H + AproC(α)H), 6,79-6,94 (m, 4H, 1,2-PDEC(3)H + 1,2-PDEC(4)H + 1,2-PDEC(5)H + 1,2-PDEC(6)H), 7,17 (d, 2H, ³ J _H = 8,2 Hz, APAC(3)H), 7,20-7,28 (m, 4H, APAC(3)H), 7,38-7,49 (m, 6H, APAC(5)H), 7,70-7,80 (m, 6H, APAC(4)H), 8,19 (d, 2H, ³ J _H = 6,2 Hz, 1,2-PDENH), 9,52 (s, 4H, APANH), 9,60 (s, 2H, APANH)
¹³ C-NMR	[125 MHz, DMSO-d ₆] δ 22,7 + 22,8 (Pro-C(γ)), 31,1 (Pro-C(β)), 32,8 (CH ₂ -C1,2-PDE), 36,1 + 37,8 (Apro-C(β)), 46,7 (Apro-C(γ)), 48,4 (Pro-C(δ)), 52,3 (Apro-C(δ)), 60,8 (Apro-C(α)), 61,8 (Pro-C(α)), 116,3 (APA-C(3)), 120,0 (APA-C(5)), 126,7 (1,2-PDE-C(4) + 1,2-PDE-C(5)), 130,0 (1,2-PDE-C(3) + 1,2-PDE-C(6)), 135,3 (1,2-PDE-C(1) + 1,2-PDE-C(2)), 139,3 (APA-C(4)), 148,8 (APA-C(2)), 152,2 (APA-C(6)), 166,2 + 166,3 (APA-CO), 170,7 + 170,9 (1,2-PDE-CO), 171,3 + 171,4 (Pro-CO, Apro-CO)
Massenspektrum	MALDI/TOF (m/z) [M+H] ⁺ 1491,5 (82 %), 1513,6 (100 %), 1529,6 (61 %)
C, H, N	ber C: 55,81 % H: 5,55 % N: 17,13 % gef C: 56,05 % H: 5,73 % N: 16,92 % F _w (C ₇₆ H ₇₄ N ₂₀ O ₁₄ · 8 H ₂ O): 1635,6
IR	[KBr, cm ⁻¹] 3422 (b), 3270 (w), 3063(w), 2977(w), 2954(w), 2879(w), 1704(s), 1629(s), 1574(s), 1533(m), 1465(s), 1426(s), 1400(s), 1297(m), 1260(w), 1158(m), 1085 (w), 991 (w), 821(w), 760 (m), 651 (w)

Darstellung von 1,3-(CP)₂PDE (20). 290 mg (0,4 mmol) *cyclo*-{(cis-4-Amino-L-Pro)-APA-(Pro-APA)₂·HCl} und 40 mg (0,2 mmol) 1,2-Phenylendiessigsäure wurden in 30 ml entgastem DMF p.a. gelöst. Zu dieser Lösung wurden 141 mg (0,44 mmol) TBTU und 222 µl (12,8 mmol) DIEA gegeben. Die Reaktionslösung wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde chromatographisch mit einer RP-8 Säule gereinigt. Dazu wurde das Elutionsmittel von Wasser/1,4-Dioxan 10:1 langsam über 5:1, 2:1 auf 1:1 umgestellt. Die Fraktionen mit sauberem Produkt wurden zur Trockne eingengt und der Rückstand aus Methanol/Methanol umkristallisiert. Dazu wurde das Rohprodukt in wenig Methanol aufgenommen und in der Siedehitze so lange Wasser hinzugefügt, bis eine Suspension entstand. Nach dem Abkühlen wurde der Niederschlag abgesaugt und gründlich mit Wasser gewaschen.

Ausbeute: 138 mg (43 % d.Th.)

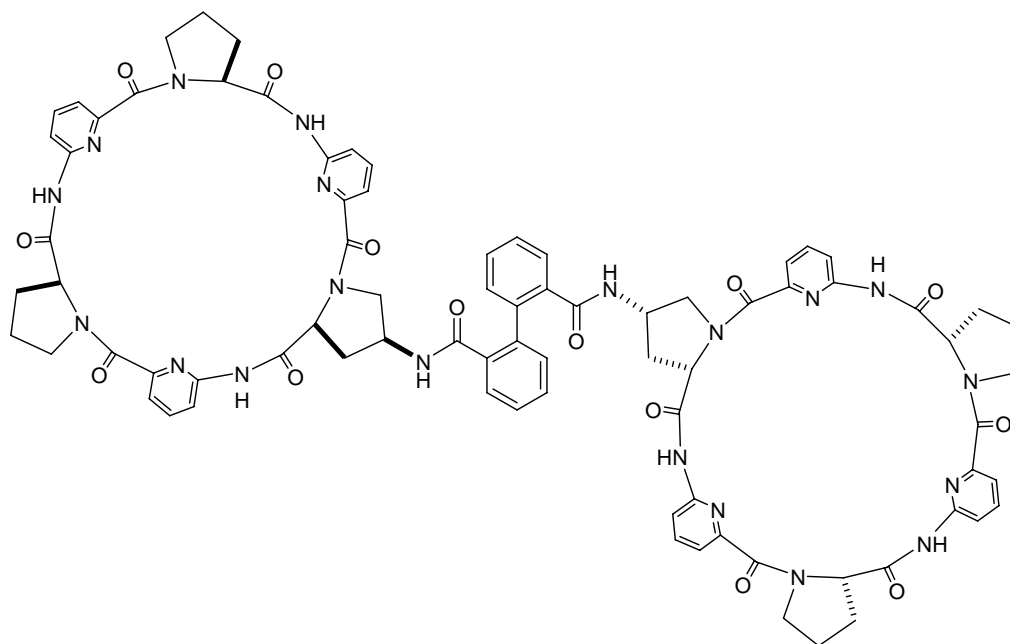


Schmelzpunkt > 300 °C

¹ H-NMR	[600 MHz, DMSO-d ₆] δ 1,75-1,91 (m, 8H, ProC(γ)H), 1,98-2,11 (m, 6H, ProC(β)H + AproC(β)H), 2,53-2,62 (m, 4H, ProC(β)H), 2,81-2,92 (m, 2H, AproC(β)H), 3,27 (s, 4H, CH ₂ -1,3-PDE), 3,44-3,53 (m, 2H, AproC(δ)H), 3,54-3,63 (m, 4H, ProC(δ)H), 3,66-3,76 (m, 4H, ProC(δ)H), 3,83-3,91 (m, 2H, AproC(δ)H), 4,26-4,35 (m, 2H, AproC(γ)H), 5,50-5,67 (m, 6H, ProC(α)H + AproC(α)H), 6,78-6,83 (m, 1H, 1,3-PDEC(5)H), 6,87 (d, 2H, ³ J _H = 7,6 Hz, 1,3-PDEC(4)H + 1,3-PDEC(6)H), 6,98 (s, 1H, 1,3-PDEC(2)H), 7,18 (d, 2H, ³ J _H = 8,2 Hz, APAC(3)H), 7,22-7,27 (m, 4H, APAC(3)H), 7,38-7,49 (m, 6H, APAC(5)H), 7,70-7,80 (m, 6H, APAC(4)H), 8,25 (d, 2H, ³ J _H = 6,2 Hz, 1,3-PDENH), 9,55 (s, 4H, APANH), 9,64 (s, 2H, APANH)
¹³ C-NMR	[151 MHz, DMSO-d ₆] δ 22,8 + 22,9 (Pro-C(γ)), 32,9 + 33,0 (Pro-C(β)), 37,8 (Apro-C(β)), 42,5 (CH ₂ -1,3-PDE), 46,8 (Apro-C(γ)), 48,5 (Pro-C(δ)), 52,4 (Apro-C(δ)), 60,9 (Apro-C(α)), 61,9 + 62,0 (Pro-C(α)), 116,1 + 116,4 + 116,5 (APA-C(3)), 120,2 (APA-C(5)), 127,2 (1,3-PDE-C(4) + 1,3-PDE-C(6)), 128,3 (1,3-PDE-C(5)), 130,4 (1,3-PDE-C(2)), 136,4 (1,3-PDE-C(1) + 1,3-PDE-C(3)), 139,4 + 139,5 + 139,6 (APA-C(4)), 148,9 (APA-C(2)), 152,0 + 152,4 + 152,5 (APA-C(6)), 166,3 + 166,5 (APA-CO), 170,7 (1,3-PDE-CO), 171,0 + 171,4 + 171,5 (Pro-CO, Apro-CO)
Massenspektrum	MALDI/TOF (m/z): [M+H] ⁺ 1491,6 (38 %), [M+Na] ⁺ 1513,6 (100 %), [M+K] ⁺ 1529,6 (1529,6 %)
C, H, N	ber C: 57,39 % H: 5,39 % N: 17,61 % gef C: 57,41 % H: 5,52 % N: 17,32 % F _w (C ₇₆ H ₇₄ N ₂₀ O ₁₄ · 5.5 H ₂ O): 1590,6
IR	[KBr, cm ⁻¹] 34252 (b), 3262 (w), 3051(w), 2977(w), 2954(w), 2879(w), 1707(s), 1629(s), 1574(s), 1465(s), 1426(s), 1398(s), 1297(m), 1260(w), 1156(m), 1083 (w), 991 (w), 821(w), 760 (m), 651 (w)

Darstellung von (CP)₂ Biphen (22). 191 mg (0,27 mmol) *cyclo*-{(cis-4-Amino-L-Pro)-APA-(Pro-APA)₂·HCl} und 34 mg (0,136 mmol) Diphensäure 97 % wurden in 14 ml entgastem DMF p.a. gelöst. Zu dieser Lösung wurden 96 mg (0,3 mmol) TBTU und 152 µl (0,9 mmol) DIEA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde chromatographisch mit einer RP-8 Säule gereinigt. Dazu wurde das Elutionsmittel von Wasser/1,4-Dioxan 10:1 langsam über 5:1, 2:1 auf 1:1 umgestellt. Die Fraktionen mit sauberem Produkt wurden zur Trockne eingengt und der Rückstand aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Dazu wurde das Rohprodukt in wenig Methanol aufgenommen und in der Siedehitze so lange Wasser hinzugefügt, bis eine Suspension entstand. Nach dem Abkühlen wurde der Niederschlag abgesaugt und gründlich mit Wasser gewaschen. Abschließend wurde das Produkt nochmals in Methanol aufgenommen und mit Diethylether ausgefällt.

