

Cyclodextrine als Wirkstoffe zur Behandlung akuter Organophosph(on)atvergiftungen

vom Fachbereich Chemie der
Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
`Doktor der Naturwissenschaften`
genehmigte Dissertation

D 386



Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 17.09.2013

vorgelegt von
Michael Zengerle
geboren in Worms
Betreuer: Prof. Dr. S. Kubik
Kaiserslautern 2013

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Stefan Kubik im Zeitraum von Dezember 2009 bis April 2013 im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern angefertigt.

Betreuer: Prof. Dr. Stefan Kubik

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Werner R. Thiel

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Kubik

2. Gutachter: Prof. Dr. Lukas J. Gooßen

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Literaturzitate kenntlich gemacht habe. Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Kaiserslautern, den

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

M. Zengerle, F. Brandhuber, C. Schneider, F. Worek, G. Reiter, S. Kubik,
"Highly efficient cyclosarin degradation mediated by a β -cyclodextrin derivative containing an oxime-derived substituent", *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, 7, 1543-1554.

F. Brandhuber, M. Zengerle, L. Porwol, O. Tenberken, H. Thiermann, F. Worek, S. Kubik, G. Reiter,
"Detoxification of tabun at physiological pH mediated by substituted β -cyclodextrin and glucose derivatives containing oxime groups", *Toxicology* **2012**, 163-171.

F. Brandhuber, M. Zengerle, L. Porwol, A. Bierwisch, M. Koller, G. Reiter, F. Worek, S. Kubik,
"Tabun scavengers based on hydroxamic acid containing cyclodextrins", *Chem. Commun.* **2013**, 49, 3425-3427.

Für meine Eltern, Schwestern
und
Jasmin

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Stefan Kubik danke ich in besonderem Maße für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die Bereitstellung des sehr interessanten und perspektivenreichen Themas. Weiterhin danke ich ihm für die umfassende Betreuung und die ausführlichen, hilfreichen und inspirierenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Franz Worek, Herrn Dr. Georg Reiter, Frau Dr. Marianne Koller, Florian Brandhuber und Anne Bierwisch vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen unseres Kooperationsprojektes.

Ich bedanke mich bei meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen im Arbeitskreis Kubik, Alexander Ganß, Michaela Klische, Arnold Leidner, Disha Mungalpara, Stefanie Noé, Christian Schneider, Fabian Sommer, Serap Yapar, Eugenia Eugenieva-Ilieva, Laura Gilberg, Michaela Hamm, Martin Krause, Johannes Pitsch und Astrid Schaly für die gute Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt weiterhin Christian Schneider und Luzian Porwol für die gute Zusammenarbeit innerhalb des gleichen Projektes sowie die vielen hilfreichen Diskussionen.

Meinen Forschungspraktikanten Michaela Hamm, Alexander Ganß, Benjamin Wolff, Christian Schneider, Eugen Risto, Agostino Biafora, Arnold Leidner und Jens Neu sowie der RISE-Austauschstudentin Dominique Kunciw danke ich für ihr Engagement und ihre präparativen Beiträge zu dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Lukas Gooßen danke ich für die Zweitkorrektur meiner Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. Werner Thiel für die Übernahme des Amtes als Prüfungsvorsitzenden.

Ein weiterer Dank gilt den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Lukas Gooßen und Prof. Dr. Hartung für die freundliche Zusammenarbeit sowie die Unterstützung mit GC-MS-Analysen. Der Arbeitsgruppe Gooßen danke ich weiterhin für die Mitbenutzung der Labormikrowelle.

Bei Frau Christiane Müller und Herrn Dr. Harald Kelm bedanke ich mich für die Aufnahme der sehr zahlreichen NMR-Spektren.

Für die Bestimmung der CHN-Analysen und Durchführung von GC-MS-Analysen danke ich den Mitarbeitern der Analytikabteilung, Herrn Dr. Uwe Bergsträßer, Frau Ruth Bergsträßer, Frau Elke Biel, Frau Birgit Dusch, Frau Jana Ellmer und Patrick Unger.

Frau Susanne Zeigner danke ich für die Unterstützung bei administrativen Aufgaben.

Den Mitarbeitern der physikalischen Chemie, Jennifer Meyer, Fabian Menges, Sandra Schäfer und Lukas Burkhart danke ich für die Aufnahme der ESI-MS-Spektren und die Unterstützung bei Problemen mit dem MALDI-Massenspektrometer.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Chemikalienlagers, Ludvik Napast, Jürgen Rahm und Frank Schröer für die Versorgung mit Chemikalien und die Reparatur von defekten Geräten.

Zuletzt danke ich meinen Freunden sowie besonders meinen Eltern und Schwestern sowie Jasmin Marschall auf deren Unterstützung ich mich während meines Studiums und meiner Promotion stets verlassen konnte.

Verwendete Abkürzungen

AChE	Acetylcholinesterase
ATP	Adenosintriphosphat
Bn-	Benzyl-
d	Dublett ($^1\text{H-NMR}$)
CDx	Cyclodextrin
CuAAC	Kupfer(I) katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
DBPO	Dibenzoylperoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DIBAL- <i>H</i>	Diisobutylaluminiumhydrid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPEphos	Bis[(2-diphenylphosphino)phenyl]ether
ESI-MS	Elektrospray Ionisation Massenspektrometrie
GA	Tabun, (<i>R,S</i>)-Dimethylphosphoramidocyanidsäureethylester
GF	Cyclosarin, (<i>R,S</i>)-Methylfluorosphonsäureisocyclohexylester
HPLC	High performance liquid chromatography
m	Multipllett ($^1\text{H-NMR}$)
MALDI-MS	Matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisationsmassenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOP	neurotoxisches Organophosph(on)at
ppm	parts per million
RP	reversed phase
2-PAM	2-Methylpyridiniumaldoxim
PXE	Paraoxon-Ethyl, Diethyl- <i>p</i> -nitrophenylphosphat
s	Singulett ($^1\text{H-NMR}$)
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TMS-	Trimethylsilyl-
TOF	Time of flight
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ts-	<i>p</i> -Toluolsulfonyl
v/v	volume to volume
VX	(<i>R,S</i>)- <i>O</i> -Ethyl- <i>S</i> -2-diisopropylamino-ethylmethylphosphonothiolat

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Organische Phosphorverbindungen	1
1.2	Cyclodextrine	5
1.3	Cyclodextrine als Enzymmimetika	8
1.4	Stand der Forschung	13
2.	Aufgabenstellung	16
2.1	Zielsetzung	16
2.2	Vorüberlegungen	17
2.2.1	Konzept der Bindung	17
2.2.2	Konzept des Screenings	17
3.	Eigene Ergebnisse	23
3.1	Überblick	23
3.2	Synthese	25
3.2.1	Synthese der modifizierten Bindungseinheiten	25
3.2.2	Synthese der für die reaktiven Gruppen benötigten Vorstufen	30
3.2.3	Synthese der Scavenger	38
3.2.4	Aufreinigung der synthetisierten Scavenger	47
3.3	Ergebnisse	50
3.3.1	Messmethoden zur Bestimmung der Abbauaktivität	50
3.3.2	Ergebnisse der Messungen	51
4.	Diskussion	52
4.1	Vorbemerkungen zum Paraoxonabbau	52
4.2	Abbau von NOPs durch Stickstoff- und Sauerstoffnucleophile	52
4.3	Abbau von NOPs durch Oxime	54
4.3.1	Abbau von GF durch Scavenger mit Oxim- und Ketoximgruppen	55
4.3.2	Hydrolyse von Tabun in wässrigem Medium	80
4.3.3	Abbau von GA durch Scavenger mit Oxim- und Ketoximgruppen	81
4.4	Abbau von NOPs durch Hydroxamsäuren	101
4.4.1	Abbau von GA durch Scavenger mit Hydroxamsäuregruppen	103
4.4.2	Abbau von VX durch Scavenger mit Hydroxamsäuren	144

5. Zusammenfassung	149
6. Ausblick	153
7. Experimentelles.....	154
7.1 Apparatives.....	154
7.2 Chemikalien	155
7.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	155
7.3.1 HPLC-Methoden	155
7.3.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur CuAAC-Reaktion	155
7.3.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Sonogashira-Hagihara-Reaktion.....	156
7.4 Synthesen	156
7.4.1 Literaturbekannte Cyclodextrinderivate.....	156
7.4.2 Im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierte Scavenger.....	156
7.4.3 Synthese der Vorstufen.....	156
7.4.4 Synthese der Scavenger	162
8. Literaturverzeichnis.....	186

1. Einleitung

1.1 Organische Phosphorverbindungen

Organische Phosphorverbindungen stellen in Form der Ester der Phosphorsäure, den Organophosphaten, eine wichtige Verbindungsklasse in der belebten Natur dar. Neben Phospholipiden, die als Grundbaustein vieler Membranen dienen, spielen Phosphorverbindungen eine entscheidende Rolle bei der Energieübertragung. In Form von Adenosintriphosphat (ATP) wird Energie gespeichert, die dann durch Hydrolyse der Triphosphatgruppe wieder an der gewünschten Stelle abgegeben werden kann.^[1] Nucleoside, die aus einer Nucleobase und Desoxyribose aufgebaut sind, werden durch Monophosphat als Teil des Rückgrats zur Desoxyribonucleinsäure (DNA) verbunden.^[2] Vitamin B6 wird nach Kondensation mit einem Phosphat in das Pyridoxal-5-phosphat überführt, das als Coenzym in Transaminierungen, Decarboxylierungen und Aldolspaltungen involviert ist.^[3] Für Organophosphonate, die Ester der Phosphonsäure, konnten dagegen lange Zeit in der belebten Natur keine Beispiele gefunden werden. Inzwischen ist jedoch von verschiedenen *Streptomyces*, einem Stamm der Actinobakterien, bekannt, dass sie phosphonsäurehaltige Verbindungen herstellen können. Das Fosfomycin zeigt wie das Fosmidomycin antibiotische Wirkung. Fosmidomycin ist weiterhin aktiv gegen den Erreger von Malaria (Abb 1.1).^[4]

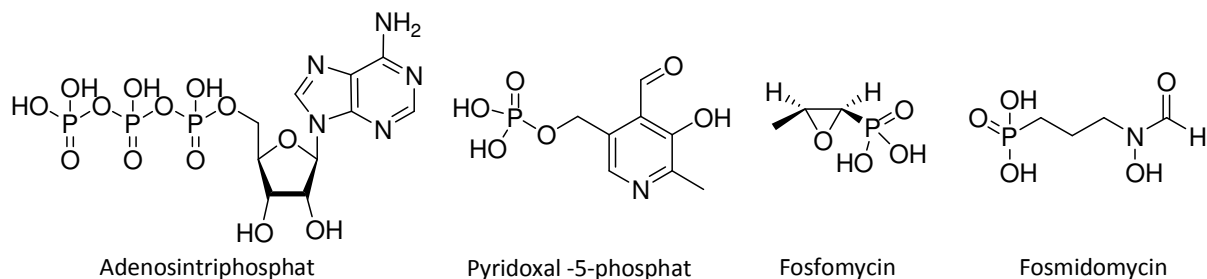


Abb. 1.1: Natürlich vorkommende Organophosph(on)ate

Die Diversität organischer Phosphorverbindungen in der belebten Natur begründete schon früh das Interesse an synthetischen Verbindungen dieser Klasse. Gerhard Schrader, angestellt bei der IG Farben in Leverkusen, wurde in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts mit der Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel betraut. Die bisher verfügbaren, wie Nicotin und Pyrethrin, waren pflanzlichen Ursprungs und mussten teuer im Ausland eingekauft werden. Erste Versuche betrafen die Derivate des Methansulfonsäurefluorids, welche jedoch bald auf Grund der hohen Persistenz in Lebensmitteln und der geringen kontaktinsektiziden Wirkung wieder aufgegeben wurden. Erst der Tausch des zentralen Heteroatoms von Schwefel zu Phosphor führte zu ersten insektiziden Stoffen, die die gewünschten Anforderungen erfüllten.^[5] Darunter war auch Paraoxon (E 600), für das eine sehr hohe Warmblütertoxizität beobachtet wurde, die jedoch durch Überführung in das schwefelhaltige Analogon Parathion (E 605) abgemildert wurde.^[6] Da es jedoch zu

zahlreichen Vergiftungen, teilweise auch mit Todesfolge kam, wurde in intensiven Untersuchungen festgestellt, dass das an sich nicht enzymhemmende E 605 im Körper zu E 600 oxygeniert wird, welches dann in der Lage ist, mit Enzymen zu reagieren.^[7] Für 2007 wurde die Zahl der Todesfälle, die auf unsachgemäße Verwendung von organophosph(on)at-basierten Insektiziden oder auf absichtliche Vergiftung damit zurückzuführen sind, auf 200 000 geschätzt.^[8]

Die hohe Toxizität von organischen Phosphorverbindungen führte schnell zu Interesse im militärischen Sektor. Noch während des 2. Weltkrieges wurden in Deutschland die chemischen Kampfstoffe Tabun (GA), Sarin (GB) und Soman (GD) entwickelt, die auf Grund ihrer Herkunft auch als G-Stoffe (German Agents) bezeichnet werden. In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden in Großbritannien die V-Stoffe (Venomous Agents) entwickelt, deren bekanntester Vertreter das VX ist.^[9]

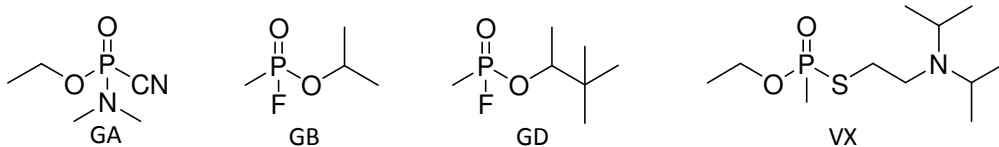


Abb. 1.2: Chemische Kampfstoffe der G- und V- Klasse

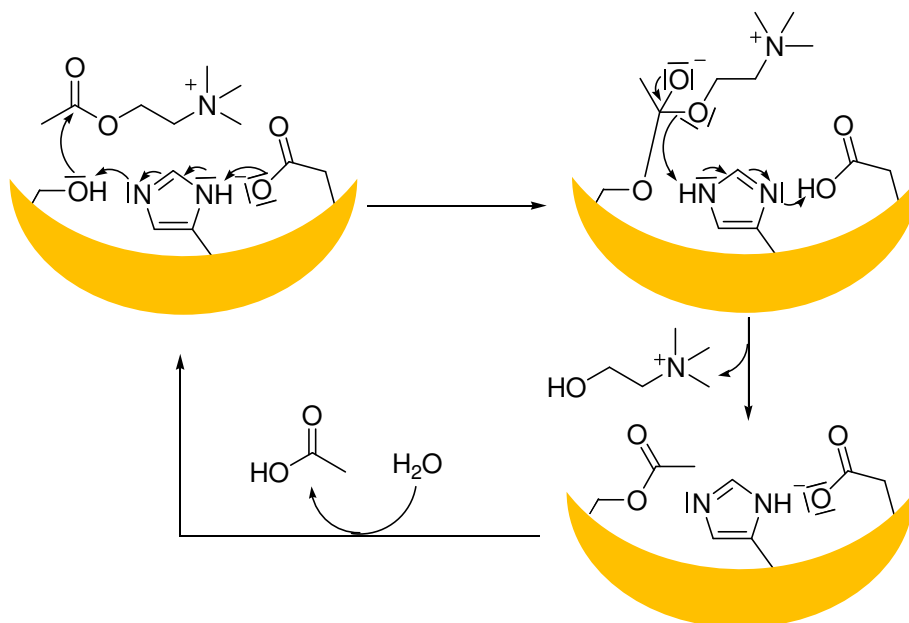
Seit der Entwicklung chemischer Kampfstoffe kam es zu vielen unbestätigten und bestätigten Einsätzen. Während des Irak-Iran-Krieg von 1980-1988 setzte der Irak Chemiewaffen gegen iranische und US-Streitkräfte ein. Mit einer Mischung chemischer Kampfstoffe richtete das irakische Militär im Jahre 1988 unter der kurdischen Minderheit im Norden des Landes ein Massaker mit tausenden Toten an. Die Zahl der durch Chemiewaffen getöteten Menschen belief sich während des Irak-Iran-Krieges auf 45 000-100 000 Menschen.^[10] Auch in Japan wurden in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts durch Giftgasanschläge der Aum-Shinrikyo-Sekte, unter anderem auf die U-Bahn in Tokyo, viele Menschen getötet und verletzt.^[11]

Die hohe Gefahr chemischer Kampfstoffe wurde schon früh erkannt, jedoch wurde ihr Verbot erst 1992 durch die Chemiewaffenkonvention vereinbart. Darin ist nach Inkraft-Treten im Jahr 1997 festgelegt, dass die Unterzeichner jegliche Entwicklung, Produktion und Anwendung chemischer Waffen ablehnen.^{[12][13]} Die "Organization for the Prohibition of Chemical Weapons" (OPCW) hielt vom 08.04.2013-19.04.2013 in Den Haag die dritte Chemical Weapon Review Conference ab. Von den 188 Unterzeichnern der Chemiewaffenkonvention nahmen 122 an der Konferenz teil. Entsprechend dem Abschlussdokument sind bis Ende März 2013 79.9 % der bekannten Vorräte an chemischen Kampfstoffen unschädlich gemacht worden. Weiterhin wurden die 8 Nichtunterzeichner der Chemiewaffenkonvention, zu denen unter anderem auch Syrien und Nordkorea zählen, dazu aufgerufen, sich dieser anzuschließen.^[14] Gerade Syrien steht im Verdacht, in dem seit Anfang 2011 andauernden Bürgerkrieg Chemiewaffen eingesetzt zu haben. Eine zunehmende Gefahr geht weiterhin von einem terroristischen Einsatz aus, da die

neurotoxischen Organophosph(on)ate aus leicht erhältlichen Edukten ohne fundiertes chemisches Wissen dargestellt werden können.

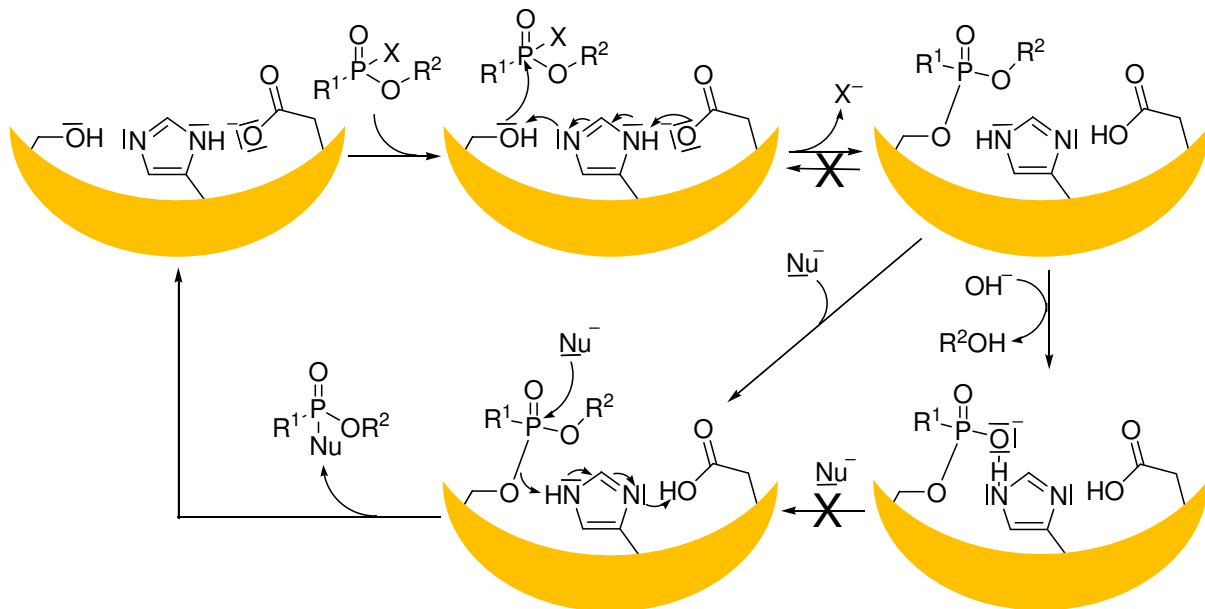
Bereits 1939 erkannte Groß, dass die Toxizität von Organophosphorverbindungen in der Hemmung der Cholinesterase begründet liegt.^[6] Spätere Untersuchungen konnten bestätigen, dass über 90 % der akuten Toxizität auf die kovalente Bindung eines Organophosph(on)ats (NOP) an das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) zurückzuführen ist.^[15]

Die Acetylcholinesterase ist in den Synapsen des zentralen und peripheren Nervensystems aufzufinden. Ihre Aufgabe besteht darin, Acetylcholin in Cholin und Acetat zu spalten. Acetylcholin ist ein Neurotransmitter, der für die Weiterleitung von Nervenimpulsen im Gehirn, in der Muskulatur und in anderen Bereichen verantwortlich ist. Dafür wird Acetylcholin in den Synapsen aus der präsynaptischen Membran freigesetzt und diffundiert dann durch den synaptischen Spalt zu den Acetylcholinrezeptoren, die an der postsynaptischen Membran zu finden sind. Wenn Acetylcholin an den Acetylcholinrezeptor gebunden ist, wird eine Erregung, beispielsweise an Muskelzellen, weitergeleitet, was zu einer Muskelanspannung führt. Um eine Überreizung des Nervensystems zu verhindern, kommt die Acetylcholinesterase zum Einsatz.^[16] Ihre katalytische Triade, bestehend aus Serin, Histidin und Glutamat, hydrolysiert den Neurotransmitter in Cholin und Acetat. Hierfür greift das deprotonierte Serin an der Esterfunktion nucleophil an. Nachdem das Proton vom Histidin auf den intermediär gebildeten Serindiester übertragen wurde, wird Cholin freigesetzt, während die Acetylgruppe an der AChE verbleibt. In einer Hydrolysereaktion wird diese Acetylgruppe unter Abspaltung von Essigsäure wieder vom Serin entfernt, wobei ein katalytischer turnover von bis zu 10^4 pro Sekunde erreicht wird (Schema 1.1).^[17]



Schema 1.1

In Gegenwart eines Organophosph(on)ats wird dieser Mechanismus gestört. Das deprotonierte Serin greift nun am Phosphoratom des NOP, welches an die Acetylcholinesterase bindet, nucleophil an. Hierbei wird eine Abgangsgruppe vom NOP abgespalten und eine Phosphyl-AChE gebildet, die strukturell dem Übergangszustand der Acetylcholinhydrolyse ähnelt. Diese Phosphyl-AChE kann prinzipiell wieder, wie oben gezeigt, hydrolysiert werden. Bei vielen Phosphyl-AChE ist diese Hydrolyse jedoch stark verlangsamt oder gar unmöglich, da die katalytische Triade entweder in eine ungünstige Konformation^{[18][19]} gebracht oder durch das kovalent gebundene NOP gegen Wasser abgeschirmt wird.^[20] Weiterhin steht die Abspaltung des Phosphorylrests in Konkurrenz zu einem sogenannten Alterungsprozess, bei dem eine weitere Gruppe am Phosph(on)at hydrolysiert wird, wodurch das Phosphoratom seine Elektrophilie verliert. Der Phosphyl-AChE-Komplex wird weiterhin durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert, was die Hydrolyse stark einschränkt.^[21]



Schema 1.2

Die aktuelle Therapie einer Vergiftung mit organischen Phosphorverbindungen besteht in der Gabe von Atropin, Diazepam und einem nucleophilen Reagenz in Form eines Oxims. Durch Atropin soll ein Atemstillstand verhindert werden. Es agiert als kompetitiver Antagonist zu Acetylcholin, indem es die muskarinartigen Acetylcholinrezeptoren reversibel blockiert und somit eine Überstimulation dieser Rezeptoren verhindert.^[22] Diazepam wird verabreicht, um auftretende Krampfanfälle zu lösen. Die muskelrelaxierende Wirkung wird weiterhin durch eine sedierende (beruhigende) Wirkung unterstützt.^[23] Von besonderer Bedeutung ist es jedoch, die kovalent gehemmte Acetylcholinesterase zu reaktivieren und somit für die Hydrolyse von Acetylcholin wieder nutzbar zu machen. Als Reaktivatoren werden in der aktuellen Therapie Oxime, also Nucleophile, eingesetzt, die wie in Schema 1.2 gezeigt, eine Abspaltung des Phosphonylrests von der Serinseitenkette der gehemmten AChE bewirken. Pralidoxim (2-PAM) war eines der ersten eingesetzten Reaktivatoren. Durch

die positive Ladung des Pyridiniumstickstoffs bindet das Oxim im aktiven Zentrum der Acetylcholinesterase und ist somit optimal für die Reaktivierung vororganisiert. Weitere Entwicklungen führten zu Bispyridiniumaldoximen, die zwei Aldoximgruppen (Obidoxim, LüH-6) oder auch weitere funktionelle Gruppen wie Amide (Asoxim, HI-6) enthalten.^[21] Im Jahr 2011 waren von den bisher in diesem Zusammenhang untersuchten Oximen nur 2-PAM und Obidoxim für den Einsatz am Menschen zugelassen und wurden für therapeutische Zwecke eingesetzt (Abb. 1.3).^[24]

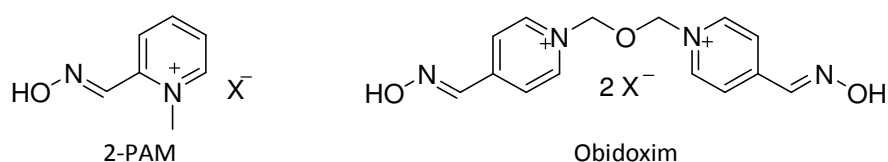


Abb. 1.3: Für die Reaktivierung von inhibierter AChE zugelassene Oxime

Diese beiden Verbindungen sowie andere bisher in der Entwicklung und Testung befindlichen Oxime zeigen hohe Wirkung gegen einzelne NOP, sind aber nicht universell einsetzbar.^{[25][26]} Weitere Limitierungen stellen die vorhandenen Pyridiniumgruppen in diesen Verbindungen dar, die auf Grund ihrer positiven Ladung die Überquerung der Blut-Hirn-Schranke erschweren.^{[27][28]} Sterische Effekte in der Bindungstasche der AChE sorgen weiterhin dafür, dass ein Oxim nicht optimal am Phosphoratom des NOP angreifen kann, wodurch die Reaktivierung langsamer abläuft als die Phosphylierung.^[9] Kommt es weiterhin zu einer Alterung gehemmter AChE, ist eine Reaktivierung auch mit Oximen nicht mehr möglich.^[29]

1.2 Cyclodextrine

Cyclodextrine, cyclische Oligosaccharide, wurden zum ersten Mal im späten 19. Jahrhundert von Villiers durch Abbau von Stärke mit dem Bakterium *Bacillus Macerans* erhalten.^[30] Bis in die 70er Jahre hielt sich der Verdacht, dass Cyclodextrine giftig seien. Seitdem diese Annahme klar widerlegt wurde, erfreuen sich Cyclodextrine immer größerem Interesse.^[31] Aus dem Bakterium *Bacillus Macerans* wurde die Cyclodextringlucosyltransferase (CGTase) extrahiert, wodurch auch eine großtechnische Produktion von Cyclodextrinen möglich wurde.^[32] Viele Anwendungen, wie beispielsweise die Entfernung von Bitterstoffen aus Fruchtsäften oder Cholesterin aus Milch aber auch der Einsatz als Detergenz in Wasch- und Spülmitteln wurden somit möglich.^{[33][34]} Ein modifiziertes γ -Cyclodextrinderivat mit acht Carbonsäuregruppen ist zudem mittlerweile ein zugelassenes Medikament, um nach einer Narkose eine neuromuskuläre Blockade durch steroidartige Muskelrelaxantien, wie z. B. Rocuronium, aufzuheben.^[35]

Strukturell handelt es sich bei Cyclodextrinen um cyclische Oligosaccharide aus α -1,4-glykosidisch verbundenen D-Glucose-Einheiten mit einer Ringgröße von 6, 7 oder 8 Untereinheiten (α -, β - und γ -Cyclodextrin).^[36] α -Cyclodextrin verfügt mit einem Hohlraumdurchmesser von 4.7 Å über die kleinste Kavität, die dann über β -Cyclodextrin mit 6 Å auf 7.5 Å für γ -Cyclodextrin zunimmt. Die Höhe der Ringe ist mit 7.9 Å für alle

Cyclodextrine identisch.^[37] Die Glucoseeinheiten nehmen eine 4C_1 -Sesselkonformation ein, welche die zylindrische, leicht konische Form der Moleküle bedingt. Die sekundären OH-Gruppen (C^2 -OH und C^3 -OH) bilden den weiteren Rand (upper rim), während die primären Hydroxygruppen (C^6 -OH) am schmalen Rand (lower rim) angeordnet sind (Abb. 1.4).

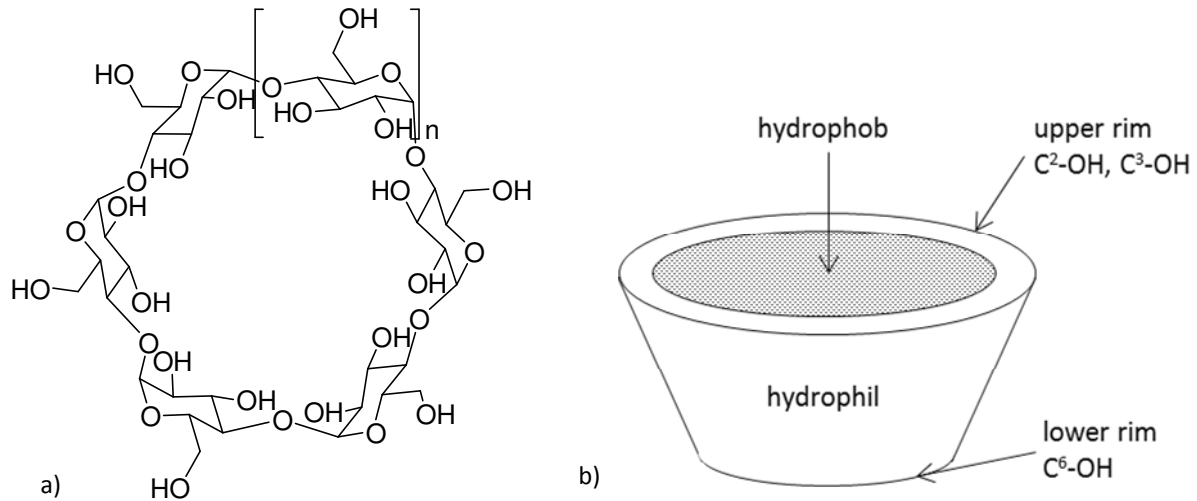


Abb. 1.4: a) α -Cyclodextrin ($n=1$), β -Cyclodextrin ($n=2$), γ -Cyclodextrin ($n=3$), b) schematische Darstellung eines Cyclodextrinmoleküls