Ausbeute: 64,5 mg (30 % d. Th.)



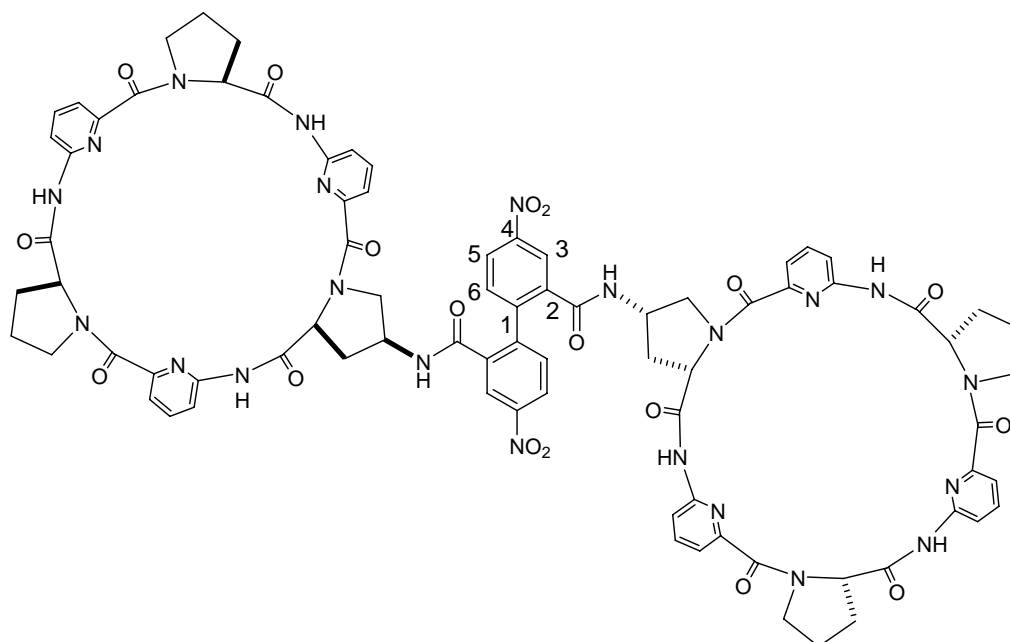
Schmelzpunkt > 290 °C

¹ H-NMR	[600 MHz, DMSO-d ₆] δ 1,75-1,93 (m, 8H, ProC(γ)H), 1,97-2,10 (m, 4H, ProC(β)H), 2,54-2,61 (m, 4 H, ProC(β)H), 2,72-2,86 (m, 2H, AproC(β)H), 2,95-3,17 (m, 2H, AproC(β)H), 3,55-3,86 (m, 12H, ProC(δ)H + ProC(δ)H + AproC(δ)H), 4,19-4,30 (m, 2H, AproC(γ)H), 5,38-5,45 (m, 2H, ProC(α)H), 5,43-5,56 (m, 2H, ProC(α)H), 5,57-5,63 (m, 2H, AproC(α)H), 6,90-7,52 (m, 20H, DPSC(2)H + DPSC(3)H + DPSC(4)H + DPSC(5)H + APAC(3)H + APAC(5)H), 7,68-7,79 (m, 6H, APAC(4)H), 8,70 (m, 2H, DPSNH), 9,64 (s, 2H, APANH), 9,70 (s, 2H, APANH), 9,74 (s, 2H, APANH)
¹³ C-NMR	[151 MHz, DMSO-d ₆] δ 22,8 + 22,9 (Pro-C(γ)), 32,9 + 33,0 (Pro-C(β)), 37,5 (Apro-C(β)), 46,8 (Apro-C(γ)), 48,6 (Pro-C(δ)), 51,8 (Apro-C(δ)), 60,9 (Apro-C(α)), 61,9 + 62,0 (Pro-C(α)), 116,0 + 116,5 (APA-C(3)), 120,2 (APA-C(5)), 127,3 + 127,4 (DPS-C(4)), 128,0 (DPS-C(3) + DPS-C(6)), 129,5 + 129,7 (DPS-C(2)), 136,5 (DPS-C(1)), 138,8 (DPS-C(5)), 139,5 (APA-C(4)), 148,9 + 149,0 (APA-C(2)), 151,9 + 152,4 + 152,6 (APA-C(6)), 166,3 + 166,5 + 166,6 (APA-CO), 169,9 + 170,6 (DPS-CO), 171,4 + 171,5 (Pro-CO, Apro-CO)
Massenspektrum	ESI (m/z): [M+H] ⁺ 1540,2 (43 %), [M+Na] ⁺ 1562,6 (100 %)
C, H, N	ber C: 57,69 % H: 5,33 % N: 16,82 % gef C: 57,96 % H: 5,30 % N: 16,79 % F _w (C ₈₀ H ₇₄ N ₂₀ O ₁₄ ·7 H ₂ O): 1665,6
IR	[KBr, cm ⁻¹] 3395(b,m), 3268(b,m), 3059(w), 2972(w), 2978(w), 1705(m), 1638(s), 1575(s), 1521(s), 1462(s), 1420(s), 1397(s), 1298(m), 1158(m), 1083(w), 993(w), 913(w), 879(w), 821(w), 759(m), 652(w)

Darstellung von (CP)₂Dinitrodiphensäure (23). 227 mg (0,32 mmol) *cyclo*-{(cis-4-Amino-L-Pro)-APA-(Pro-APA)₂}·HCl und 46,8 mg (0,14 mmol) 4,4'-Dinitro-DPSyl-2,2'-dicarbonsäure wurden in 15 ml entgastem DMF p.a. gelöst. Zu dieser Lösung wurden 114 mg (0,35 mmol) TBTU und 180 µl (1,03 mmol) DIEA gegeben. Es wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde chromatographisch mit einer RP-8 Säule gereinigt. Dazu wurde das Elutionsmittel von Wasser/1,4-Dioxan 10:1 langsam über 5:1, 2:1 auf 1:1 umgestellt. Die Fraktionen mit sauberem Produkt wurden zur Trockne eingengt und der Rückstand aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Dazu wurde das Rohprodukt in wenig Methanol aufgenommen und in der Siedehitze so lange Wasser hinzugefügt bis eine Suspension entstand. Nach dem Abkühlen wurde der Niederschlag abgesaugt und gründlich mit Wasser gewaschen.

Ausbeute 152 mg (62 % d.Th.)

Schmelzpunkt > 300 °C



¹ H-NMR	[600 MHz, DMSO-d ₆] δ 1,75 - 1,92 (m, 8H, ProC(γ)H), 1,95 - 2,09 (m, 6H, ProC(β)H + AproC(β)H), 2,53 - 2,61 (m, 4 H, ProC(β)H), 2,75 - 2,84 (m, 2H, AproC(β)H), 3,52 - 3,61 (m, 6H, AproC(δ)H + ProC(δ)H), 3,65 - 3,72 (m, 4H, ProC(δ)H) 3,73 - 3,79 (m, 2H, AproC(δ)H), 4,21 - 4,30 (m, 2H, AproC(γ)H) 5,40 - 5,69 (m, 6H, ProC(α)H + AproC(α)H), 7,09 - 7,29 (m, 6H, APAH(3)), 7,30 - 7,57 (m, 8H, APAH(5) + NDPH(6)) 7,64 - 7,79 (m, 6H, APAH(4)), 8,19 - 8,41 (m, 4H, NDPH(3) + NDPH(5)), 8,70 (s, 2H, NDP-NH), 9,55 (s, 4H, APANH), 9,71 (s, 2H, APA-NH)
¹³ CNMR	[151 MHz, DMSOd ₆] δ 22,8 (ProC(γ)), 33,0 (ProC(β)), 37,5 (AproC(β)), 47,4 (AproC(γ)), 48,6 (ProC(δ)), 52,1 (AproC(δ)), 60,8 (AproC(α)), 61,9 (ProC(α)), 116,1 (APAC(3)), 120,2 (APAC(5)), 122,7 (NDPC(3)), 124,9 (NDPC(5)), 131,7 (NDPC(6)), 139,5 +139,6 (APAC(4)), 147,0 (NDPC(1)), 147,3 (NDPC(4)), 149,1 (APAC(2)), 152,0 (NDPC(4)), 152,4 + 152,5 (APAC(6)), 166,0 (APACO), 171,1 (NDPCO), 171,4 + 171,5 (ProCO, AproCO)
Massenspektrum	MALDI/TOF (m/z): [M+H] ⁺ 1629,4 (100 %)
C, H, N	ber C: 55,88 % H: 4,81 % N: 17,92 % gef C: 55,91 % H: 4,78 % N: 17,82 % F _w (C ₈₀ H ₇₂ N ₂₂ O ₁₈ · 5 H ₂ O): 1719,6
IR	[KBr, cm ⁻¹] 3395(b), 3250(w), 3063(w), 2965(w), 2880(w), 1701 (m), 1631(m), 1574(s), 1524(s), 1463(m), 1426(m), 1399(m), 1347(m), 1299(m), 1158(m), 1058(w), 990(w), 913(w), 821(w), 760(m), 655(w), 592(w)

4.5.5 Darstellung der thiohaltigen Cyclopeptide

Darstellung von Boc-*trans*-4-Hydroxy-L-prolin.¹¹⁷ 6,55 g (50 mmol) *trans*-4-Hydroxy-L-prolin wurden in 150 ml 2:1 (v/v) 1,4-Dioxan/Wasser suspendiert und in einem Eisbad abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden etwa 7 ml Triethylamin zugegeben, so dass der pH zwischen 9-10 lag. Anschließend wurde innerhalb von einer Stunde eine Lösung aus 12 g (55 mmol) Boc₂O in 100 ml 1,4-Dioxan zugetropft. Es wurde vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde mit Kaliumhydrogensulfatlösung angesäuert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde anschließend dreimal mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Animpfen mit vorhandenem Produkt kristallisierte die erhaltene zähe Masse.