Die sekundären OH-Gruppen entlang der Cyclodextrinringe sind so positioniert, dass sie untereinander ein Wasserstoffbrückennetzwerk ausbilden können. Im Falle von β -Cyclodextrin sind auf Grund der relativen Orientierung der Glucoseeinheiten in dem Ring alle sekundären Hydroxygruppen darin involviert, sodass hier die zylindrische Form des Moleküls am besten stabilisiert ist. Die damit verbundene Starrheit des β -Cyclodextrinrings erklärt auch die niedrigere Wasserlöslichkeit von β -Cyclodextrin, verglichen mit α - und γ -Cyclodextrin. Die primären OH-Gruppen sind bei allen Cyclodextrinderivaten frei drehbar, wodurch sich der effektive Durchmesser am lower rim reduziert.^[30] Alle Hydroxygruppen des Cyclodextrins sind nach außen gerichtet, das heißt, das Molekül ist exohydrophil. Die innere Oberfläche des Hohlraums hingegen ist durch die Anwesenheit von C-H und C-O Bindungen geprägt, woraus eine elektronenreiche, aber im Vergleich zum umgebenden wässrigen Milieu hydrophobe Umgebung resultiert. Besser bezeichnet man das Innere der Kavität jedoch als „semipolar“, da ihre Polarität in etwa der von Methanol und Ethanol entspricht.^[38] Als Folge der ungleichen Verteilung der OH-Gruppen zwischen upper und lower rim besitzen Cyclodextrine ein relativ starkes Dipolmoment von 5 D.^[32] Kombiniert man die hohe Anzahl an Hydroxygruppen und das Dipolmoment erklärt sich die Löslichkeit von Cyclodextrinen in polaren Lösungsmitteln, wie Wasser und DMF.^[39]

Die hydrophile Oberfläche und die hydrophobe Kavität machen Cyclodextrine zu einem optimalen Wirt, um mit unpolaren Gästen in wässrigem Medium Einschlusskomplexe zu bilden. Als Triebkraft für die Komplexbildung in Wasser können mehrere Effekte verantwortlich sein. In der Literatur wird die Freisetzung von „enthalpiereichem“^[40] oder „aktiviertem“^[41] Wasser als Triebkraft diskutiert. Die in der Kavität gebundenen

Wassermoleküle können nur wenige Wasserstoffbrücken ausbilden, wodurch sie sich in einem energetisch ungünstigen Zustand befinden. Werden diese Wassermoleküle durch Einlagerung eines Gastes verdrängt, werden sie vollständig im umgebenden Medium hydratisiert, was zu einem Enthalpiegewinn führt. Weiterhin sind die Wassermoleküle in der Kavität hoch organisiert, was entropisch ungünstig ist.^[41] Außerdem werden hydrophobe Effekte als unterstützend für die Ausbildung eines Wirt-Gast-Komplexes diskutiert. Hier wird davon ausgegangen, dass die Hydrathülle, die ein unpolares Molekül im Wasser umgibt, geordnet ist. Findet eine Einlagerung in die Kavität des Cyclodextrins statt, werden die Wassermoleküle aus der Hydrathülle freigesetzt, was zu einem Gewinn an Freiheitsgraden und damit einhergehend zu einer Zunahme der Unordnung und somit einer Entropieerhöhung führt.

Ein Teil der Komplexstabilisierungsenergie ist zudem meist auf van-der-Waals-Wechselwirkungen zurückzuführen. Dies trifft besonders dann zu, wenn ein Gast optimal in den Hohlraum passt.^[40] In Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Energiegewinn durch van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der Ausfüllung der Kavität durch den Gast korreliert.^{[42][43]} Die glycosidischen Sauerstoffatome, die an der inneren Oberfläche zu finden sind, sind für die Polarisierbarkeit der Kavität mitverantwortlich. Dadurch sind neben van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Gast und Kavität auch dipolinduzierte Wirt-Gast-Wechselwirkungen möglich.^[44] Auch das Dipolmoment des Cyclodextrins kann zur Bindung und Orientierung eines Gastes in der Kavität beitragen. Eine effiziente Wechselwirkung tritt auf, wenn sich der Gast im Innern der Kavität mit seinem Dipolmoment antiparallel zu dem des Cyclodextrins anordnen kann.^[45] Zusammenfassend können die angesprochenen Effekte durch folgende Gleichung beschrieben werden (Gleichung 1).

$$\Delta G_{\text{Komplex}} = \Delta G_{\text{Wirt-Gast}} + \Delta G_{\text{Solvatation}} + \Delta G_{\text{hydrophob}} \quad (1)$$

Nach Gl. (1) setzt sich die freie Komplexbildungsenthalpie ($\Delta G_{\text{Komplex}}$) aus der freien Enthalpie der Wirt-Gast-Wechselwirkung ($\Delta G_{\text{Wirt-Gast}}$), der freien Solvatationsenthalpie ($\Delta G_{\text{Solvatation}}$) und der freien Enthalpie der hydrophoben Effekte ($\Delta G_{\text{hydrophob}}$) zusammen.^[40] Zu beachten ist hierbei, dass sich die diskutierten Effekte gegenseitig beeinflussen und somit Energiebeiträge zur freien Komplexbildungsenthalpie auch in mehreren Termen der Gleichung auftauchen können.

Für viele Cyclodextrinkomplexe wurden inzwischen die freie Komplexbildungsenthalpien bzw. die Komplexbindungskonstanten K_a in wässrigem Medium bestimmt. Aus den Messwerten, die mittels verschiedener Methoden, wie beispielsweise Kalorimetrie^[46] oder Fluoreszenzspektroskopie,^[47] ermittelt wurden, ergeben sich für die unterschiedlichen Cyclodextrine bevorzugte Gäste. α -Cyclodextrin bindet beispielsweise C_6 -aromatische Verbindungen mit Bindungskonstanten im Bereich von 3000 mol^{-1} . β -Cyclodextrin erreicht bei sterisch anspruchsvolleren Gästen, wie Adamantan, Werte um 4000 mol^{-1} . Für das größte der drei hier aufgeführten Cyclodextrine, das γ -Cyclodextrin, eignen sich größere Aromaten, wie Pyren ($K_a = 3000 \text{ mol}^{-1}$) besonders gut, um Einschlusskomplexe zu bilden.^[48]

Nach Bildung eines Einschlusskomplexes kann es zu einer Reaktion des eingelagerten Gastes mit OH-Gruppen entlang des Cyclodextrinrings oder mit zusätzlichen Substituenten am Ring kommen. Dabei ist zu beachten, dass eine Reaktion zwischen zwei Substraten in Lösung eine Reaktion 2. Ordnung ist, deren Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration der beiden Edukte abhängt. Bei einer Reaktion in einem Einschlusskomplex handelt es sich aber um eine unimolekulare Reaktion. Nimmt man an, dass die Konzentration des Einschlusskomplexes konstant bleibt, also genauso viel Einschlusskomplex gebildet wird, wie durch Dissoziation in die Edukte oder durch Weiterreaktion zum Produkt abgebaut wird, folgt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit letztlich von der Produktbildungsgeschwindigkeit abhängt. So ist es möglich, die Kinetik des hier beschriebenen Falls durch eine Michaelis Menten Kinetik zu beschreiben (Abb. 1.5).^[49]

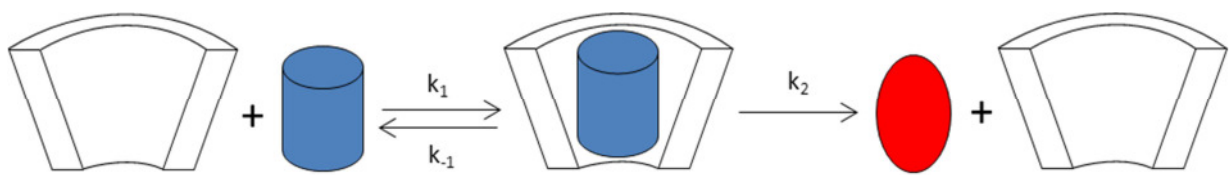


Abb. 1.5: Bildung eines Einschlusskomplexes im Gleichgewicht aus zwei Substraten, der in einer irreversiblen Reaktion zu einem Produkt weiterreagiert.

Michaelis Menten Kinetiken werden typischerweise für Enzyme angewandt. Auf Grund ihres analogen Verhaltens können katalytisch aktive Cyclodextrine und deren Derivate als Mimetika von Enzymen betrachtet werden, für die die gleichen kinetischen Prinzipien gelten.^{[37][50]}

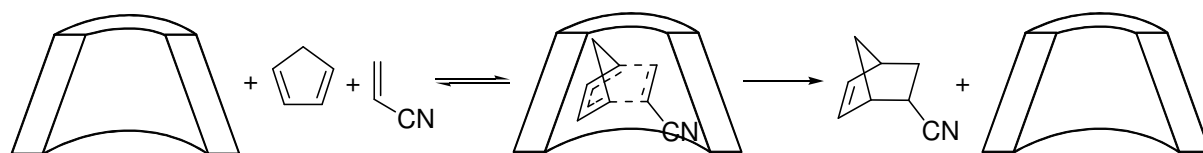
1.3 Cyclodextrine als Enzymmimetika

Unsubstituierte Cyclodextrine

Die Bindungseigenschaften von Cyclodextrinen für unpolare Gäste in wässrigem Medium machen jene zu einem optimalen Ausgangspunkt für die Darstellung von Enzymmimetika. Der Cyclodextrinhohlraum soll hierbei die hydrophobe Bindungstasche eines Enzyms imitieren. Daneben können die Eigenschaften von Cyclodextrinen auch für andere Anwendungen, wie die Erhöhung der Löslichkeit von Metallionen,^[51] die Steuerung der Selektivität durch Blockade eines reaktiven Zentrums^[52] oder die Phasentransferkatalyse^[53] dienen. Diese Aspekte sollen hier jedoch nicht betrachtet werden.

Ein typisches Beispiel für den Einsatz von Cyclodextrinen als Enzymmimetika ist ihre Wirkung auf Diels-Alder-Reaktionen, z.B. die Umsetzung von Cyclopentadien mit Acrylnitril. In einem unpolaren Lösungsmittel, wie Isooktan, läuft die Reaktion langsam ab. Bei einem Wechsel des Lösungsmittels zu Wasser, in dem beide Reaktanden nicht löslich sind, kann eine Beschleunigung der Reaktion um das 30-fache beobachtet werden. Als Grund hierfür wird die hohe Konzentration der Reaktanden in der aus den Edukten bestehenden organischen Phase der gebildeten Dispersion gesehen. Setzt man der wässrigen Reaktionslösung zudem β -Cyclodextrin zu, läuft die Reaktion noch einmal 10-mal schneller ab.^[54] Dieser Befund lässt

sich damit erklären, dass die beiden Reaktanden in der hydrophoben Kavität des Cyclodextrins in einer Weise vororganisiert werden, dass eine effiziente Cycloaddition möglich wird. Durch die Größe der Kavität ist weiterhin vorgegeben, dass nur ein Dien und ein Dienophil darin Platz finden, wodurch potentielle Nebenreaktionen, wie die Dimerisierung von Cyclopentadien, unterdrückt werden (Schema 1.3).

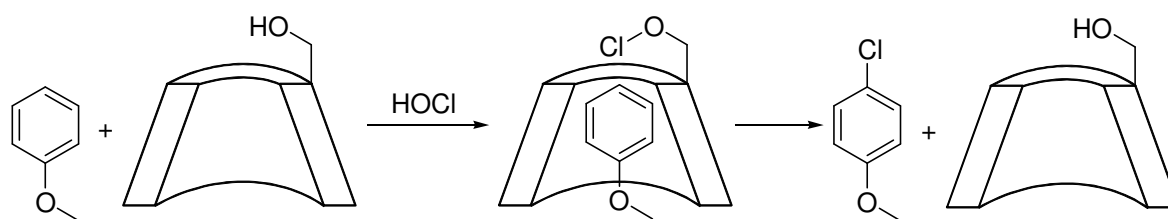


Schema 1.3

Setzt man der Reaktion α -Cyclodextrin zu, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber der Reaktion in Wasser ab. α -Cyclodextrin inhibiert die Diels-Alder-Reaktion, da es nur ein Cyclopentadienmolekül binden kann und dieses somit vor einer Reaktion mit Acrylnitril schützt.^[54] Schneider *et al.* konnte zeigen, dass man durch Umsetzung von Cyclopentadien mit Fumar- und Maleinsäurederivaten in Gegenwart von β -Cyclodextrin auch Einfluss auf die Diastereo- und Enantioselektivität der Diels-Alder-Reaktion nehmen kann.^[55]

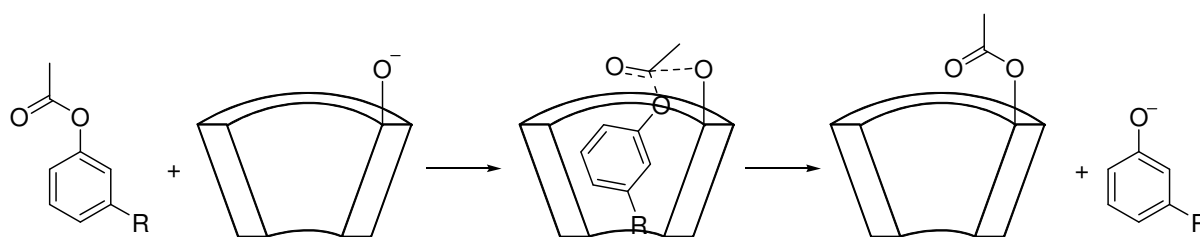
Während bei den Diels-Alder-Reaktionen das Cyclodextrin für die Organisation der Reaktanden verantwortlich ist und nicht aktiv an der Reaktion teilnimmt, können in anderen Fällen Cyclodextrinmoleküle Reaktionen entweder katalytisch oder stöchiometrisch beeinflussen.^[56]

Ein Beispiel hierfür ist die Chlorierung von Anisol mit hypochloriger Säure in wässrigem Medium. Das Produktgemisch in Abwesenheit von α -Cyclodextrin setzt sich aus 60 % *para*-Chloranisol und 40 % *ortho*-Chloranisol zusammen. In Anwesenheit von α -Cyclodextrin ist die Bildung des *ortho*-Produktes nahezu komplett unterdrückt.^[57] Dieser Effekt ist zu beobachten, obwohl photometrische Methoden belegen, dass nur 72 % des Anisols im Komplex vorliegt. Aus kinetischen Untersuchungen resultierte, dass der Einfluss von α -Cyclodextrin auf die Selektivität der Reaktion durch eine 5-fache Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber der Reaktion in reinem wässrigem Medium erklärt werden kann. Als wahrscheinlichster Mechanismus ist die Bildung eines Alkylhypochlorids aus hypochloriger Säure und einer Hydroxygruppe des Cyclodextrins anzusehen. Dieses Alkylhypochlorid überträgt dann in einer Reaktion pseudo-erster Ordnung das Chloratom auf den komplexierten Aromaten. Die *para*-Position ist im Komplex in räumlicher Nähe zu den OH-Gruppen des Cyclodextrins ausgerichtet, sodass eine Übertragung nur in dieser Position stattfindet (Schema 1.4). Ob das intermediäre Alkylhypochlorid aus einer primären^[58] oder sekundären^[59] Hydroxygruppe gebildet wird, ist nicht abschließend geklärt.



Schema 1.4

Hydrolysen von Phenolestern werden ebenfalls in Gegenwart von Cyclodextrinen beschleunigt. Dieser Prozess ist jedoch nicht katalytisch, da der Acylteil des Esters auf das Cyclodextrin übertragen wird. Bender und Mitarbeiter führten Untersuchungen zur Hydrolyse von unterschiedlich substituierten Phenylacetaten bei $\text{pH} = 10.6$ durch. Durch Methylierungen unterschiedlicher Hydroxygruppen am Cyclodextrin konnte gezeigt werden, dass die sekundären 2-OH-Gruppen für die Hydrolyse verantwortlich sind.^[60] Nach Deprotonierung greifen sie nucleophil am Carboxylatkohlenstoff des Esters an und bilden ein tetragonales Zwischenprodukt. Im nächsten Schritt wird der Ester gespalten, woraus das freie Phenolat hervorgeht und die Acylgruppe auf eine sekundäre OH-Gruppe des Cyclodextrins übergeht (Schema 1.5).



Schema 1.5

Die Hydrolyse von unterschiedlich substituierten Phenylacetaten wird ebenfalls durch die Anwesenheit von Cyclodextrinen beschleunigt. Neben einer bis zu 250-fach schnelleren Hydrolyse gegenüber einer cyclodextrinfreien Lösung bei gleichem pH-Wert kann ebenfalls beobachtet werden, dass Regioisomere unterschiedlich schnell abgebaut werden. Im Fall von α - und β -Cyclodextrin ist zu beobachten, dass die Hydrolyse von *meta*-substituierten Derivaten bis zu 120-mal schneller sein kann als die der strukturisomeren *ortho*- oder *para*-Derivate. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Falle der *meta*-substituierten Derivate das Carboxylatkohlenstoffatom optimal zu den angreifenden Alkoholatgruppen orientiert ist.^[61]

Für die Reaktion unter neutralen Bedingungen werden zwei mögliche Mechanismen diskutiert. Theoretische Rechnungen legen nahe, dass in wässrigem Medium eine stufenweise Hydrolyse des Esters mit einem Diol als Zwischenprodukt wahrscheinlich ist. Ist in der Reaktionslösung Cyclodextrin vorhanden, wandelt sich die Reaktion von einem mehrstufigen Prozess zu einem konzertierten Mechanismus, bei dem neben einem Wassermolekül auch eine OH-Gruppe des Cyclodextrins einen 6-gliedrigen Übergangszustand mit dem Ester ausbilden.^[62]

Substituierte Cyclodextrine

Durch Einführung von Substituenten entlang des Hohlraums kann die Bandbreite der Reaktionen, die von Cyclodextrinen vermittelt werden können, deutlich vergrößert werden. Geeignete Substituenten können beispielsweise Brønsted-saure oder –basische bzw. Lewis-saure Reaktionszentren enthalten, die man auch in den aktiven Zentren von Enzymen findet.^[63]

Bols und Mitarbeiter beschrieben beispielsweise ein Modell für ein Glycosidase-Enzym. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse der acetalischen Bindung in Glycosiden. Dazu sind im aktiven Zentrum zwei Carbonsäureeinheiten zu finden. Während die eine als Protonendonator fungiert, liegt die andere als Carboxylat vor und übernimmt ein Proton von einem Wassermolekül, das dann nucleophil am anomeren Zentrum angreift.^[64] Die Arbeitsgruppe wählte unterschiedliche Wege, um dieses Enzym zu imitieren. Als Modellsubstrate wurden unterschiedliche *para*-Nitrophenylglycoside gewählt, deren *para*-Nitrophenolrest in der Kavität der untersuchten α - und β -Cyclodextrinderivate gebunden werden kann, wodurch das anomere Zentrum der Glucoseeinheit in räumlicher Nähe der funktionellen Gruppen am Cyclodextrin angeordnet wird. Verwendet man Cyclodextrine, die mit zwei Cyanhydrin-einheiten funktionalisiert sind, ist eine Beschleunigung der Glycosidhydrolyse um den Faktor 6000 gegenüber der Reaktion in Abwesenheit des Cyclodextrins zu beobachten.^[65] Mechanistische Untersuchungen legen nahe, dass die Reaktion von den aciden Hydroxygruppen des Cyanhydrins katalysiert wird (Abb 1.6).^[66]

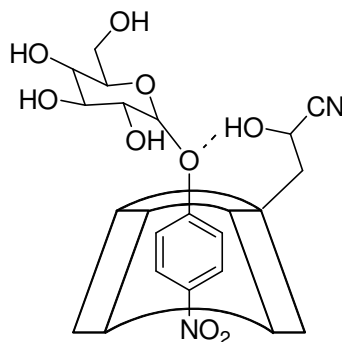


Abb. 1.6: Wechselwirkung zwischen dem eingelagerten Gast und dem Cyclodextrinderivat^[66]

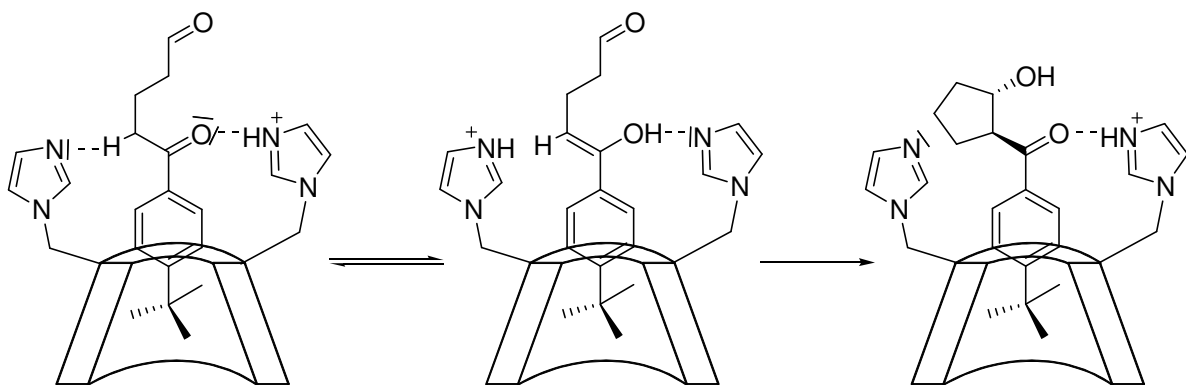
Um sich dem natürlichen System weiter anzunähern, wurden außerdem Cyclodextrinderivate mit Carbonsäureuntereinheiten dargestellt.^{[67][68]} Diese Systeme erreichten jedoch nicht die Effizienz der Cyanhydrinsysteme. Keines der untersuchten Mimetika konnte außerdem die Beschleunigungsraten der Glycosidase, die im Bereich von 10^{17} liegen, erreichen.^[64]

Viele Enzyme enthalten in ihrem aktiven Zentrum ein oder mehrere Metallionen. Ein Beispiel für ein Mimetikum für ein Metalloprotein auf Basis eines Cyclodextrinderivats beschrieben Breslow *et al.* Dieses α -Cyclodextrin enthält als Substituent einen Ni^{2+} -Komplex aus Pyridin-2,5-dicarbonsäure und Pyridin-2-aldoxim und ist in der Lage, *para*-Nitrophenylacetat katalytisch zu spalten.^[69] Andere Arbeiten beschäftigten sich mit der Entwicklung von

Mimetika für Cytochrom P-450, welche jedoch Mangan anstatt des natürlich vorliegenden Eisens als katalytisch aktive Metallzentren enthalten. Es handelt sich um ein manganhaltiges Porphyrin, das 4 β -Cyclodextrinringe trägt. Die Verbindung kann Steroide regioselektiv hydroxylieren.^[70]

Die [FeFe]-H₂ase ist ein Enzym mit einem Fe^I-Fe^{II}-Dieisenkern, das Wasserstoff mit derselben Effizienz herstellen kann wie edelmetallhaltige Brennstoffzellen. Singleton *et al.* haben das reaktive Zentrum aus zwei Eisenkernen, die jeweils drei Carbonyleinheiten tragen und über ein aromatisches Dithiol verbrückt sind, nachgebaut und in zwei β -Cyclodextrine eingelagert. Durch Ausbildung des Einschusskomplexes ändern sich die Torsionswinkel zwischen den CO-Liganden sowie die redox- und elektrokatalytischen Eigenschaften gegenüber dem freien Dieisenkomplex. In weiteren Arbeiten sollen durch strukturelle Modifikationen Katalysatoren entwickelt werden, die für die H⁺-Reduktion oder H₂-Oxidation verwendet werden können.^[71]

β -Cyclodextrine, die eine oder mehrere Imidazoleinheiten tragen, wurden bezüglich ihres Einflusses auf Enolisierungsreaktionen untersucht. Als Substrat kam hierbei *para-tert*-Butylacetophenon zum Einsatz. Alle Imidazolderivate zeigen eine höhere Beschleunigung auf die Enolisierung des Substrats als natives β -Cyclodextrin. Dabei ist ein Bis(imidazol), bei dem die Imidazoleinheiten durch zwei unfunktionalisierte Glucoseeinheiten getrennt sind, mit Abstand am aktivsten. In diesem Fall sind die beiden Imidazoleinheiten optimal zu den relevanten Positionen im eingelagerten Ketoaldehyd orientiert.^[72] Nach Bildung eines Einschusskomplexes aus dem Ketoaldehyd mit dem Cyclodextrin wird in einem Protonierungs-/Deprotonierungsmechanismus das Gleichgewicht auf die Seite des Enols verschoben, welches dann unter Ausbildung eines Aldols unter Beteiligung des terminalen Aldehydkohlenstoffatoms cyclisiert (Schema 1.6). Diese Reaktion läuft in einem wässrigen Phosphatpuffer bei pH 7 in der Gegenwart des Bis(imidazols) 50-mal schneller ab, als in Gegenwart von nativem β -Cyclodextrin.^[73]



Schema 1.6

1.4 Stand der Forschung

Neben Aldolreaktionen können von β -Cyclodextrinen, die zwei Imidazoleinheiten tragen, auch weitere Reaktionen, wie zum Beispiel die Hydrolyse eines cyclischen Phosphatesters katalysiert werden.^[63] β - oder γ -Cyclodextrin mit den beiden Imidazolresten am engeren Rand der Kavität an benachbarten Glucoseuntereinheiten, erwiesen sich für diese Esterspaltung am effizientesten. Das cyclische Phosphat von 4-*tert*-Butylcatechol lagert sich in wässrigem Medium mit dem *tert*-Butylrest so in die Cyclodextrinkavität ein, dass die Phosphatgruppe in räumlicher Nähe zu den Imidazolresten positioniert ist. Wie in der in Schema 1.6 gezeigten Aldolreaktion liegt ein Imidzol protoniert vor, sodass eine Übertragung dieses Protons auf den Phosphatester möglich ist. In einem konzertierten Mechanismus übernimmt das andere Imidazol ein Proton von einem Wassermolekül und das gebildete Hydroxidion greift nucleophil am Phosphoratom an wodurch der cyclische Phosphatester letztlich gespalten wird (Abb. 1.7). Welche seiner beiden P-O-Bindungen gespalten wird, wird ebenfalls durch das Cyclodextrin gesteuert. Bei dem entsprechenden β -Cyclodextrinderivat wird nahezu ausschließlich das Produkt mit der freien OH-Gruppe in *para*-Position zu der *tert*-Butylgruppe gebildet. In diesem Fall wird die negativ geladene Phosphatgruppe durch das Imidazolium stabilisiert. In Gegenwart des γ -Cyclodextrinderivats wird neben demselben Produkt auch etwa 20% des entsprechenden Regioisomers mit OH-Gruppe in *meta*-Position zur *tert*-Butylgruppe gebildet, was durch eine etwas schlechtere Passgenauigkeit des Substrats in der größeren Kavität erklärt wird. Führt man die Hydrolyse unter basischen Bedingungen ohne Cyclodextrine durch, werden die beiden Hydrolyseprodukte im Verhältnis 1:1 erhalten.^[74]

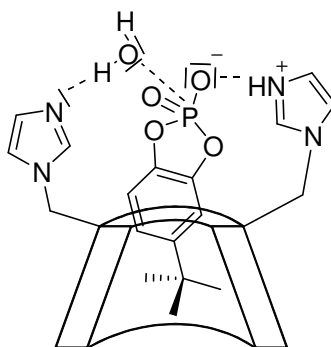


Abb. 1.7: Übergangszustand für die Cyclodextrin-bis(imidazol) vermittelte Spaltung eines cyclischen Phosphatesters

Auch die Hydrolyse von neurotoxischen Organophosph(on)aten durch Cyclodextrine wurde bereits untersucht. In den 1970-er Jahren wurden von van Hooijdonk *et al.* erste Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt.^[75] Bei einem pH-Wert von 9 konnte durch Zusatz von α -Cyclodextrin die Reaktionsgeschwindigkeit des Abbaus von Sarin um das bis zu 100-fache beschleunigt werden. Als Produkt entstand hierbei ein phosphonyliertes α -Cyclodextrin. Sarin, das in zwei Enantiomeren vorliegt, wird von der Cyclodextrinkavität gebunden. Vergleicht man die Dissoziationskonstanten für die Cyclodextrin-Sarin-Komplexe kann kein signifikanter Unterschied für die beiden Sarin-Enantiomere festgestellt werden. In

Reaktionslösungen wurden jedoch zwei unterschiedlich schnelle Prozesse beobachtet, die auf die unterschiedlich schnelle Hydrolyse der beiden Sarin-Enantiomere zurückzuführen sind. Da die Komplexe der beiden Enantiomere die gleiche Stabilität haben, kann der Unterschied in der Hydrolysegeschwindigkeit nicht damit zusammenhängen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die beiden Sarinenantiomere in ihren jeweiligen Cyclodextrinkomplexen unterschiedlich orientiert sind.^[76] Die chirale Induktion des Cyclodextrinrings sorgt hierbei dafür, dass das (*R*)-(-)-Sarin optimaler zu einer deprotonierten C²-OH-Gruppe ausgerichtet ist, sodass es wesentlich schneller als das (*S*)-(+)-Enantiomer abgebaut wird. Da das (*R*)-(-)-Sarin eine 4000-fach höhere Inhibition der AChE zeigt, wird in Gegenwart des Cyclodextrins also auch das stärker toxische Enantiomere abgebaut.^[77] Neben Sarin wurde auch die Hydrolyse von Soman, Tabun und VX in Gegenwart von Cyclodextrinen untersucht. Während keinerlei Einfluss auf die Hydrolyse von Tabun und VX festgestellt werden konnte, wurde beobachtet, dass β -Cyclodextrin einen positiven Einfluss auf die Hydrolyse von Soman hat. Auch bei physiologischem pH-Wert und sogar in Blutplasma konnte eine Desaktivierung von Soman nachgewiesen werden. Dabei entsteht ein phosphonyliertes Cyclodextrin. Der sterische Anspruch des ersten Somanrestes am Cyclodextrin lässt jedoch nur die kovalente Bindung eines weiteren Somanmoleküls zu. Die darauf folgende Hydrolyse der dabei entstehenden phosphonylierten Cyclodextrine ist sehr langsam, sodass nicht von einem katalytischen Prozess gesprochen werden kann.^[78]

Die an der Hydrolyse von Phenolestern beteiligten sekundären OH-Gruppen von Cyclodextrinen weisen einen pK_s -Wert von ca. 12 auf.^[79] Um die Hydrolyseaktivität gegenüber neurotoxischen Organophosph(on)aten unter physiologischen Bedingungen zu erhöhen, wurden nucleophile Gruppen in Cyclodextrine eingeführt, deren pK_s -Wert näher am physiologischen pH-Wert liegt. Erste Arbeiten auf diesem Gebiet konzentrierten sich in diesem Zusammenhang auf die Einführung von 2-Iodosobenzoessäure (IBA) am sekundären Rand des β -Cyclodextrins (Abb. 1.8).