Ausbeute: 7,6 g (66 % d.Th.)

Darstellung des Dipeptids Boc-(*trans*-4-Hydroxy-L-prolin)-APA-OAll (25). 2,67 g (15 mmol) 6-Aminopicolinsäureallylester, 5,20 g (22,5 mmol) Boc-*trans*-4-Hydroxy-L-prolin und 9,48 g (22,5 mmol) PyCloP wurden in 180 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 7,8 ml (45 mmol) Diisopropylethylamin zugetropft und die Reaktionsmischung sieben Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel vollständig im Vakuum entfernt und das Produkt aus dem Rückstand mittels Flash-Chromatographie mit 3:1 (v/v) Ethylacetat/Hexan als Eluens isoliert. Auch nach mehrmaliger Aufreinigung konnte das Produkt nicht elementaranalysenrein erhalten werden.

Ausbeute: 4,94 g (84 % d.Th.)

¹H-NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] δ 1,35 (s, 9H, *t*-Butyl), 1,98 – 2,07 (m, 4H, HypC(β)H), 2,13 - 2,22 (m, 1H, HypC(β)H), 2,86 – 3,0 (s, 4H, HypC(β)H), 3,31 - 3,37 (m, 1H, HypC(δ)H), 3,53 (dd, 2H, ³J_H = 11,1 Hz, ²J_H = 4,7 Hz, HypC(δ)H), 4,30 - 4,36 (m, 1H, HypC(γ)H), 4,59 (t, 1H, ³J_H = 7,6 Hz, HypC(α)H), 4,70 (s, b, 1H, -OH), 4,83 - 4,86 (m, 2H, All CH₂),

5,30 (d, 1H, $^3J_{\text{H}} = 10,4$ Hz, $^2J_{\text{H}} = 1,3$ Hz, AllH_{cis}), 5,43 (d, 1H, $^3J_{\text{H}} = 17,2$ Hz, $^2J_{\text{H}} = 1,5$ Hz, AllH_{trans}), 6,00 - 6,12 (m, 1H, AllH_{vic}), 7,77 (d, 1H, $^3J_{\text{H}} = 7,4$ Hz, APAC(3)H), 7,96 (d, 1H, $^3J_{\text{H}} = 7,9$ Hz, APAC(4)), 8,28 (d, 1H, $^3J_{\text{H}} = 8,3$ Hz APAC(5)H), 10,46 (s, 1H, NH)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): [M+H]⁺ 392,0 (100 %), [M+Na]⁺ 414,0 (88 %), [M+K]⁺ 430,0 (16 %)

Darstellung des Dipeptids Boc-(*trans*-4-Tosyloxy-L-Pro)-APA-OAll (26). 4,42 g (11 mmol) Boc-(*trans*-4-Hydroxy-L-prolin)-APA-OAll wurden in 11 ml trockenem Methylenchlorid und 11 ml Pyridin gelöst. In einer Portion wurden 10,5 g (55 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Ölpumpenvakuum im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit 10 %iger Natriumcarbonatlösung und dreimal mit Wasser gewaschen und dann getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand chromatographisch (Hexan/Ethylacetat 1:1) gereinigt. Das Produkt erstarrte im Ölpumpenvakuum. Selbst nach mehrmaliger Aufreinigung konnte kein elementaranalysenreines Produkt erhalten werden

Ausbeute: 5,54 g (92 % d.Th.)

¹H-NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, 100°C] δ 1,33 (s, 9H, *t*-Bu), 2,15 - 2,29 (m, 1H, HypC(β)H), 2,44 - 2,47 (s, 4H, HypC(β)H + CH₃-Tos), 3,46 - 3,67 (m, 2H, HypC(δ)H), 4,56-4,69 (m, 1H, HypC(α)H), 4,79 - 4,90 (m, 2H, AllCH₂), 5,18 (s, 1H, HypC(γ)H), 5,30 (d, 1H, $^3J_{\text{H}} = 10,3$ Hz, AllH_{cis}), 5,42 (d, 1H, $^3J_{\text{H}} = 17,2$ Hz, AllH_{trans}), 5,96 - 6,14 (m, 1H, AllH_{vic}), 7,39-7,47 (m, 2H, TosC(3)H + TosC(5)H), 7,70 - 7,78 (m, 3H, APAC(3)H + TosC(2 + 6)H), 7,91 - 8,00 (m, 1H, APAC(4)), 8,17 - 8,34 (m, 1H, APAC(5)H), 10,58 (m, 1H, NH)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): [M+H]⁺ 546,2 (100 %), [M+Na]⁺ 568,2 (43 %), [M+K]⁺ 582,2 (43 %)

Darstellung des Dipeptids Boc-(*cis*-4-(*Bz*)Thio-L-Pro)-APA-OAll (35). 6,03 g (11 mmol) Boc-(*trans*-4-Tosyloxy-L-Pro)-APA-OAll und 4,58 g (33 mmol) Kaliumcarbonat wurden in 240 ml DMF p.a. suspendiert. Nach der Zugabe von 4,59 ml (35 mmol) Thiobenzoessäure 90 % wurde die Suspension fünf Stunden bei 80 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einer Kieselgelsäule und 1:1 (v/v) Hexan/Ethylacetat als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 3,48 g (62 % d.Th.)

Schmelzpunkt 68-75 °C

¹H-NMR [500 MHz, DMSO-d₆, 80°C] δ 1,38 (s, 9H, *t*-Bu), 2,03-2,08 (m, 1H, ProC(β)H), 2,88-2,93 (m, 1H, ProC(β)H), 3,38-3,42 (m, 1H, ProC(γ)H), 4,06-4,09 (m, 1H, ProC(δ)H), 4,13-4,19 (m, 1H, ProC(δ)H), 4,62-4,65 (m, 1H, ProC(α)H), 4,85 (d, 2H, ²J_H = 5,64 Hz, AllCH₂), 5,31 (dd, 1H, ³J_H = 10,50 Hz, ²J_H = 1,20 Hz, AllH_{cis}), 5,43 (dd, 1H, ³J_H = 17,22 Hz, ²J_H = 1,44 Hz, AllH_{trans}), 6,02-6,09 (m, 1H, AllH_{vic}), 7,54 (t, ³J_H = 6,80 Hz, 2H, BzC(3)H), 7,79 (d, 1H, ³J_H = 7,44 Hz, APAC(3)H), 7,88-7,90 (m, 2H, BzC(2)H), 7,99 (t, 1H, ³J_H = 7,80 Hz, APAC(4)H), 8,30 (d, 1H, ³J_H = 8,34 Hz, APAC(5)H), 10,61 (m, 1H, NH)

¹³C-NMR [151 MHz, DMSO-d₆] δ 28,5 (*t*-Bu-CH₃-C), 36,8 (Tpro-C(β)), 39,3 (Tpro-C(γ)), 52,8 (Tpro-C(δ)), 60,2 (Tpro-C(α)), 65,9 (All-CH₂-C), 79,9 (*t*-Bu *t*-C), 117,9 (All-C_(trans/cis)), 118,8 (APA-C(3)), 120,8 (APA-C(5)), 127,3 (Bz-C(2)), 129,4 (Bz-C(3)), 132,9 (Ally-C_{vic}), 134,3 (Bz-C(4)), 136,9 (Bz-C(1)) 139,8 (APA-C(4)), 149,1 + 146,7 (APA-C(2)), 152,4 (APA-C(6)), 153,6 (*t*-Bu-CO), 171,9 (Tpro-CO), 191,2 (Bz-CO)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): [M+H]⁺ 512,2 (47 %), [M+Na]⁺ 534,2 (100 %), [M+K]⁺ 550,2 (74 %)

C, H, N ber C: 61,04 % H: 5,71 % N: 8,21 %
gef C: 60,83 % H: 5,66 % N: 8,08 %
F_w: 511,59

IR [KBr, cm⁻¹] 3396(w), 3288 (w), 3062(w), 2977(w), 2936(w), 2973(w),
1701(s), 1669(s), 1579(m), 1534(m), 1456(s), 1399(m), 1366(m),
1303(m), 1245(m), 1210(m), 1160(s), 1078(w), 989(w), 908(m), 828(w),
768(m), 689(m), 648(w), 547(w)

Darstellung von Boc-[(*cis*-4-(Bz)Thio-L-Pro)-APA]₂-OAll (38).

1. Allyl-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemeine Arbeitsweisen. Es wurden 1,70 g (3,30 mmol) Boc-(*cis*-4-(Bz)Thio-L-Pro)-APA-OAll eingesetzt.

Ausbeute: nicht bestimmt, 100 % angenommen

2. Boc-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemeine Arbeitsweisen. Es wurden 1,70 g (3,30 mmol) Boc-(*cis*-4-(Bz)Thio-L-Pro)-APA-OAll eingesetzt.

Ausbeute: 1,59 g (100 % d.Th.)

3. Kupplung

1,59 g (3,30 mmol) H-(*cis*-4-(Bz)thio-L-Pro)-APA-OAll · 2 HCl, der Rückstand der Allyl-Entschützung von Boc-(*cis*-4-(Bz)thio-L-Pro)-APA-OH und 1,67 g (3,96 mmol) PyCloP wurden in 75 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 2,52 ml (14,5 mmol) Diisopropylethylamin zugetropft und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt mittels

Flashchromatographie (2:1 (v/v) Ethylacetat/Hexan) isoliert. Das Produkt erstarrte im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 2,66 g (93 % d.Th.)

Schmelzpunkt 122 °C

¹H-NMR [200 MHz, CDCl₃] δ 1,46 (s, 9H, *t*-Bu), 2,51 (m, 1H, ProC(β)H), 2,60-3,10 (m, 3H, ProC(β)H), 3,48 (m, 2H, ProC(γ)H), 3,77 (m, 2H, ProC(δ)H), 4,17 (m, 2H, ProC(δ)H), 4,57 (m, 2H, ProC(α)H), 4,88 (s, 2H, AllCH₂), 5,33 (d, 1H, ³J_H = 10,5 Hz, AllH_{cis}), 5,45 (d, 1H, ³J_H = 17,8 Hz, AllH_{trans}), 6,03 (m, 1H, AllH_{vic}), 7,42 (m, 4H, BzH + APAC(3)H), 7,56 (m, 2H, APAC(4)H), 7,80-8,01 (m, 8H, BzH), 8,43 (m, 2H, APAC(5)H), 9,02-9,59 (m, 2H, NH)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): [M+H]⁺ 865,2 (70 %), [M+Na]⁺ 887,2 (100 %), [M+K]⁺ 903,2 (92 %)

IR [KBr, cm⁻¹] 3395(w), 3275(w), 3360(w), 2975(w), 2929(w), 2879(w), 1702(s), 1664(s), 1576(s), 1533(m), 1456(s), 1397(s), 1366(m), 1302(s), 1245(m), 1210(s), 1159(s), 1078(w), 991(w), 908(s), 825(w), 767(m), 688(s), 674(m)

Darstellung des Hexapeptids Boc-[(*cis*-4-(Bz)Thio-L-Pro)-APA]₂-L-Pro-APA-OAll (40).

1. Benzyl-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemeine Arbeitsweisen. Es wurden 1,36 g (3,20 mmol) Boc-L-Pro-APA-OBn eingesetzt.

Ausbeute: 1,04 mg (100 % d.Th.)

2. Boc-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemeine Arbeitsweisen. Es wurden 2,59 g (3 mmol) Boc-[(*cis*-4-(*Bz*)Thio-L-Pro)-APA]₂-OAll eingesetzt.

Ausbeute: 2,62 g (100 % d.Th.)

3. Kupplungsreaktion

1,04 g (3,20 mmol) Boc-L-Pro-APA-OH und 2,62 g (3 mmol) H-[(*cis*-4-(*Bz*)Thio-L-Pro)-APA]₂-OAll · 3 HCl wurden mit 1,06 g (3,3 mmol) TBTU in 90 ml DMF p.a. gelöst. Nach Zugabe von 2,19 ml (12,6 mmol) Diisopropylethylamin wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 900 ml Wasser gegossen und die Suspension mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 4 eingestellt. Es wurde noch 10 Minuten gerührt und danach der Niederschlag abfiltriert. Er wurde gründlich mit Wasser gewaschen und zunächst auf der Fritte und anschließend im Exsikator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 2,99 g (92 % d.Th.)

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): [M+Na]⁺ 1104,5 (100 %), [M+K]⁺ 1120,5 (49 %)

Darstellung von *cyclo*-{[(*cis*-4-(*Bz*)Thio-L-Pro)-APA]₂-L-Pro-APA} (42).

1. Allyl-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemeine Arbeitsweisen. Es wurden 1,08 g (1 mmol) Boc-[(*cis*-4-(*Bz*)Thio-L-Pro)-APA]₂-L-Pro-APA-OAll eingesetzt.

Ausbeute: nicht bestimmt, 100 % angenommen

2. Boc-Entschützung

Versuchsdurchführung siehe allgemein Arbeitsweisen.

Es wurde allerdings vier Stunden lang gerührt und das Edukt bzw. Produkt löste sich nicht vollständig während der Reaktion!

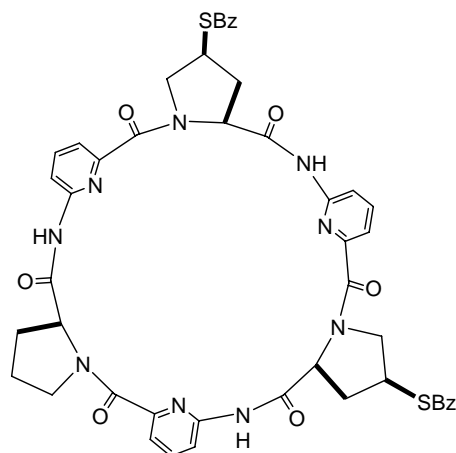
Das Produkt der Ally-Entschützung Boc-[(*cis*-4-(Bz)thio-L-Pro)-APA]₂-L-Pro-APA-OH (1mmol) wurde vollständig eingesetzt.

Ausbeute: nicht bestimmt, 100 % angenommen

Cyclisierung

1,60 g (5 mmol) TBTU wurden in einem 500 ml Dreihalskolben eingewogen und der Kolben sekuriert. Im Stickstoffgegenstrom wurden 200 ml entgastes DMF p.a. zugegeben. Nach Zugabe von 0,42 ml (2,40 mmol) Diisopropylethylamin wurde die Lösung in einem vorgeheizten Ölbad auf 80 °C erwärmt. Nun wurde eine Lösung des vollständig entschützten Hexapeptids (1 mmol) H-[(*cis*-4-(Bz)thio-L-Pro)-APA]₂-L-Pro-APA-OH und 1,04 ml Diisopropylethylamin in 40 ml entgastem DMF p.a. mittels eines Perfursors über einen Zeitraum von vier Stunden hinzugegeben. Anschließend wurde der pH der Reaktionslösung gegebenenfalls durch Zugabe von Diisopropylethylamin auf ca. 9 eingestellt und eine weitere Stunde bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und das Produkt chromatographisch aus dem Rückstand isoliert. Zunächst erfolgte eine Vorreinigung über eine Kieselgelsäule mit Aceton. Anschließend wurde das Produkt in wenig DMF gelöst und auf eine RP-8 Säule aufgetragen. Die Säule war mit 1:10 (v/v) 1,4-Dioxan/Wasser vorkonditioniert worden. Das Elutionsmittel wurde langsam von 1:5 (v/v) 1,4-Dioxan/Wasser über 1:2 (v/v) und 1:1 (v/v) auf 1,4-Dioxan/Wasser 2:1 umgestellt. Das Produkt wurde in den meistens Fällen anschließend nochmals über eine Kieselgelsäule mit Aceton als Eluens gereinigt.

Ausbeute: 322,8 mg (35 % d.Th.)



Schmelzpunkt ab 194 °C Erweichen zu beobachten, Zersetzung bei 230 °C

¹H-NMR [600 MHz, DMSO-d₆] δ 1,80-1,87 (m, 2H, ProC(γ)H), 2,00-2,10 (m, 1H, ProC(β)H), 2,19-2,24 (m, 2 H, ProC(β)H + TproC(β)H), 2,57 (m, 1H, TproC(β)H), 3,17-3,26 (m, 2H, TproC(β)H), 3,53-3,65 (m, 3H, ProC(δ)H + TproC(γ)H), 3,65-3,71 (m, 1H, ProC(δ)H), 4,16-4,30 (m, 4H, TproC(δ)H), 5,67 (s, 1H, ProC(α)H), 5,79-5,95 (m, 2H, TproC(α)H), 7,21 (d, 1H, ³J_H = 8,46 Hz, APAC(3)H), 7,31 (d, 1H, ³J_H = 7,68 Hz, APAC(3)H), 7,37 (d, 1H, ³J_H = 8,46 Hz, APAC(3)H), 7,43 (d, 1H, ³J_H = 7,68 Hz, APAC(5)H), 7,48-7,49 (m, 2H, APAC(5)H), 7,54-7,57 (m, 4H, BzC(4)H + BzC(3)H), 7,69-7,71 (m, 2H, BzC(3)H), 7,73-7,80 (m, 3H, APAC(4)H), 7,87 (m, 4H, BzC(2)H), 9,74 (s, 1H, APANH), 9,88 (s, 2H, APANH)

¹³C-NMR [151 MHz, DMSO-d₆] δ 22,8 (Pro-C(γ)), 33,0 (Pro-C(β)), 38,2 (Tpro-C(γ)), 38,5 + 38,6 (Tpro-C(β)), 48,6 (Pro-C(δ)), 53,4 (Tpro-C(δ)), 61,6 + 61,5 (Tpro-C(α)), 61,9 (Pro-C(α)), 115,9 + 116,1 + 116,3 (APA-C(3)), 120,1 (APA-C(5)), 127,3 (Bz-C(2)), 129,7 (Bz-C(3)), 134,5 (Bz-C(4)), 136,5 (Bz-C(1)), 139,6 + 139,7 + 139,8 (APA-C(4)), 149,1 + 149,2 + 149,3 (APA-C(2)), 151,8 + 152,3 (APA-C(6)), 166,3 + 166,4 (APA-CO), 170,6 + 170,7 (Tpro-CO), 171,6 (Pro-CO), 191,3 (Bz-CO)

Experimenteller Teil

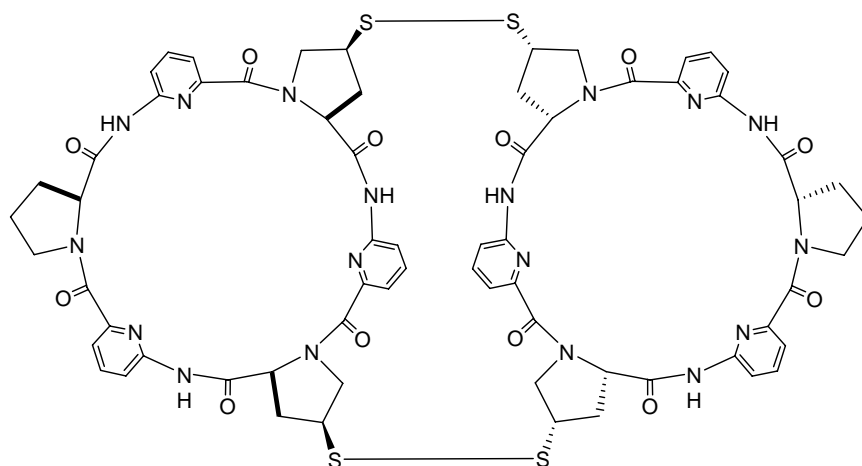
Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): $[M+H]^+$ 923,9 (93 %), $[M+Na]^+$ 945,9 (100 %), $[M+K]^+$ 961,9 (50 %)

C, H, N ber C: 56,67 % H: 4,96 % N: 12,66 %
gef C: 56,90 % H: 4,68 % N: 12,40 %
 $F_w(C_{47}H_{41}N_9O_8S_2 \cdot 4 H_2O)$: 996,08

IR [KBr, cm^{-1}] 3404(b), 3264(b), 3052(w), 2971(w), 2931(w), 2879(w), 1707(m), 1661(m), 1637(m), 1575(s), 1533(m), 1463(s), 1398(s), 1300(m), 1209(m), 1174(m), 1154(w), 1079(w), 990(w), 908(m), 822(w), 760(m), 689(m)

Darstellung von Bis(cyclo-[[*cis*-4-(S)-L-Pro)-APA]₂-L-Pro-APA) (43). 282 mg (0,3 mmol) *cyclo*-[[*cis*-4-(Bz)Thio-L-Pro)-APA]₂-L-Pro-APA} wurden in 25 ml trockenem Methanol suspendiert und es wurden 424 µl DIEA hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde unter einer Sauerstoffatmosphäre bei Raumtemperatur drei Tage gerührt. Anschließend wurde das Methanol im Vakuum entfernt und das Produkt aus dem Rückstand chromatographisch isoliert. Dazu wurde er in wenig DMF aufgenommen auf eine RP-8 Säule aufgetragen. Die Säule war mit 1:10 (v/v) 1,4-Dioxan/Wasser vorkonditioniert worden. Das Elutionsmittel wurde langsam von 1:5 (v/v) 1,4-Dioxan/Wasser auf 1:2 (v/v) umgestellt. Mit diesem Lösungsmittelgemisch eluierte das Produkt. Alternativ wurde der Rückstand mit wenig Methanol aufgenommen und Diethylether hinzugefügt bis das Produkt ausfiel. Der Feststoff wurde abgesaugt und gründlich mit Diethylether gewaschen. Mit der zweiten Methode konnte kein elementaranalysenreines Material erhalten werden, allerdings wurden die Ausbeuteverluste durch die chromatographische Reinigung minimiert und das so erhaltene Produkt war zur Generierung von DCLs ausreichend rein.

Ausbeute 150 mg (70 % d.Th.)



Schmelzpunkt > 300 °C

NMR Spektren waren nicht auswertbar.

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): [M+H]⁺ 1427,4 (100 %), [M+Na]⁺ 1449,2 (14 %), [M+K]⁺ 1465,2 (10 %)

Experimenteller Teil

C, H, N ber C: 50,42 % H: 5,35 % N: 15,66 %
 gef C: 50,66 % H: 5,29 % N: 15,56 %
 F_w(C₆₆H₆₂N₉O₁₃S₄ · 0,5 1,4-Dioxan · 8 H₂O): 1615,75

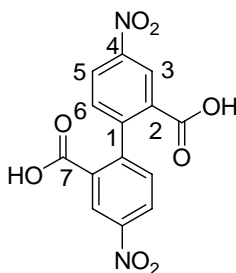
IR [KBr, cm⁻¹] 3442(b), 3258(b), 2977(w), 2925(w), 2873(w), 2735(w),
 2551(w), 1701(m), 1629(s), 1573(s), 1535(m), 1465(m), 1425(s) 1399(s),
 1300 (m), 1211(w), 1182(w), 1154(w), 1085(w), 993(w), 821(w), 761(m)

4.5.6 Darstellung eines fluoreszenzaktiven Bis(cyclopeptids)

4.5.6.1 Darstellung von 4,4'-Bis-dimethylamino-diphenyl-2,2'-dicarbonsäure

Darstellung von 4,4'-Dinitro-diphenyl-2,2'-dicarbonsäure (45).¹¹⁸ 1,24 g (5 mmol) Diphenylsäure 97 %ig wurden in 10,4 ml Schwefelsäure 95-97%ig gelöst. Die Lösung wurde in einem Aceton/Trockeneisbad auf -15 °C gekühlt. Eine Mischung aus 2,89 ml Salpetersäure 65 %ig und 0,28 ml Schwefelsäure 95-97 %ig wurden so hinzuge tropft, dass die Reaktionstemperatur 0 °C nicht überstieg. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurde die Reaktionsmischung auf Eis gegossen und der entstehende Niederschlag abgesaugt. Das so erhaltende Rohprodukt wurde zweimal aus 40 % Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 867 mg (52 % d. Th.)



¹H-NMR [200 MHz, DMSO-d₆] δ 7,53 (d, 2 H, , ³J_H = 8,60 Hz, DPS-C(6)H), 8,44 (dd, 2 H, , ³J_H = 8,60 Hz, , ⁴J_H = 2,64 Hz DPS-C(5)H), 8,67 (d, 2 H, ⁴J_H = 2,64 Hz, DPS-C(3)H)

¹³C-NMR [101 MHz, DMSO-d₆] δ 124,8 (C(5)), 126,4 (C(3)), 131,8 (C(6)), 132,1 (C(2)), 147,4 (C(1)), 148,4 (C(4)), 165,9 (C(7))

Darstellung von 4,4'-Dinitro-diphenyl-2,2'-dicarbonsäuremethylester (48).¹⁰⁴ 4 g (12 mmol) 4,4'-Dinitro-diphenyl-2,2'-dicarbonsäure wurden in 70 ml Methanol suspendiert. Nach Zugabe von 4 g Schwefelsäure konz. wurde die Reaktionsmischung 12 Stunden in der Siedehitze gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert und die Mutterlauge nochmals 12 Stunden in der Siedehitze gerührt. Der erneut nach Abkühlung entstandene Niederschlag wurde wieder abfiltriert und die vereinigten Feststoffe mit kalter 10 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde getrocknet und anschließend mehrmals langsam aus Ethylacetat auskristallisiert.

Ausbeute: 2,30 g (53 % d. Th.)

Darstellung von 4,4'-Diamino-diphenyl-2,2'-dicarbonsäuremethylester (49).¹¹⁹ 1,8 g (5 mmol) 4,4'-Dinitro-diphenyl-2,2'-dicarbonsäuremethylester wurden in 60 ml Ethanol p.a. suspendiert und 200 mg Pd/C hinzugefügt. Die Suspension wurde unter Normaldruck in einer Wasserstoffatmosphäre fünf Tage gerührt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde sauber erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter eingesetzt.

Ausbeute: 1,5 g (100 % d. Th.)

Darstellung von 4,4'-Bis-dimethylamino-diphenyl-2,2'-dicarbonsäuredimethylester (50)
Weg 1.¹⁰⁴ 250 mg (0,83 mmol) 4,4'-Diamino-diphenyl-2,2'-dicarbonsäure-methylester wurden in 10 ml Ethanol suspendiert und 2,47 ml (33 mmol) einer 37 %igen Formaldehydlösung in Wasser hinzugegeben. Anschließend wurden 470 mg (7,5 mmol) Natriumcyanoborhydrid in drei Portionen zugegeben gefolgt von der vorsichtigen Zugabe von 2,1 ml Essigsäure p.a. Die Reaktionsmischung wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels DC (Laufmittel Hexan/Ethylacetat 1:1) überprüft. Falls notwendig, wurde die Reaktionszeit verlängert. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wurde dreimal mit 10 %iger Natriumcarbonat-Lösung und zweimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde noch dreimal mit Toluol

aufgenommen und durch Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer im Vakuum wurden eventuell vorhandene Essigsäurereste entfernt.

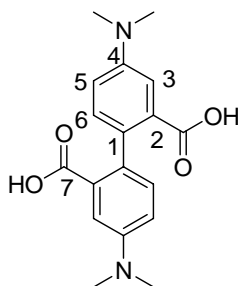
Ausbeute: 251 mg (95 % d. Th)

Darstellung von 4,4'-Bis-dimethylamino-diphenyl-2,2'-dicarbonsäuredimethylester (50)
Weg 2.¹⁰⁴ 400 mg (1,1 mmol) 4,4'-Dinitro-diphenyl-2,2'-dicarbonsäuremethylester wurden in 40 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden 1,232 ml einer 37 %igen Formaldehydlösung in Wasser und 200 mg Pd/C 10 %ig hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Normaldruck unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde danach über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgetrennt. Der Rückstand wurde in Methylenchlorid aufgenommen und dreimal mit 10 %iger Natriumcarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde abschließend aus Ethylacetat/Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 190 mg (38 % d. Th)

Darstellung von 4,4'-Bis-dimethylamino-diphenyl-2,2'-dicarbonsäure Hydrochlorid (51).
190 mg (0,53 mmol) 4,4'-Bis-dimethylamino-diphenyl-2,2'-dicarbonsäuredimethylester wurden in 38 ml konz. Salzsäure aufgenommen und über Nacht in der Siedehitze gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und das reine Produkt als Hydrochlorid erhalten.

Ausbeute: 212 mg (100 % d. Th.)



¹H-NMR [600 MHz, D₂O] δ 3,27 (s, 12H, CH₃), 7,41 (d, 2H, , ³J_H = 8,40 Hz, DPS-C(6)H), 7,73 (dd, 2 H, , ³J_H = 8,40 Hz, ⁴J_H = 2,58 Hz DPS-C(5)H), 8,03 (d, 2 H, ⁴J_H = 2,58 Hz, DPS-C(3)H)

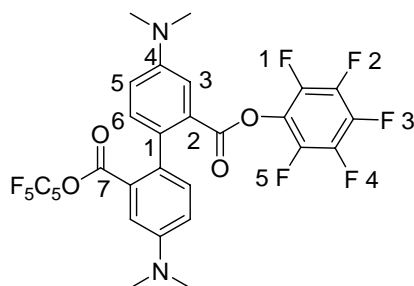
¹³C-NMR [151 MHz, DMSO-d₆] δ 124,8 (C(5)), 126,4 (C(3)), 131,8 (C(6)), 132,1 (C(2)), 147,4 (C(1)), 148,4 (C(4)), 165,9 (C(7))

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): [M+H]⁺ 329,1 (100 %)

C, H, N
 ber C: 51,56 % H: 5,77 % N: 6,68 %
 gef C: 51,81 % H: 5,66 % N: 6,74 %
 F_w(C₁₈H₂₂Cl₂N₂O₄ · 1 H₂O): 419,3

Darstellung von 4,4'-Bis-dimethylamino-diphenyl-2,2'-bis-carbonsäure-bis-pentafluorophenylester. 100 mg (0,3 mmol) 4,4'-Bis-dimethylamino-diphenyl-2,2'-dicarbonsäure Dihydrochlorid und 134,5 mg (0,73 mmol) Pentafluorphenol wurden in 2,5 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Anschließend wurde eine Lösung aus 138 mg (0,67 mmol) DCC in 2,5 ml trockenem THF hinzugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt aus dem Rückstand chromatographisch (Essigester/Hexan 1:1) abgetrennt. Es war für Testzwecke sauber genug.

Ausbeute: 80 mg (45 % d.Th.)



¹H-NMR [600 MHz, CDCl₃] δ 3,06 (s, 12H, Methyl), 7,00 (dd, 2H, , ³J_H = 8,5 Hz, ⁴J_H = 2,6 Hz, DPS-C(5)H), 7,19 (d, 2 H, ³J_H = 8,5 Hz, DPS-C(5)H), 7,52 (d, 2 H, ⁴J_H = 3,6 Hz, DPS-C(3)H)

^{19}F -NMR [565 MHz, CDCl_3] δ -162,9 (t, 2F, $^3J_{\text{F}} = 20,3$ Hz, F(2) + F(4)), -158,8 (t, 1F, $^3J_{\text{F}} = 21,5$ Hz, F(3)), -152,2 (d, $^3J_{\text{F}} = 18,6$ Hz, F(5) + F(6))

Versuche zur Darstellung von $(\text{CP})_2\text{DADP}$ (52)

Kupplung mit TBTU in DMF

246,7 mg (0,35 mmol) *cyclo*-{(4-*cis*-Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂}-hydrochlorid, 70,4 mg (0,175 mmol) 4,4'-Bis-dimethylamino-diphenyl-2,2'-dicarbonsäure Hydrochlorid und 124 mg (0,39 mmol) TBTU wurden in 30 ml DMF p.a. entgast suspendiert. Nach der Zugabe von 323 μl (1,86 mmol) Diisopropylethylamin wurde 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in wenig DMF gelöst und auf eine RP-8 Säule, die mit 10:1 (v/v) Wasser/1,4-Dioxan vorkonditioniert war, aufgetragen. Danach wurde das Elutionsmittel von Wasser/1,4-Dioxan 10:1 langsam über 5:1, 2:1 auf 1:1 umgestellt. Es konnte keine sauberen Fraktionen erhalten werden.

Kupplung in Methylenchlorid

25 mg (35 μmol) *cyclo*-{(4-*cis*-Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂}-hydrochlorid, 7,5 mg (18 μmol) 4,4'-Bis-dimethylamino-diphenyl-2,2'-dicarbonsäure Hydrochlorid und 71 mg (170 μmol) PyCloP wurden in 5 ml trockenem Methylenchlorid suspendiert. Nach der Zugabe von 61 μl (350 μmol) Diisopropylethylamin wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es konnte keine Produktbildung festgestellt werden.

Kupplung mit EDC

11,5 mg (28 μmol) 4,4'-Bis-dimethylamino-diphenyl-2,2'-dicarbonsäure Hydrochlorid, 11 μl (120 μmol) Diisopropylethylamin, 12 mg (63 μmol) EDC·HCl und eine Spatelspitz DMAP wurden in 2,5 ml Ethylacetat gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Die Bildung des aktivierten Esters wurde mit Dünnschichtchromatographie überprüft. Nach der Bildung des gewünschten Esters wurde in der Kälte eine Lösung aus 41 mg (56 μmmol) *cyclo*-{(4-*cis*-amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂}-hydrochlorid und 11 μl Diisopropyl-ethylamin zur Reaktionslösung hinzugefügt. Es konnte kein Umsatz zum gewünschten Produkt beobachtet werden.

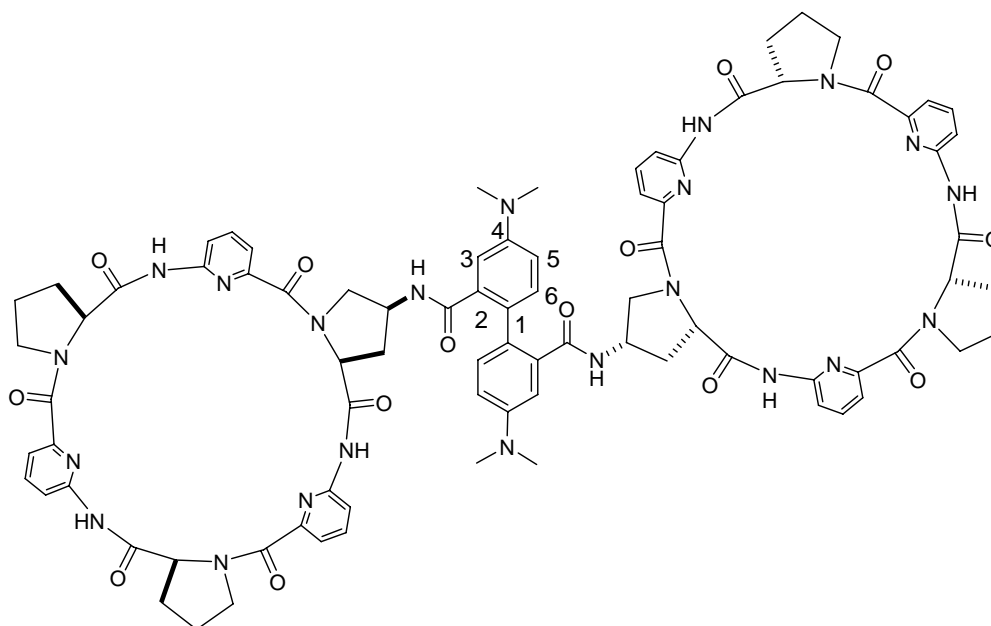
Kupplung mit einem aktivierten Diphensäureester

4 mg (5,7 μmol) *cyclo*-{(4-*cis*-Amino-L-Pro)-APA-(L-Pro-APA)₂}-hydrochlorid und 1,9 mg (2,8 μmol) 4,4'-Bis-dimethylamino-diphenyl-2,2'-bis-carbonsäure-bis-penta-fluorphenylester wurden in 5 ml trockenem Methylenchlorid suspendiert. Nach der Zugabe von 1,4 μl (7,9 μmol) Diisopropylethylamin wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach einem Tag wurde eine Spatelspitze DMAP hinzugefügt. Es konnte keine Produktbildung festgestellt werden.

Reduktive Aminoalkylierung von (CP)₂Dinitrodiphensäure (23).

107 mg (66 μmol) (CP)₂Dinitrodiphensäure wurden in 5 ml Methanol HPLC-Grade gelöst und 150 mg 10 % Pd/C hinzugefügt. Anschließend wurden 640 μl (7,9 mmol) 37 % Formaldehydlösung in Wasser zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bei 5 bar unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur für zwei Tage gerührt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels analytischer HPLC überprüft und bei Bedarf wurde 10 % Pd/C sowie 37 % Formaldehydlösung nachdosiert. Nach vollständigem Umsatz wurde der Pd/C-Katalysator über eine Fritte mit Celite entfernt und der Filterkuchen gründlich mit Methanol gewaschen. Nach dem Entfernen des Lösungsmittel im Vakuum wurde der Rückstand in wenig Methanol/Acetonitril aufgenommen und mit Hilfe einer präparativen HPLC (Säule LiChroCART® 250-10, Purospher®STAR RP-18 endcapped (5 μm)) mit dem Lösungsmittelgemisch 70:30 (v/v) Wasser/Acetonitril als Eluens gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute 35 mg (29 % d. Th.)



Schmelzpunkt > 300 °C

¹H-NMR [600 MHz, DMSO-d₆] δ 1,75 - 1,91 (m, 8H, ProC(γ)H), 1,95 - 2,08 (m, 6H, ProC(β)H + AproC(β)H), 2,53 - 2,85 (m, 16H, ProC(β)H + N(CH₃)₂), 3,07 - 3,22 (m, 2H, AproC(β)H), 3,53 - 3,89 (m, 12H, AproC(δ)H + ProC(δ)H), 4,18 - 4,36 (m, 2H, AproC(γ)H) 5,36 - 5,46 (m, 2H, ProC(α)H), 5,49 - 5,57 (m, 2H, ProC(α)) 5,58 - 5,67 (m, 2H, AproC(α)H), 6,40 - 6,98 (m, 6H, DADP H(3) + H(5) + H(6)), 7,15 - 7,32 (m, 6H, APAH(3)), 7,36 - 7,46 (m, 6H, APAH(5)) 7,69 - 7,79 (m, 6H, APAH(4)), 8,50 - 8,69 (m, 2H, DADP NH), 9,65 - 9,89 (m, 6H, APANH)

¹³CNMR [151 MHz, DMSOd₆] δ 22,8 + 22,9 (ProC(γ)), 33,0 + 33,0 (ProC(β)), 37,7 (AproC(β)), 46,7 (AproC(γ)), 48,5 + 48,6 (ProC(δ)), 51,8 (AproC(δ)), 60,9 (AproC(α)), 61,9 (ProC(α)), 113,1 (DADP-C(3)), 116,0 (APA-C(3)), 116,3 (DADP-C(5)), 120,1 (APA-C(5)), 126,4 (DADP-C(1)), 130,8 (DADP-C(6)), 137,6 (DADP-C(2)), 139,5 (APA-C(4)), 148,9 + 149,0 (APA-C(2)), 149,7 (DADP-C(4)), 152,0 + 152,4 + 152,6 (APA-C(6)), 166,3 (APA-CO), 166,6 (DADP-CO), 171,4 + 171,5 (Pro-CO, Apro-CO)

Experimenteller Teil

Massenspektrum MALDI/TOF (m/z): $[M+H]^+$ 1626,1 (9 %), $[M+Na]^+$ 1648,1 (100 %), $[M+K]^+$ 1664,1 (51 %)

C, H, N ber C: 55,32 % H: 5,86 % N: 16,90 %
gef C: 55,48 % H: 5,69 % N: 16,92 %
 $F_w(C_{84}H_{84}N_{22}O_{14} \cdot 11 H_2O)$: 1823,9

IR [KBr, cm^{-1}] 3446(b), 3247(w), 2982(w), 1699 (m), 1629(m), 1573(s), 1534(s), 1468(m), 1427(m), 1401(m), 1300(m), 1261(m), 1158(m), 1084(w), 992(w), 821(w), 762(m)

5 Literatur

- 1 Brückner, R. *Reaktionsmechanismen. Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden* 3ed.; Spektrum Akademischer Verlag, 2004,
- 2 Seebach, D., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 1320-1367. *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1363-1404.
- 3 Rowan, S. J.; Cantrill, S. J.; Cousins, G. R. L.; Sanders, J. K. M.; Stoddart, J. F., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 898-952. *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 938-993.
- 4 Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S., *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652-3711.
- 5 Lehn, J. M., *Chem.-Eur. J.* **1999**, *5*, 2455-2463.
- 6 Rowan, S. J.; Sanders, J. K. M., *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1536-1546.
- 7 Rowan, S. J.; Brady, P. A.; Sanders, J. K. M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2143-2145. *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2283-2285.
- 8 Giuseppone, N.; Lehn, J. M., *Chem.-Eur. J.* **2006**, *12*, 1715-1722.
- 9 Lam, R. T. S.; Belenguer, A.; Roberts, S. L.; Naumann, C.; Jarrosson, T.; Otto, S.; Sanders, J. K. M., *Science* **2005**, *308*, 667-669.
- 10 Green, J. E.; Choi, J. W.; Boukai, A.; Bunimovich, Y.; Johnston-Halperin, E.; DeIonno, E.; Luo, Y.; Sheriff, B. A.; Xu, K.; Shin, Y. S.; Tseng, H. R.; Stoddart, J. F.; Heath, J. R., *Nature* **2007**, *445*, 414-417.
- 11 Park, C.; Oh, K.; Lee, S. C.; Kim, C., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1455-1457. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1477-1479.
- 12 Nguyen, T. D.; Leung, K. C. F.; Liong, M.; Pentecost, C. D.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I., *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3363-3366.
- 13 Nguyen, T. D.; Tseng, H. R.; Celestre, P. C.; Flood, A. H.; Liu, Y.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 10029-10034.
- 14 Cantrill, S. J.; Rowan, S. J.; Stoddart, J. F., *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1363-1366.
- 15 Rowan, S. J.; Stoddart, J. F., *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1913-1916.
- 16 Furusho, Y.; Hasegawa, T.; Tsuboi, A.; Kihara, N.; Takata, T., *Chem. Lett.* **2000**, 18-19.
- 17 Hamilton, D. G.; Feeder, N.; Teat, S. J.; Sanders, J. K. M., *New J. Chem.* **1998**, *22*, 1019-1021.
- 18 Weck, M.; Mohr, B.; Sauvage, J. P.; Grubbs, R. H., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5463-5471.

-
- 19 Gibb, C. L. D.; Gibb, B. C., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11408-11409.
- 20 Warmuth, R., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2000**, *37*, 1-38.
- 21 Liu, X. J.; Liu, Y.; Li, G.; Warmuth, R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 901-904.
Angew. Chem. **2006**, *118*, 915-918.
- 22 Lützen, A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1000-1002. *Angew. Chem.* **2005**, *117*,
1022-1025.
- 23 Ziegler, M.; Brumaghim, J. L.; Raymond, K. N., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*,
4119-4121.
- 24 Cram, D. J.; Tanner, M. E.; Thomas, R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 1024-1027.
Angew. Chem. **1991**, *103*, 1048-1051.
- 25 Tam-Chang, S. W.; Stehouwer, J. S.; Hao, J. S., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 334-335.
- 26 Ro, S.; Rowan, S. J.; Pease, A. R.; Cram, D. J.; Stoddart, J. F., *Org. Lett.* **2000**, *2*,
2411-2414.
- 27 Liu, X. J.; Warmuth, R., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14120-14127.
- 28 Kubik, S.; Goddard, R.; Kirchner, R.; Nolting, D.; Seidel, J., *Angew. Chem. Int. Ed.*
2001, *40*, 2648-2651. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2722-2735.
- 29 Kubik, S.; Kirchner, R.; Nolting, D.; Seidel, J., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12752-
12760.
- 30 Kubik, S.; Goddard, R.; Otto, S.; Pohl, S.; Reyheller, C.; Stuwe, S., *Biosens.*
Bioelectron. **2005**, *20*, 2364-2375.
- 31 Hay, B. P.; Firman, T. K., *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 5502-5512.
- 32 Bryantsev, V. S.; Hay, B. P., *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 4678-4688.
- 33 Hay, B. P.; Oliferenko, A. A.; Uddin, J.; Zhang, C. G.; Firman, T. K., *J. Am. Chem.*
Soc. **2005**, *127*, 17043-17053.
- 34 Reyheller, C.; *Diplomarbeit*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2002**
- 35 Szumna, A.; Jurczak, J., *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4031-4039.
- 36 Rodriguez-Docampo, Z.; Pascu, S. I.; Kubik, S.; Otto, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*,
11206-11210.
- 37 Turnbull, W. B.; Daranas, A. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14859-14866.
- 38 Marcus, Y. *Ion properties*; Marcel Dekker: New York, 1997,
- 39 Schmidtchen, F. P.; Berger, M., *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1609-1646.
- 40 Katayev, E. A.; Ustynyuk, Y. A.; Sessler, J. L., *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3004-
3037.
-

-
- 41 Kang, S. O.; Begum, R. A.; Bowman-James, K., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7882-7894. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8048-8061.
- 42 Bondy, C. R.; Loeb, S. J., *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 77-99.
- 43 Williams, D. H.; Stephens, E.; O'Brien, D. P.; Zhou, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6596-6616. *Angew. Chem.* **2004**, *48*, 670-6782.
- 44 Houk, K. N.; Leach, A. G.; Kim, S. P.; Zhang, X. Y., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4872-4897. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5020-5046.
- 45 Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210-1250. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1244-1287.
- 46 Williams, D. H.; Westwell, M. S., *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 57-63.
- 47 Grunwald, E.; Steel, C., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5687-5692.
- 48 Denamor, A. F. D.; Ritt, M. C.; Schwingweill, M. J.; Arnaudneu, F.; Lewis, D. F. V., *J. Chem. Soc.-Faraday Trans.* **1991**, *87*, 3231-3239.
- 49 Schmidtchen, F. P., *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2918-2928.
- 50 Ringe, J. D. *Fluoride in osteoporosis*; 2nd ed.; Academic Press: San Diego, 2002, 1387-1399.
- 51 Gorden, A. E. V.; Davis, J.; Sessler, J. L.; Kral, V.; Keogh, D. W.; Schroeder, N. L., *Supramol. Chem.* **2004**, *16*, 91-100.
- 52 Omori, T.; Nagasaki, K.; Watanabe, E.; Suganuma, H., *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **1997**, *220*, 37-40.
- 53 Katayev, E. A.; Boev, N. V.; Khrustalev, V. N.; Ustynyuk, Y. A.; Tananaev, I. G.; Sessler, J. L., *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2886-2896.
- 54 Wichmann, K.; Antonioli, B.; Sohnle, T.; Wenzel, M.; Gloe, K.; Gloe, K.; Price, J. R.; Lindoy, L. F.; Blake, A. J.; Schroder, M., *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2987-3003.
- 55 Nieto, S.; Perez, J.; Riera, L.; Riera, V.; Miguel, D., *Chem.-Eur. J.* **2006**, *12*, 2244-2251.
- 56 Otto, S.; Kubik, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7804-7805.
- 57 Cook, J. L.; Hunter, C. A.; Low, C. M. R.; Perez-Velasco, A.; Vinter, J. G., *Angew. Chem. Ed.* **2007**, *46*, 3706-3709. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3780-3783.
- 58 Brady, P. A.; Sanders, J. K. M., *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **1997**, 3237-3253.
- 59 Huc, I.; Lehn, J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 2106-2110.
- 60 Cousins, G. R. L.; Furlan, R. L. E.; Ng, Y. F.; Redman, J. E.; Sanders, J. K. M., *Angew. Chem. Ed.* **2001**, *40*, 423-428. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 437-442.
- 61 Kubik, S., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5846-5855.
-

-
- 62 Furlan, R. L. E.; Ng, Y. F.; Cousins, G. R. L.; Redman, J. E.; Sanders, J. K. M., *Tetrahedron* **2002**, *58*, 771-778.
- 63 Furlan, R. L. E.; Ng, Y. F.; Otto, S.; Sanders, J. K. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8876-8877.
- 64 Gilbert, H. F., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 29399-29402.
- 65 Gilbert, H. F. in *Biothiols, Pt A*; Methods in Enzymology, 1995; Vol. 251, 8-28.
- 66 Patai, S. *The chemistry of the thiol group*; Wiley: London, 1974, 806-839.
- 67 Patai, S. *The chemistry of sulphur-containing functional groups*; Wiley: London, 1993, 633-658.
- 68 Cullis, C. F.; Hopton, J. D.; Trimm, D. L., *J. Appl. Chem. USSR* **1968**, *18*, 330-335.
- 69 Wallace, T. J.; Bartok, W.; Schriesheim, A., *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1311-1314.
- 70 Der Begriff Bibliothek bezieht sich streng genommen auf Gemische, die mehr als zwei unterschiedliche Bausteine beinhalten. Aus praktischen Gründen wird dieser Begriff im Folgenden aber auch für Gemische verwendet, die nur das funktionalisierte Cyclopeptid und eine Linkerspezies beinhalten.
- 71 Rodriguez-Docampo, Z., persönliche Mitteilung.
- 72 Schug, K. A.; Lindner, W., *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 67-113.
- 73 Antonisse, M. M. G.; Reinhoudt, D. N., *Electroanalysis* **1999**, *11*, 1035-1048.
- 74 Leevy, W. M.; Weber, M. E.; Schlesinger, P. H.; Gokel, G. W., *Chem. Commun.* **2005**, 89-91.
- 75 Kang, T. M.; Markin, V. S.; Hilgemann, D. W., *J. Gen. Physiol.* **2003**, *121*, 325-347.
- 76 Bakker, E.; Qin, Y., *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3965-3983.
- 77 Bakker, E., *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3285-3298.
- 78 Bakker, E.; Telting-Diaz, M., *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2781-2800.
- 79 Tompa, K.; Birbaum, K.; Malon, A.; Vigassy, T.; Bakker, E.; Pretsch, E., *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7801-7809.
- 80 Malon, A.; Radu, A.; Qin, W.; Qin, Y.; Ceresa, A.; Maj-Zurawska, M.; Bakker, E.; Pretsch, E., *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3865-3871.
- 81 Bakker, E.; Pretsch, E., *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 420A-426A.
- 82 Atwood, J. L.; Davies, J. E. D.; MacNicol, D. D.; Vögtle, F.; Lehn, J. M.; Gokel, G. W. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Elsevier Science: Oxford, 1996,
- 83 Lukens, W. W.; Bucher, J. J.; Shuh, D. K.; Edelstein, N. M., *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 8064-8070.
-

-
- 84 Lukens, W. W.; Shuh, D. K.; Schroeder, N. C.; Ashley, K. R., *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 229-233.
- 85 Hofmeister, F., *Arch. Exp. Patol. Pharmacol.* **1888**, *24*, 247-260.
- 86 Fibbioli, M.; Berger, M.; Schmidtchen, F. P.; Pretsch, E., *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 156-160.
- 87 Dissertation von Fibbioli, M., ETH Zürich, Nr. 13789, **2000**.
- 88 Berrocal, M. J.; Cruz, A.; Badr, I. H. A.; Bachas, L. G., *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5295-5299.
- 89 Xiao, K. P.; Buhlmann, P.; Nishizawa, S.; Amemiya, S.; Umezawa, Y., *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1038-1044.
- 90 Nishizawa, S.; Buhlmann, P.; Xiao, K. P.; Umezawa, Y., *Anal. Chim. Acta* **1998**, *358*, 35-44.
- 91 Buhlmann, P.; Amemiya, S.; Nishizawa, S.; Xiao, K. P.; Umezawa, Y., *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.* **1998**, *32*, 151-163.
- 92 Siswanta, D.; Takenaka, J.; Suzuki, T.; Sasakura, H.; Hisamoto, H.; Suzuki, K., *Chem. Lett.* **1997**, 195-196.
- 93 Amemiya, S.; Buhlmann, P.; Tohda, K.; Umezawa, Y., *Anal. Chim. Acta* **1997**, *351*, 407-407.
- 94 Brzozka, Z., <http://csrg.ch.pw.edu.pl/tutorials/ise/>, 17.06.2007
- 95 Martinez-Manez, R.; Sancenon, F., *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419-4476.
- 96 Suksai, C.; Tuntulani, T., *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 192-202.
- 97 deSilva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E., *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515-1566.
- 98 Gunnlaugsson, T.; Glynn, M.; Tocci, G. M.; Kruger, P. E.; Pfeffer, F. M., *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3094-3117.
- 99 Chen, C. T.; Wagner, H.; Still, W. C., *Science* **1998**, *279*, 851-853.
- 100 Fabbrizzi, L.; Pallavicini, P.; Parodi, L.; Taglietti, A., *Inorg. Chim. Acta* **1995**, *238*, 5-8.
- 101 Fabbrizzi, L.; Faravelli, I.; Francese, G.; Licchelli, M.; Perotti, A.; Taglietti, A., *Chem. Commun.* **1998**, 971-972.
- 102 Lee, D. H.; Im, J. H.; Lee, J. H.; Hong, J. I., *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9637-9640.
- 103 Costero, A. M.; Gil, S.; Sanchis, J.; Peransi, S.; Sanz, V.; Williams, J. A. G., *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6327-6334.
-

-
- 104 Costero, A. M.; Andreu, C.; Monrabal, E.; Tortajada, A.; Ochando, L. E.; Amigo, J. M., *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12499-12508.
- 105 Costero, A. M.; Sanchis, J.; Gil, S.; Sanz, V.; Williams, J. A. G., *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2848-2853.
- 106 Connors, K. A. *Binding Constants*; Wiley: New York, 1987,
- 107 Benmenni, L.; Alilou, E. H.; Giorgi, M.; Pierrot, M.; Reglier, M., *J. Chem. Cryst.* **1994**, *24*, 345-352.
- 108 Popova, E. G.; Chetkina, L. A.; Sobolev, A. N., *J. Struct. Chem.* **1991**, *32*, 431-433.
- 109 Costero, A. M.; Andreu, C.; Martinez-Manez, R.; Soto, J.; Ochando, L. E.; Amigo, J. M., *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8159-8170.
- 110 Yvernault, T.; Yvernault, G.; Bollinger, J. C., *C. R. Acad. Sci. Paris* **1978**, *287*, 519-521.
- 111 Coste, J.; Frerot, E.; Jouin, P., *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437-2446.
- 112 Meyer, H., *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1925**, *44*, 323-328.
- 113 Kelly, T. R.; Lang, F. R., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4623-4633.
- 114 Janecka, A.; Janecki, T.; Shan, S. M.; Bowers, C.; Folkers, K., *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2238-2241.
- 115 Stüwe, S.; *Diplomarbeit*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2002**
- 116 Gangamani, B. P.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N., *Tetrahedron* **1996**, *52*, 15017-15030.
- 117 Kubik, S., *Laborjournal*
- 118 Ge, J. J.; Li, C. Y.; Xue, G.; Mann, I. K.; Zhang, D.; Wang, S. Y.; Harris, F. W.; Cheng, S. Z. D.; Hong, S. C.; Zhuang, X. W.; Shen, Y. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5768-5776.
- 119 Sengupta, S.; Sadhukhan, S. K.; Bhattacharyya, S.; Guha, J., *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **1998**, 407-410.

Lebenslauf

- 31.01.1976 geboren in Langenfeld (Rhld.)
- 08/1982– 06/1986 Grundschule Am Brückentor, Langenfeld (Rhld.)
- 08/1986 – 06/1992 Erwerb des Realschulabschlusses (Fachoberschulreife) an der Kopernikus Realschule, Langenfeld (Rhld.)
- 08/1992 – 06/1995 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (AHR) an der Kollegschule Kikweg, heutige Lore-Lorentz-Schule, Düsseldorf.
- 10/1997– 12/2002 Studium des Fachs Chemie und Diplom an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 08/2000 – 07/2001 Studium und Forschungsaufenthalt an der University of North Carolina at Chapel Hill, gefördert durch ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austausch Diensts
- 01/2003 Beginn der Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bei Priv.-Doz. Dr. S. Kubik
- 06/2003 – 06/2006 Promotionsstipendium des Cusanuswerks, Bischöfliche Studienstiftung
- 11/2004 Fortsetzung der Dissertation bei Prof. S. Kubik an der Technischen Universität Kaiserslautern
- seit 07/2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern