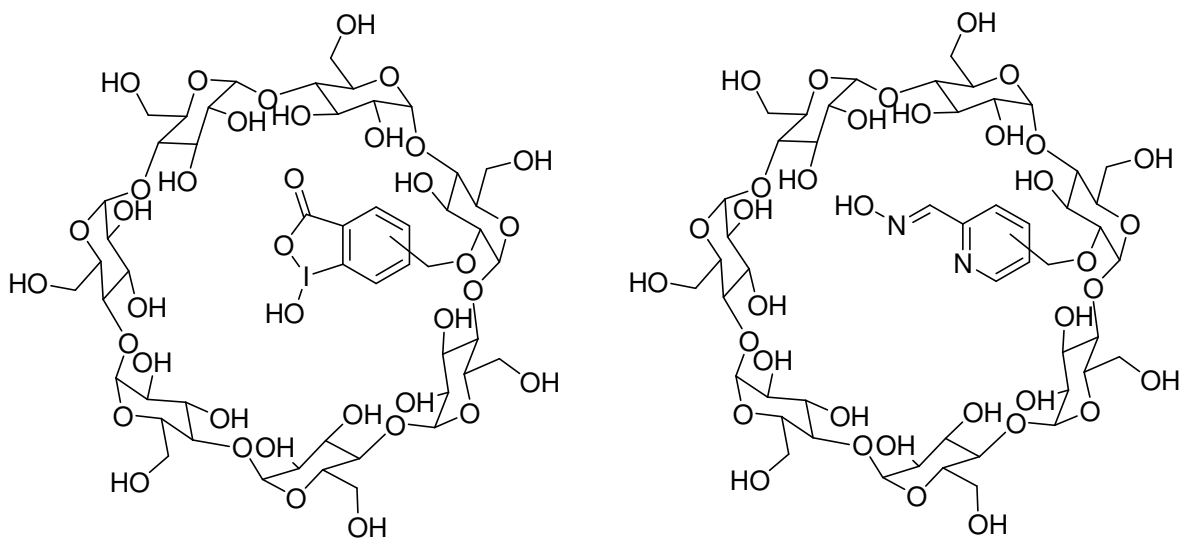


Abb. 1.8: β -Cyclodextrin, modifiziert mit IBA (links) oder Pyridiniumoximen (rechts)

Diese Verbindungen sind in der Lage, Soman mit einer Halbwertszeit von 20 min zu hydrolysieren.^[80] Auch eine geringe Aktivität auf den Abbau von Paraoxon ist beschrieben.^[81] Das Problem hierbei ist jedoch, dass die Abgangsgruppe, *para*-Nitrophenolat, in der Kavität des β -Cyclodextrins gebunden bleibt und somit eine Produktinhibition auftritt. Cyclosarin (GF), ein Struktur analogon von Sarin, bei dem die Isopropylgruppe gegen eine Cyclohexylgruppe getauscht wurde, wird unter physiologischen Bedingungen nur langsam hydrolysiert. In Gegenwart eines IBA-funktionalisierten β -Cyclodextrins konnte nach 10 min kein Cyclosarin mehr nachgewiesen werden. Der beschleunigende Effekt wurde von den Autoren auf die Bindung von GF in der Cyclodextrinkavität zurückgeführt.^[82]

Auch β -Cyclodextrine, die Oximgruppen tragen, sind als Scavenger für Organophosph(on)ate untersucht worden (Abb. 1.8). Hierbei zeigte sich, dass die Verknüpfungsstelle zwischen Pyridinoxim und β -Cyclodextrin von Bedeutung ist. Diese Verbindungen konnten GF innerhalb von 20 min komplett hydrolysieren und zeigten darüber hinaus eine Enantioselektivität beim GF Abbau: (-)-GF wurde schneller abgebaut als das entsprechende (+)-Enantiomer.^[83]

Neben Cyclodextrinen beschäftigen sich aktuelle Arbeiten mit dem Abbau von neurotoxischen Organophosph(on)aten (NOP) durch Butyrylcholinesterase^[84] und Phosphotriesterase.^[85] Diese enzymbasierten Scavenger werden an dieser Stelle nicht näher vorgestellt.

Für den Abbau von Kampfstoffen existieren außerdem zahlreiche Verfahren, wie die Verbrennung oder die chemische Zersetzung durch Prozesse wie basische Hydrolyse, Oxidation durch Hypochlorid oder den Einsatz von metallkatalysierten Reaktionen.^[86] Diese Verfahren sind für die Entsorgung und Vernichtung großer Lagermengen chemischer Kampfstoffe einsetzbar, eignen sich aber nicht für die Behandlung von Vergiftungen mit Organophosph(on)aten.

2. Aufgabenstellung

2.1 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen Cyclodextrinderivate entwickelt werden, die sich zur Behandlung von akuten Organophosph(on)atvergiftungen eignen. Bisherige Arbeiten auf diesem Gebiet zeigten, dass Cyclodextrine oder substituierte Cyclodextrinderivate den Abbau von NOPs beschleunigen können. Während bei älteren Arbeiten ein Abbau in basischem Milieu untersucht wurde,^{[75]-[77]} sind geeignet substituierte Cyclodextrinderivate auch in der Lage, einen effizienten Abbau von NOPs bei pH 7.4 und 37 °C zu vermitteln.^{[80]-[83]} Damit bietet sich prinzipiell auch ein Einsatz *in vivo* an, d.h. solche Cyclodextrinderivate können potentiell als Scavenger zur Behandlung von Organophosph(on)atvergiftungen eingesetzt werden. Ein wichtiger Aspekt ist in diesem Zusammenhang die toxikologische Unbedenklichkeit von Cyclodextrinen.

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse sind die vorliegenden Daten nicht ausreichend, um abzuschätzen, ob sich Cyclodextrine und deren Derivate tatsächlich zur Behandlung von Organophosph(on)atvergiftungen eignen. Diese Arbeit hat zum Ziel, eine breite Datenbasis zu erarbeiten, worauf Aussagen möglich sind, ob Cyclodextrinderivate als NOP-Scavenger dienen können. Außerdem soll eine Struktur-Wirkungs-Beziehung abgeleitet werden. Zum Erreichen dieses Ziels wird eine zweistufige Strategie verfolgt. Zunächst soll durch ein breites Screening eine große Anzahl an Cyclodextrinverbindungen synthetisiert werden, die dann bezüglich ihrer Aktivität auf die Entgiftung von NOPs untersucht werden.

Die Aktivitätsstudien werden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München durchgeführt. Als repräsentative NOPs werden in dem Aktivitätsscreening^[87] Cyclosarin, Tabun, VX und Paraoxon-Ethyl eingesetzt.

Können in diesem Screening vielversprechende, wirksame Verbindungen identifiziert werden, soll deren Wirksamkeit mit weiteren Verfahren genauer charakterisiert werden. Weiterhin soll durch strukturelle Modifikation der Leitstrukturen zum einen die für den NOP-Abbau benötigten Struktur motive identifiziert werden. Zum anderen soll die Wirksamkeit der ersten Wirkstoffkandidaten dadurch verbessert werden. Durch die Kopplung von synthetischen Arbeiten und Wirksamkeitsstudien sollen in einem iterativen Verfahren die Wirksamkeit der entwickelten Scavenger systematisch optimiert werden. Schließlich soll die Wirkungsweise sehr wirksamer Verbindungen durch genauere Untersuchungen charakterisiert werden. So sollen z.B. NMR- und/oder MS-Methoden zur Aufklärung der Abbaumechanismen herangezogen werden. Diese Arbeiten sollen letztlich Informationen zur grundlegenden Frage liefern, ob die Entwicklung von Cyclodextrin-basierten Scavengern zur Behandlung von NOP-Vergiftungen eine realistische Perspektive darstellt.

2.2 Vorüberlegungen

2.2.1 Konzept der Bindung

Der Grund für die Verwendung von Cyclodextrinringen in den in dieser Arbeit entwickelten NOP-Scavengern liegt weniger in der bekannten Eigenschaft von Cyclodextrinen, NOPs entgiften zu können, sondern in der Fähigkeit von Cyclodextrinen, mit organischen Gastmolekülen in Wasser Einschlusskomplexe zu bilden. Da NOPs als Substituenten oftmals organische Reste besitzen, stellen sie potentiell geeignete Bindungspartner für Cyclodextrine dar. Bei Komplexbildung des NOPs im Cyclodextrinhohlraum kann das Phosphoratom in die Nähe einer nucleophilen Gruppe kommen, die sich am Rand der Hohlraumöffnung befindet. Diese räumliche Vororganisation sollte die Reaktion deutlich erleichtern. Anders gesagt wird eine Reaktion 2. Ordnung zwischen NOP und Scavenger durch die Komplexbildung zu einer Reaktion pseudo 1. Ordnung. Bei einer Reaktion 2. Ordnung ist die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration beider Edukte, also von der des Scavengers und der des NOPs abhängig. Auf Grund der hohen Toxizität der NOPs ist eine letale Dosis bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen erreicht. Um eine schnelle Entgiftung zu erreichen, wäre es erforderlich einen Scavenger in sehr hohen Dosen zu verabreichen. Erreicht man jedoch die Bildung eines Komplexes zwischen NOP und Scavenger, ist die Reaktionsgeschwindigkeit des Abbaus eines NOP von der Konzentration des Komplexes abhängig. Diese Konzentration ist hoch, wenn der Komplex zwischen NOP und Scavenger besonders stabil ist ($k_1 \gg k_{-1}$). Man erwartet in diesem Fall für Nucleophile vergleichbarer Reaktivität einen effizienteren NOP-Abbau für das Nucleophil, das an einen Cyclodextrinring gebunden ist, im Vergleich zu einem Nucleophil, dem diese Bindungsstelle fehlt (Abb. 2.1).

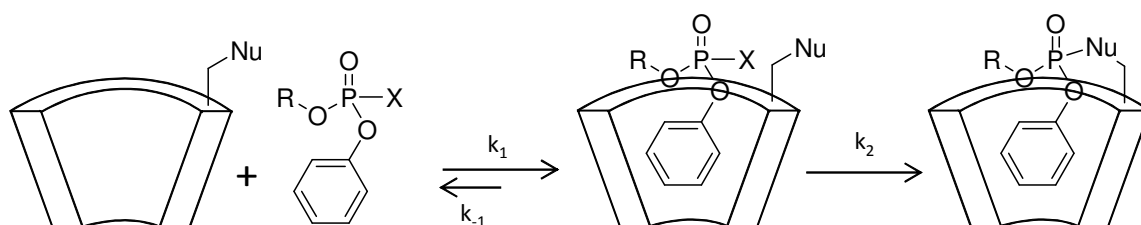


Abb. 2.1: Bildung eines Einschlusskomplexes aus einem Scavenger und einem NOP, der dann in einer irreversiblen Reaktion weiterreagiert.

2.2.2 Konzept des Screenings

Das geplante Screening zielt darauf ab, eine Bibliothek von Cyclodextrinderivaten mit möglichst großer Diversität zu erzeugen. Dazu wird die Zielstruktur in drei Hauptbestandteile eingeteilt, die getrennt voneinander modifiziert werden können (Abb. 2.2).

Die Basis der zu synthetisierenden Verbindungen bildet der Cyclodextrinring. Hier sollen α -, β -, und γ -Cyclodextrin zum Einsatz kommen. In der Kavität des Cyclodextrins soll ein organischer Rest der zu untersuchenden neurotoxischen Organophosph(on)ate gebunden

werden, wodurch das Phosphoratom optimal in räumlicher Nähe zur aktiven Gruppe positioniert wird. Der Cyclodextrinring soll am engeren Rand mit einem oder mehreren Substituenten modifiziert werden. Diese Substituenten sollen verschiedenste nucleophile Gruppen als reaktive Zentren enthalten. Dabei können Stickstoffnucleophile, Sauerstoffnucleophile sowie α -Effekt-Nucleophile zum Einsatz kommen. Cyclodextrinring und Substituenten müssen schließlich miteinander verknüpft werden. Die hierfür verwendeten Linkergruppen können entweder durch nucleophile Substitution oder durch katalytische Kupplungsverfahren hergestellt werden.

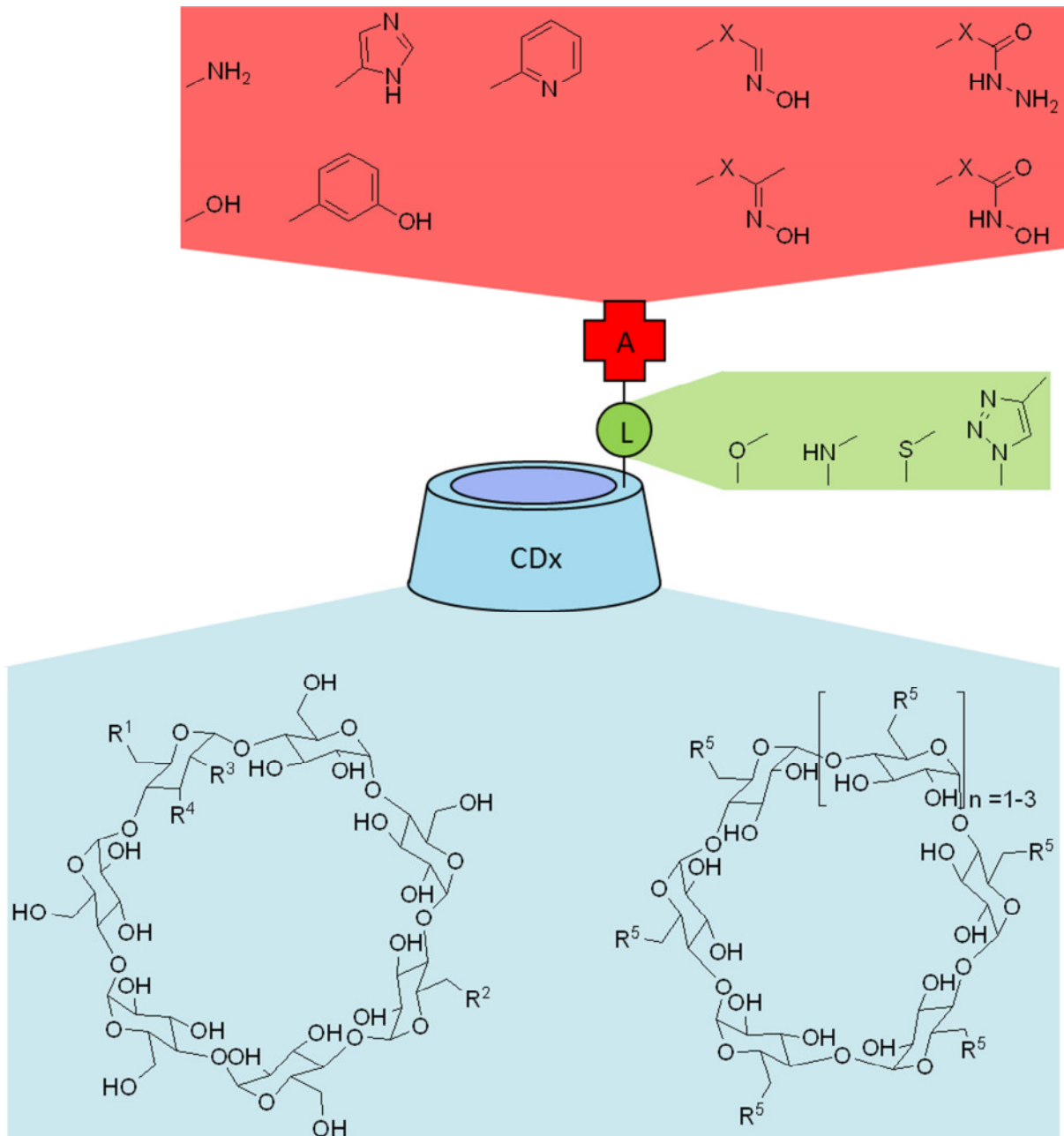


Abb. 2.2: Zielstrukturen, die sich aus einer bindenden Einheit (CDx), einem Linker (L) und einer reaktiven Einheit (A) zusammensetzen. Jede Untereinheit kann getrennt voneinander modifiziert werden.

Zuckerrest/Cyclodextrin

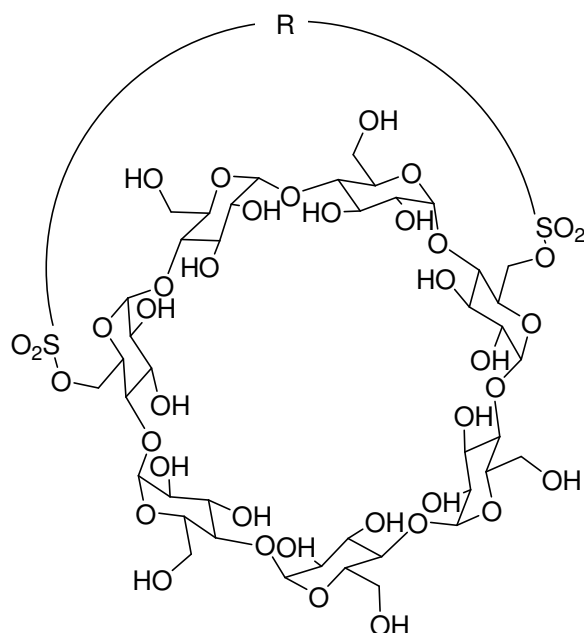
Variationen in diesem Strukturelement ergeben sich^[88]

- in der Ringgröße des Cyclodextrinrings. In diesem Zusammenhang können Derivate des α -, β - und γ -Cyclodextrins berücksichtigt werden, die auf Grund der unterschiedlich großen Kavität unterschiedliche Bindungsverhalten gegenüber NOPs aufweisen sollten.
- in der Position der Substituenten entlang des Rings. Diese Substituenten können entlang der engeren oder weiteren Öffnung des Cyclodextrinrings angeordnet werden, wobei im ersten Fall eine Modifikation der primären OH-Gruppen der Cyclodextrineinheiten notwendig ist und im zweiten Fall eine der sekundären.
- in der Anzahl der Substituenten. Etablierte Syntheseverfahren erlauben die Synthese von monosubstituierten Cyclodextrinen mit einem einzigen Substituenten. Außerdem können selektiv alle primären OH-Gruppen modifiziert werden. Für β -Cyclodextrin ist die selektive Modifizierung zweier primärer OH-Gruppen an definierten Positionen im Ring möglich. Weitere Verfahren, wie die selektive Modifizierung dreier OH-Gruppen in α - oder β -Cyclodextrin, sind beschrieben, aber aufwendig.^{[89][90]}

Die im Rahmen dieser Promotion durchgeführten Arbeiten sollen sich weitestgehend auf die Synthese von β -Cyclodextrinderivaten beschränken, wobei nur Derivate hergestellt werden sollen, die Substituenten am engeren Rand des Ringes tragen. Mit entsprechenden β -Cyclodextrinderivaten, in denen die C²- oder C³-OH-Gruppen von Glucoseeinheiten modifiziert wurden, beschäftigte sich Luzian Porwol im Rahmen seiner Diplomarbeit.^[91] Die Anzahl der Substituenten entlang des Rings soll variiert werden. So sollen einfach, zweifach und siebenfach substituierte β -Cyclodextrinderivate dargestellt werden. Hierfür kann auf literaturbekannte Syntheseverfahren zurückgegriffen werden. Für die Monosubstitution in C⁶-Position muss selektiv eine primäre OH-Gruppe von β -Cyclodextrin aktiviert werden. Die hierfür gebräuchliche Tosylierung kann in Pyridin^[92] oder Wasser^[93] durchgeführt werden. Bei der Reaktion in Wasser bildet sich aus dem Tosylierungsreagens *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und β -Cyclodextrin ein Einschlusskomplex, in dem die Sulfonsäurechloridgruppe in räumlicher Nähe zu der C⁶-OH-Gruppe einer Glucoseeinheit orientiert ist. Dadurch kommt es zu einer regioselektiven Bildung des Produktes. Die Bildung höher substituerter Produkte wird durch die Bindung des aromatischen Substituenten der *p*-Toluolsulfonsäure im Cyclodextrinring verhindert.

Für die selektive Modifizierung zweier primärer OH-Gruppen von β -Cyclodextrin gibt es mehrere Möglichkeiten

- Bei Verwendung eines geeigneten Disulfonsäurechlorids ist es möglich, zwei C⁶-OH-Gruppen in A,B,^[94] A,C oder A,D-Position (R¹, R² = verbrückt; R³, R⁴ = OH)^[95] des β -Cyclodextrinrings miteinander zu verbrücken (Abb. 2.2). Anschließend können die Sulfonsäureester durch Substitution weiter modifiziert werden.

Abb. 2.2: A,D-verbrücktes β -Cyclodextrin

- Pearce et al. gehen für die Synthese eines zweifach substituierten β -Cyclodextrins von vollständig benzyliertem β -Cyclodextrin aus. In Gegenwart von Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-*H*) ist es dann möglich, selektiv zwei Benzylgruppen an primären Positionen in A,D-Position abzuspalten. Nun sind weitere Transformationen mit den so erhaltenen OH-Gruppen möglich. Den Abschluss der Synthese stellt die hydrogenolytische Spaltung der Schutzgruppen dar.^[96]

β -Cyclodextrinderivate mit sieben Substituenten entlang der engeren Ringöffnung können durch Umsetzung von β -Cyclodextrin mit *in situ* generierten Vilsmeier-Halogeniden erreicht werden.^[97] Hierbei werden selektiv alle primären OH-Gruppen in die entsprechenden Halogenide überführt (Abb. 2.3). Als Halogenidquellen kommen Iod^[98] und *N*-Bromsuccinimid^[99] in Frage.

Die per-Halogenierung kann entsprechend auch zur Darstellung analoger α - und γ -Cyclodextrinderivate mit sechs oder acht Substituenten in C⁶-Position dienen (Abb. 2.3).

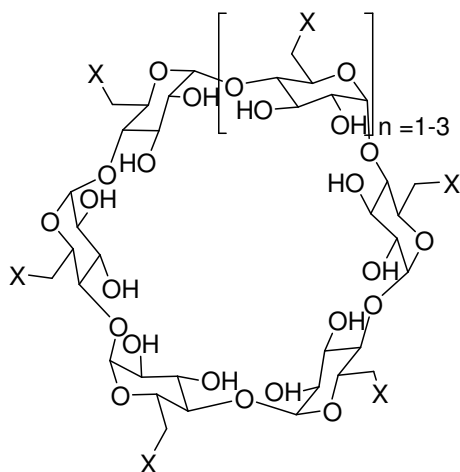


Abb. 2.3: Cyclodextrine, bei denen alle primären OH-Gruppen substituiert sind (X = Br, I).

Als Modellverbindungen sollen im Rahmen der Promotion außerdem α -D-Glucopyranosidderivate hergestellt und untersucht werden.

Linkereinheit

Ausgehend von Cyclodextrinderivaten, die eine oder mehrere Abgangsgruppen in Form von Halogeniden oder Sulfonaten tragen, ergeben sich für dieses Strukturelement folgende Variationsmöglichkeiten:

- Durch nucleophile Substitution durch ein geeignetes Nucleophil können Linkereinheiten wie Ether, Thioether oder Amine generiert werden.
- Überführt man zunächst die Abgangsgruppe(n) des Edukts durch nucleophile Substitution in Azid(e), kann in einer Kupfer(I)-katalysierten Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition mit einem entsprechenden terminalen Alkin ein 1,4-substituierter 1,2,3-Triazolring aufgebaut werden.^[100]

In dieser Arbeit sollen beide Methoden verwendet werden. Im Falle der nucleophilen Substitution ist zu beachten, dass die als Nucleophil eingesetzten Amine eine ausreichende Nucleophilie für die Reaktion mitbringen, während Alkohole und Thiole zuerst deprotoniert werden müssen, bevor ein nucleophiler Angriff möglich ist.

Eine attraktive Möglichkeit zur Verknüpfung von Cyclodextrinring und nucleophilem Substituenten stellt die Kupfer(I)-katalysierte Huisgen 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) dar. Um eine Reaktion mit einer Azid-tragenden bindenden Einheit zu ermöglichen, muss die aktive Einheit ein terminales Alkin enthalten. Die Vorteile der CuAAC-Reaktion liegen darin, dass sie in wässrigen Reaktionsmedien durchgeführt werden kann, was der Löslichkeit speziell der Cyclodextrinkomponenten entgegenkommt. Weiterhin zeichnet sie sich durch eine hohe Gruppentoleranz aus.^[101] Zudem kann der für die Reaktion nötige Kupfer(I)-Katalysator *in situ* aus dem oxidationsstabilen Kupfer(II)-sulfat durch Reduktion mit Natriumascorbat leicht erhalten werden. Diese Aspekte machen die CuAAC-Reaktion zu einer geeigneten Methode für die hier geplanten Synthesen (Abb. 2.1, grün).

Reaktive Einheit

Die reaktive Einheit gibt Raum für die meisten strukturellen Variationen im Scavenger-molekül. Prinzipiell können die zu untersuchenden aktiven Einheiten in drei Klassen eingeteilt werden.

Zunächst können Sauerstoffnucleophile in Form von primären Alkoholen oder Phenolen berücksichtigt werden. Diese Nucleophile imitieren die OH-Gruppen von Cyclodextrinen, die ausreichen, um den Abbau von NOPs zu beschleunigen.^[80] Primäre Alkohole haben einen pK_s -Wert im Bereich von 15. Unter physiologischen Bedingungen (pH -Wert = 7.4) liegen diese nicht als Alkoholat vor, weshalb die Nucleophile stark herabgesetzt ist. Die Untersuchung von alkoholischen Gruppen, die über einen flexiblen Linker mit der bindenden Einheit verbunden sind, soll zeigen, ob der Flexibilitätsgewinn sich positiv auf die Hydrolyse-

geschwindigkeit auswirkt. Phenolische Systeme haben hingegen einen niedrigeren pK_s -Wert im Bereich von 10.^[102] Durch Anbringen geeigneter Gruppen am aromatischen System kann der pK_s -Wert weiter gesenkt werden, sodass unter physiologischen Bedingungen ein höherer Anteil an Phenolat vorliegt, welches dann nucleophil am Phosphoratom des NOP angreifen kann.

Breslow et al. konnte zeigen, dass ein Cyclodextrin mit Imidazoleinheiten in der Lage ist, cyclische Phosphate zu hydrolysieren.^[63] Aus diesem Grund sollen in dieser Arbeit auch Stickstoffnucleophile als reaktive Einheiten in Form von primären, sekundären und tertiären Aminen sowie Imidazolgruppen untersucht werden. Solche Amine können den NOP-Abbau auf zweierlei Weise beeinflussen. Einerseits kann ein direkter nucleophiler Angriff am Phosphoratom stattfinden. Weiterhin ist es möglich, dass Amine durch ihren basischen Charakter ein Wassermolekül „aktivieren“. Dabei wird in einem konzertierten Mechanismus ein Wassermolekül deprotoniert, unter gleichzeitigem Angriff des entstehenden Hydroxid-Ions am Phosphoratom des NOP. Dieser Effekt sollte besonders bei primären und sekundären Aminen zu beobachten sein, deren Basizität in wässrigem Medium höher ist als die von tertiären Aminen.

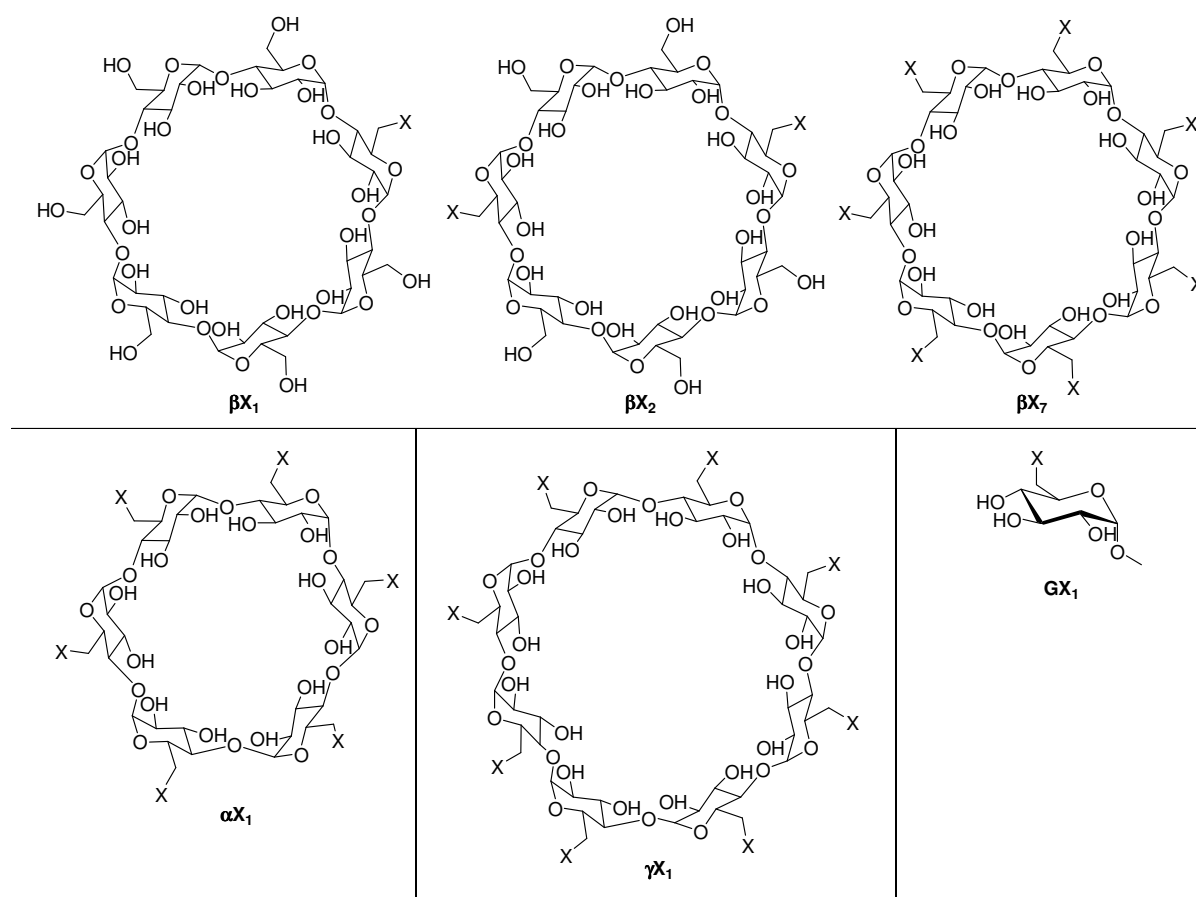
Als dritte Klasse an nucleophilen Einheiten sollen α -Effekt-Nucleophile untersucht werden. α -Effekt-Nucleophile besitzen im Vergleich mit anderen Verbindungen, die einen identischen pK_s -Wert aufweisen, eine je nach Lösungsmittel stark erhöhte Nucleophilie.^[103] Für dieses Phänomen werden mehrere Gründe verantwortlich gemacht, wobei die Erklärung der Destabilisierung des Grundzustandes und der Stabilisierung des Übergangszustands favorisiert wird.^[104] In Nachbarschaft zum nucleophilen Zentrum besitzen α -Effekt-Nucleophile ein Heteroatom mit einem freien Elektronenpaar. Während eines nucleophilen Angriffs entsteht am Nucleophil eine positive Ladung, die im Falle eines α -Effekt-Nucleophils durch das Elektronenpaar des Nachbaratoms stabilisiert werden kann.^[105] Im Grundzustand kann es zu repulsiven Wechselwirkungen zwischen den freien Elektronenpaaren kommen, was zu einer Destabilisierung führt.^[104]

In dieser Arbeit sollen Oxime, Ketoxime, Hydrazide und Hydroxamsäuren als Repräsentanten von α -Effekt-Nucleophilen untersucht werden. Oxime haben einen pK_s -Wert von ca. 11. In Analogie zu bereits bekannten Reaktivatoren phosphorylierter AChE, wie Obidoxim, kann durch Alkylierung des Ringstickstoffs die Elektronendichte des Oxims herabgesetzt werden, was sich auch in niedrigeren pK_s -Werten um 8.5 äußert. Dadurch liegt ein größerer Anteil an aktiver deprotonierter Spezies, dem Oximat, unter physiologischen Bedingungen vor.^[106] Hydroxamsäuren hingegen erreichen bereits ohne elektronenarme Substituenten pK_s -Werte im gleichen Bereich.^[107] Dadurch ist ebenfalls mit einem hohen Anteil des deprotonierten Hydroxamats unter physiologischen Bedingungen zu rechnen.

3. Eigene Ergebnisse

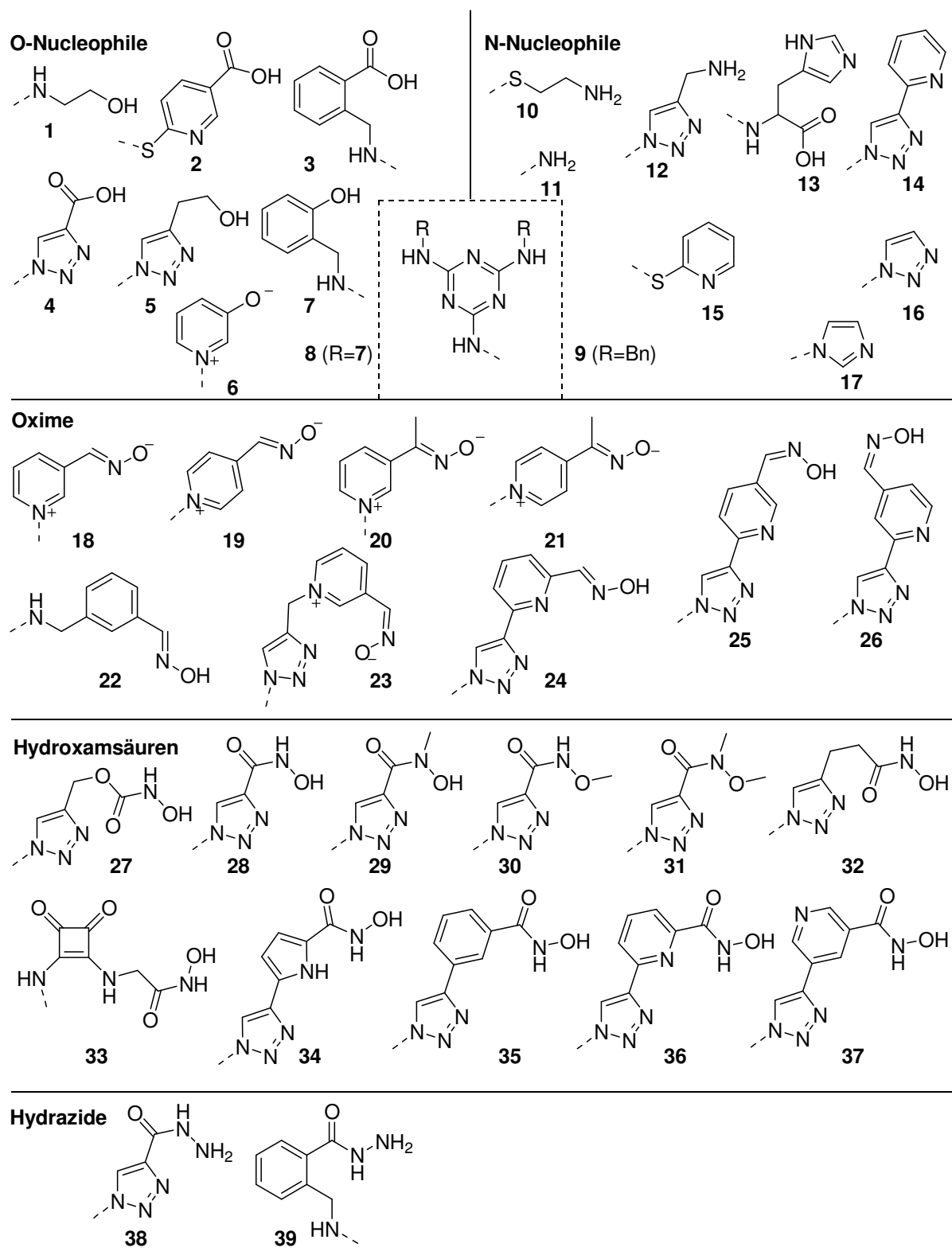
3.1 Überblick

Im Laufe der Arbeit wurden 69 potentielle Scavenger synthetisiert und analysenrein enthalten. In den folgenden Tabellen sind alle untersuchten Verbindungen, eingeteilt nach Zuckerrest (Tab. 3.1) und reaktiver Gruppe (Tab. 3.2), zusammengefasst. Die verwendeten Bezeichnungen sind dabei wie folgt zu verstehen. Die griechischen Buchstaben α , β und γ bezeichnen das verwendete Cyclodextrin. Ein "G" deutet darauf hin, dass anstatt eines Cyclodextrins ein α -D-Methylglucopyransosid als Zuckerrest verwendet wurde. Die auf α , β , γ oder G folgende Zahl steht für die am Zuckerrest gebundene reaktive Einheit, die der Tabelle 3.2 entnommen werden kann. Um die Anzahl an aktiven Einheiten, die an einem Zuckerrest gebunden sind, zu kennzeichnen, endet die Scavengerbezeichnung mit einer tiefgestellten Zahl. 1 steht hierbei für einen Substituenten in C⁶-Position an einer Glucoseeinheit des β -Cyclodextrins oder eines α -D-Methylglucopyransosids. Sind zwei primäre C⁶-Positionen an der A- und D-Glucoseeinheit im β -Cyclodextrinring mit Substituenten versehen, ist dies durch eine tiefgestellte 2 gekennzeichnet. Die Zahlen 6, 7 und 8 geben an, dass alle primären OH-Gruppen von α -, β - oder γ -Cyclodextrin durch Substituenten ersetzt sind.



Tab. 3.1: Struktur der Zuckerreste im Scavengermolekül. Das „X“ fungiert als Platzhalter für die Nummer eines Substituenten aus Tabelle 3.2.

Die in Tabelle 3.2 zusammengefassten reaktiven Einheiten sind nach ihrer nucleophilen Gruppe klassifiziert. Hierbei wird eine Unterteilung in O- und N-Nucleophile sowie α -Effekt-Nucleophile vorgenommen. Die α -Effekt-Nucleophile sind nochmals in Oxime, Hydroxamsäuren und Hydrazide unterteilt.



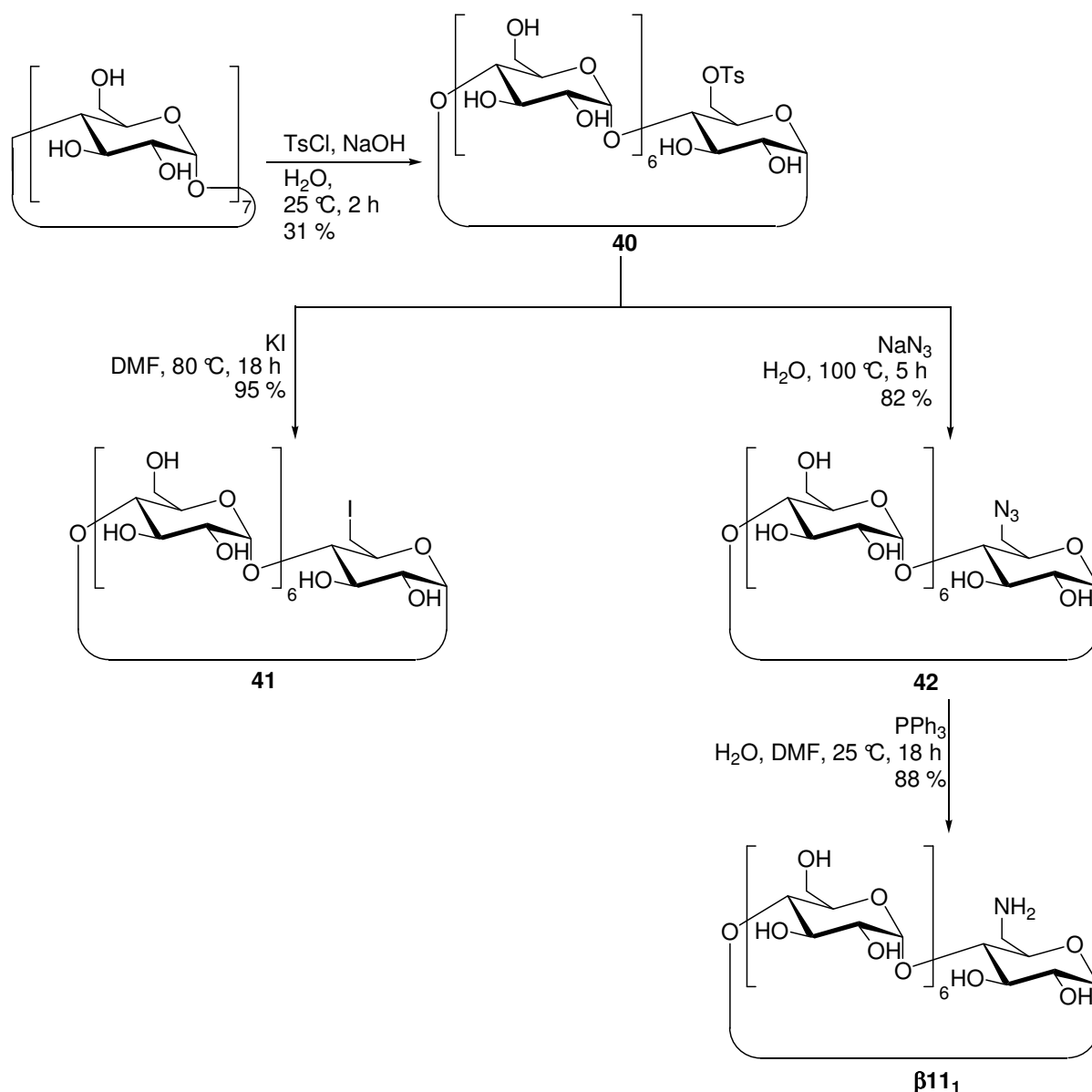
Tab. 3.2: Reaktive Einheiten, nach ihrer nucleophilen Gruppe klassifiziert.

3.2 Synthese

3.2.1 Synthese der modifizierten Bindungseinheiten

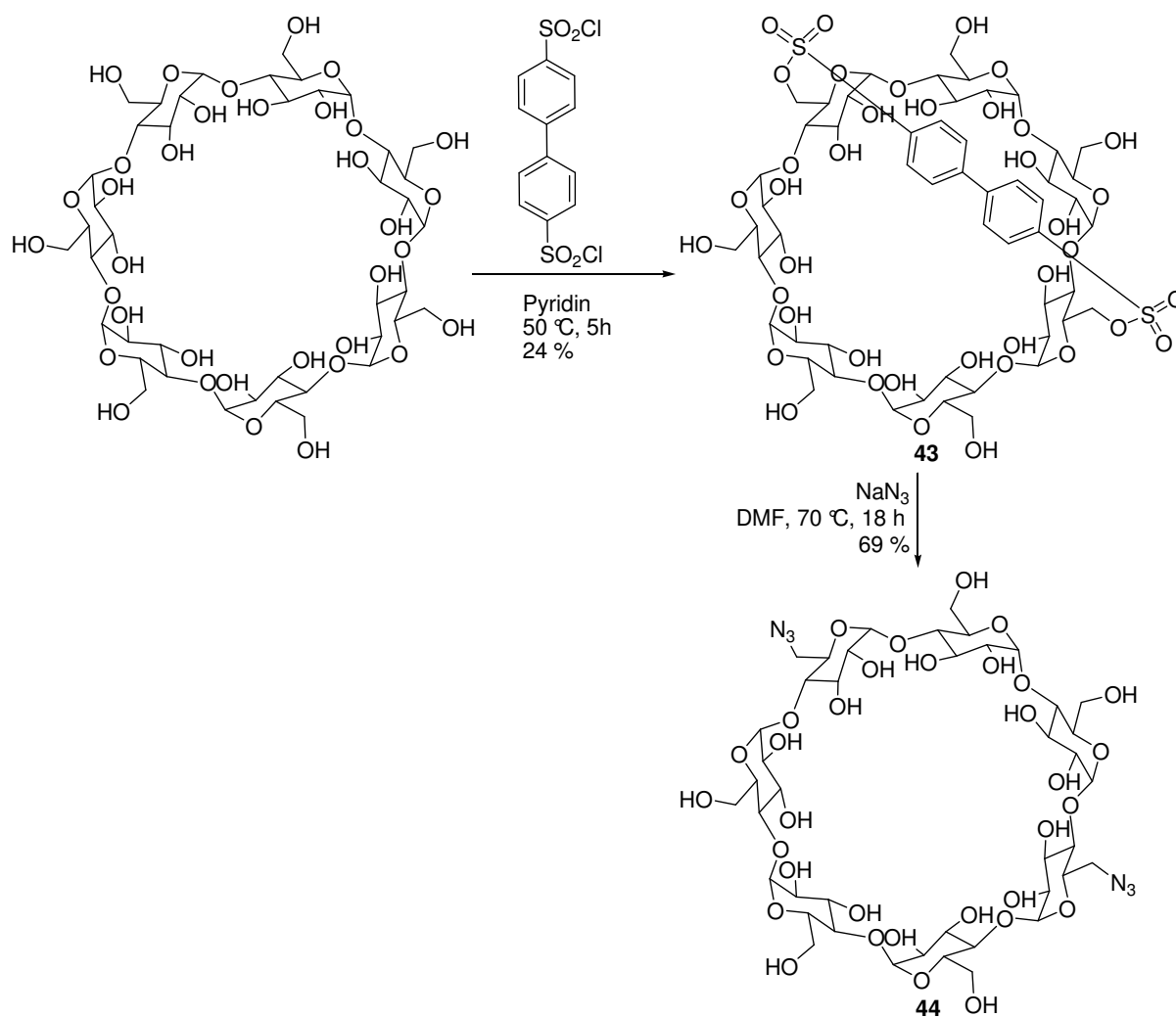
Das zentrale Ausgangsprodukt für die Darstellung der monosubstituierten β -Cyclodextrinderivate stellte 6-Mono-(*p*-toluolsulfonyl)- β -cyclodextrin (**40**) dar. Dieses wurde nach einer literaturbekannten Methode durch Umsetzung von β -Cyclodextrin mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in Wasser erhalten.^[93] Auf Grund der Einfachheit der Methode und der hohen Reinheit, mit der das gewünschte Produkt nach Umkristallisation anfiel, ist dieses Verfahren günstiger als die Umsetzung von β -Cyclodextrin mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in Pyridin.

Verbindung **40** wurde dann zu weiteren Ausgangsmaterialien umgesetzt. Durch Umsetzung mit Kaliumiodid wurde das entsprechende 6-Mono-iodo-6-mono-desoxy- β -cyclodextrin (**41**) erhalten, das eine bessere Abgangsgruppe trägt.^[108] Für die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition war es erforderlich, am Cyclodextrin eine Azidgruppe anzubringen. Durch Behandlung von **40** mit Natriumazid wurde das benötigte 6-Mono-azido-6-mono-desoxy- β -cyclodextrin (**42**) erhalten.^[109] Dieses konnte durch Staudinger Reduktion zum entsprechenden Amin **β 11₁** reduziert werden (Schema 3.1).^[110]



Schema 3.1

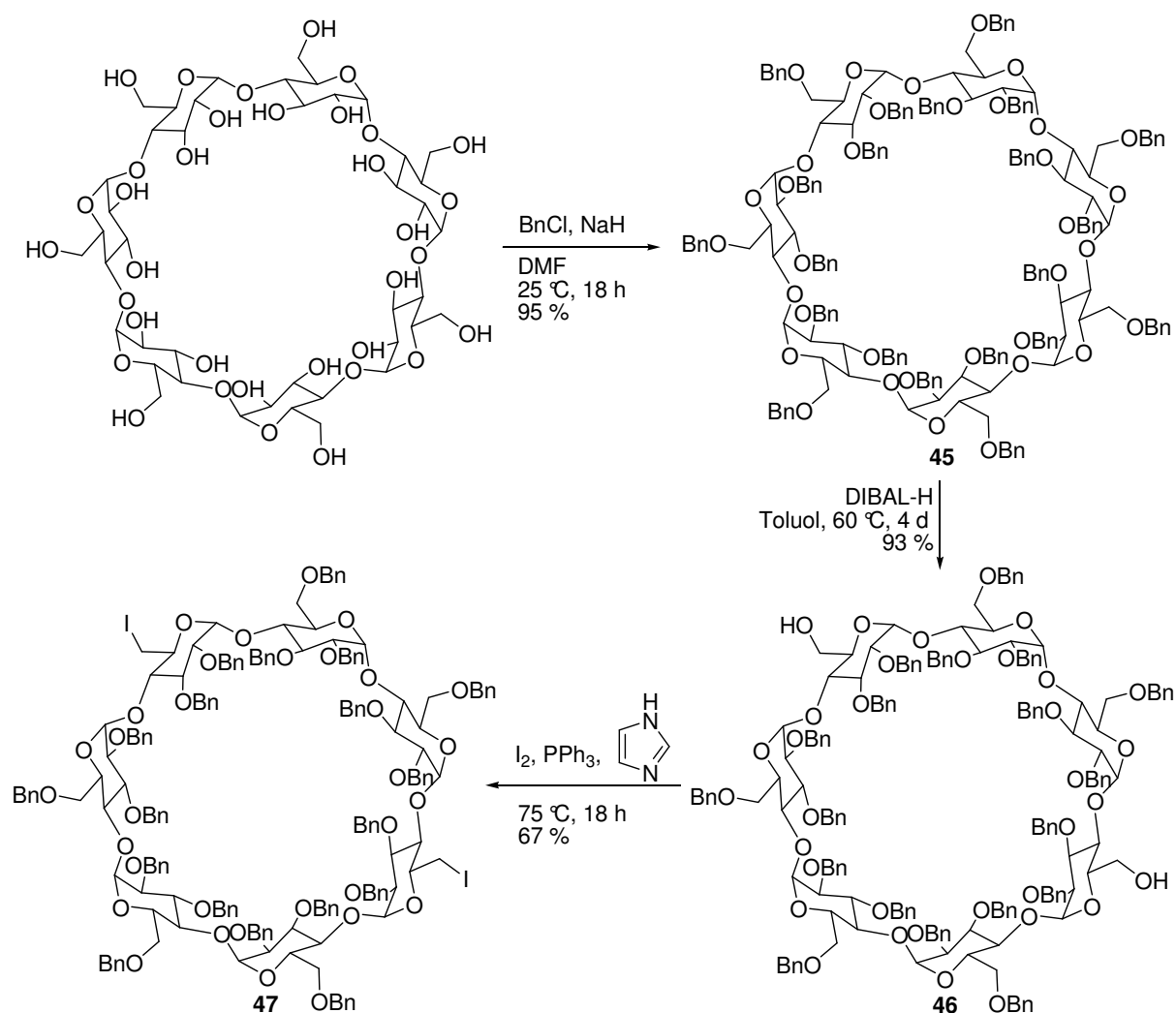
Die Synthese von zweifach funktionalisierten Cyclodextrinen wurde auf zweierlei Wegen erreicht. Durch Umsetzung von nativem β -Cyclodextrin mit Biphenyl-4,4'-disulfonylchlorid unter Pseudohochverdünnung in Pyridin wurde Verbindung **43** erhalten, in der die Disulfonatgruppe zwei C⁶-OH-Gruppen an Glucoseeinheiten in A- und D-Position des Cyclodextrinrings verbrückt.^{[95][111]} Verbindung **43** konnte dann weiter mit Natriumazid in das entsprechende 6^A,6^D-Diazido-6^A,6^D-didesoxy- β -cyclodextrin (**44**) überführt werden (Schema 3.2).^{[111][112]} Auf Grund der niedrigen Ausbeute im ersten Schritt dieser Reaktion wurde nach Alternativen für die selektive Funktionalisierung von β -Cyclodextrin in A,D-Position gesucht.



Schema 3.2

Ausgehend von β -Cyclodextrin wurde hierfür das perbenzylierte Cyclodextrinderivat **45** durch Behandlung mit NaH und Benzylchlorid dargestellt.^[113] Verbindung **45** wurde im nächsten Schritt unter den von Pearce et al. beschriebenen Bedingungen umgesetzt, um zwei Benzylgruppen an C⁶-OH Glucosegruppen in A und D Position des Cyclodextrinrings abzuspalten.^[96] Das erhaltene Produkt **46** wurde zum entsprechenden Diiodid **47** umgesetzt (Schema 3.3).^[65] Anschließend wurden die Benzylschutzgruppen hydrogenolytisch abgespalten, da dies nach der folgenden Umsetzung zum Diazid ohne Einfluss auf die Azidgruppen nicht mehr möglich ist. Dazu wurde Verbindung **47** in DMF an Palladium auf Kohle in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Jedoch konnte auch nach mehreren Tagen keinerlei Umsatz festgestellt werden. Auch eine Erhöhung der Katalysatorbeladung oder der Wechsel des Katalysators auf Raney-Nickel führte zu keinem positiven Ergebnis. Dies war mit ein Grund, weshalb von diesem Syntheseweg wieder Abstand genommen wurde. Weiterhin waren die Ausbeuten für die Darstellung von Verbindung **45** bis **47** zwar sehr vielversprechend, jedoch war jede Stufe mit einer aufwendigen säulenchromatographischen Aufreinigung verbunden, was zeitaufwändig war und große Mengen an Lösungsmitteln erforderte. Dadurch war der erste Weg trotz der deutlich niedrigeren Ausbeuten attraktiver,

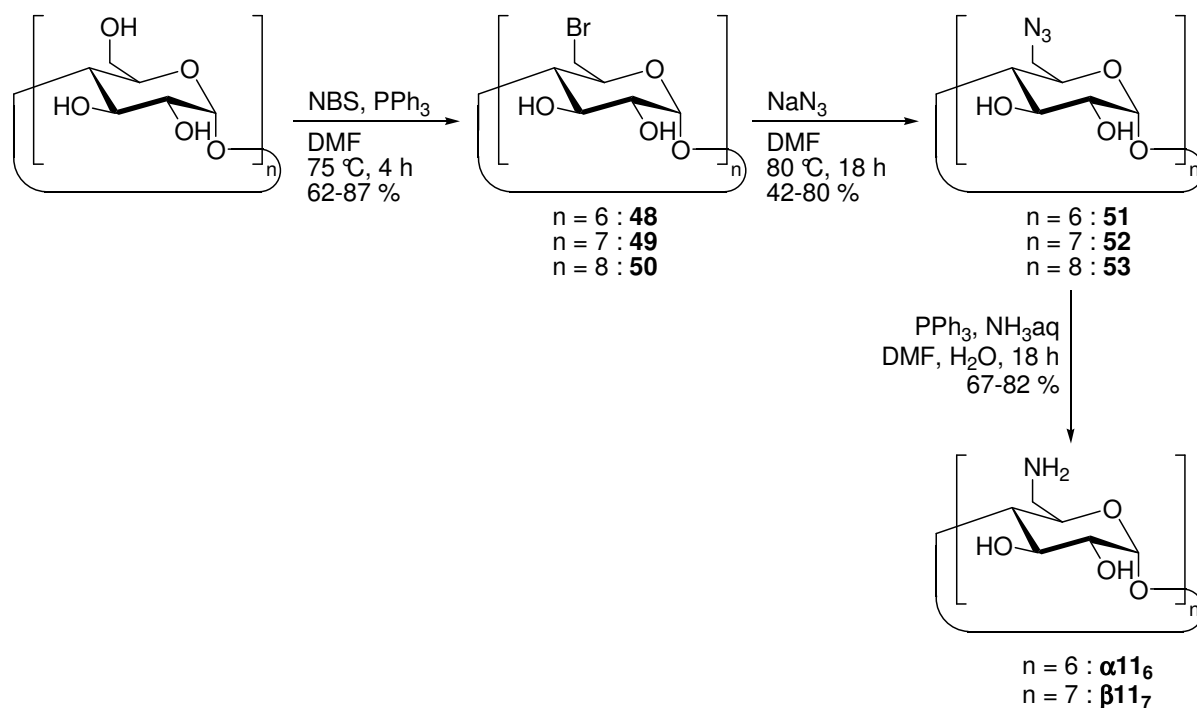
denn die gewünschten Produkte **43** und **44** konnten jeweils durch geeignete Fällungsmethoden leicht aus der Reaktionsmischung isoliert werden.



Schema 3.3

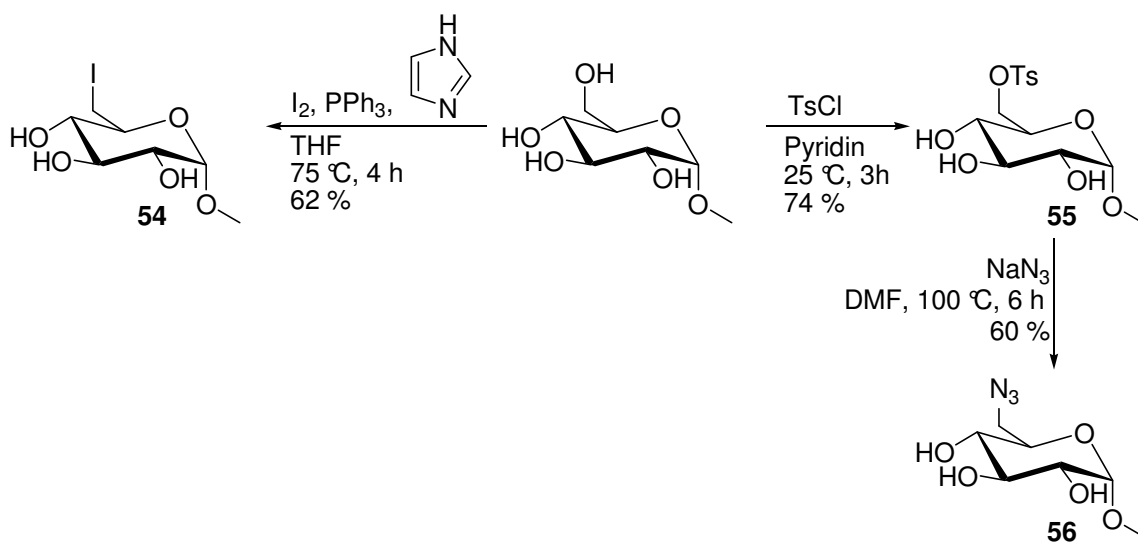
Zur Darstellung der β -Cyclodextrinderivate mit 7 funktionellen Gruppen entlang der engeren Öffnung wurde 6-Heptakis-brom-6-heptakis-deoxy- β -cyclodextrin (**49**) synthetisiert. Hierzu wurde nach einer bekannten Vorschrift aus *N*-Bromsuccinimid und Triphenylphosphin ein Vilsmeier-Bromid generiert, das mit β -Cyclodextrin unter Bildung des gewünschten Produktes umgesetzt wurde.^[99] Unter analogen Reaktionsbedingungen wurden auch die entsprechenden Derivate des α - und γ -Cyclodextrins, **48** und **50**, erhalten. Die Umsetzung von β -Cyclodextrin mit einem Vilsmeier-Iodid^[98] wurde ebenfalls untersucht, jedoch gestaltete sich hierbei die Aufreinigung des Heptaiodids über eine Soxhlet-Apparatur schwieriger, weswegen für die Synthesen überwiegend die Bromderivate verwendet wurden. Aus den Halogeniden wurden durch Umsetzung mit Natriumazid die entsprechenden Azide erhalten (Schema 3.4). Während die Ausbeuten für das β - und γ -Cyclodextrinderivat, **52**^[98] und **53**,^[114] zufriedenstellend waren, konnte 6-Hexakis-azido-hexakis-desoxy- α -cyclodextrin (**51**) nur in Ausbeuten von 42 % erhalten werden. Eine Ursache hierfür könnte die bessere Löslichkeit von **51** in Wasser im Vergleich zu **52** und **53**

sein, wodurch die Ausfällung des Produktes aus der Reaktionslösung durch Zugabe von Wasser nicht gut funktioniert.^[114] Durch Staudinger-Reduktion konnten aus den entsprechenden Aziden die Verbindungen **α 11₆**^[115] und **β 11₇**^[98], bei denen alle primären Positionen des Cyclodextrinrings eine primäre Aminogruppe enthalten, dargestellt werden.



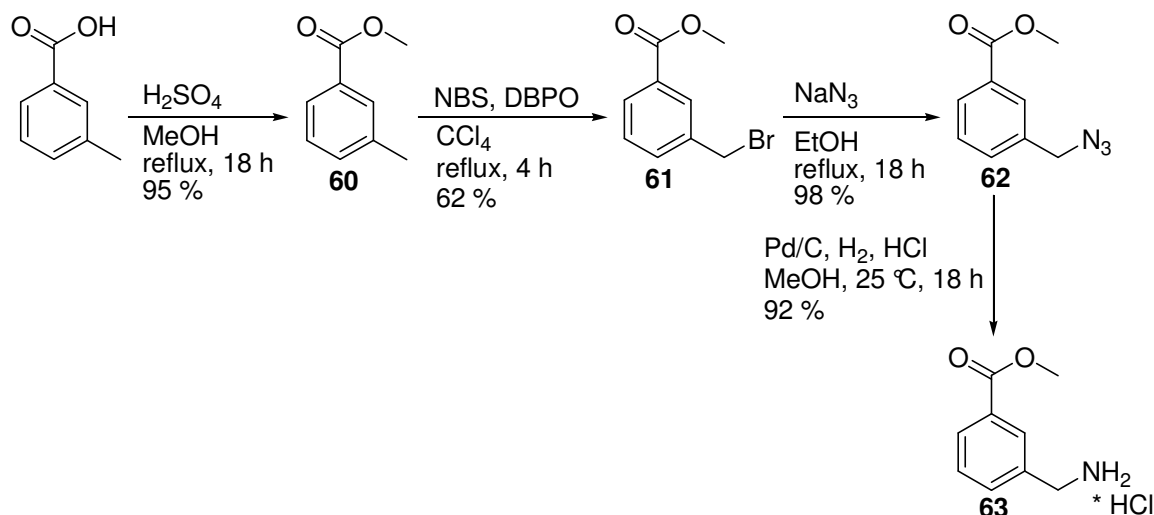
Schema 3.4

Für die Synthese entsprechender Glucosebausteine wurde α -D-Methylglucopyranosid in das Iodid **54** überführt.^[116] **54** konnte dann in weiteren Substitutionsreaktionen eingesetzt werden. Alternativ konnte α -D-Methylglucopyranosid analog zu einer Vorschrift für das entsprechende Mannopyranosid auch in C⁶-Position tosyliert werden.^[117] Mit Natriumazid wurde dann das entsprechende Azid **56** erhalten (Schema 3.5).^[118]



Schema 3.5

Methylbenzoesäure in einem ersten Schritt unter Säurekatalyse in den Methylester **60** überführt.^[121] Dieser wurde selektiv an der Methylgruppe bromiert, wobei N-Bromsuccinimid als Bromquelle und Dibenzoylperoxid (DBPO) als Radikalstarter diente.^[122] Verbindung **61** wurde dann in das entsprechende Azid **62** überführt.^[123] Unter Wasserstoffatmosphäre wurde dieses dann an einem Palladium/Kohle-Katalysator zum Amin reduziert, das als Ammoniumchloridsalz **63** isoliert wurde (Schema 3.8).^[124] Nach Kupplung von **63** mit dem Tosylat **40** sollte die Carbonsäuregruppe durch basische Esterverseifung freigesetzt werden.



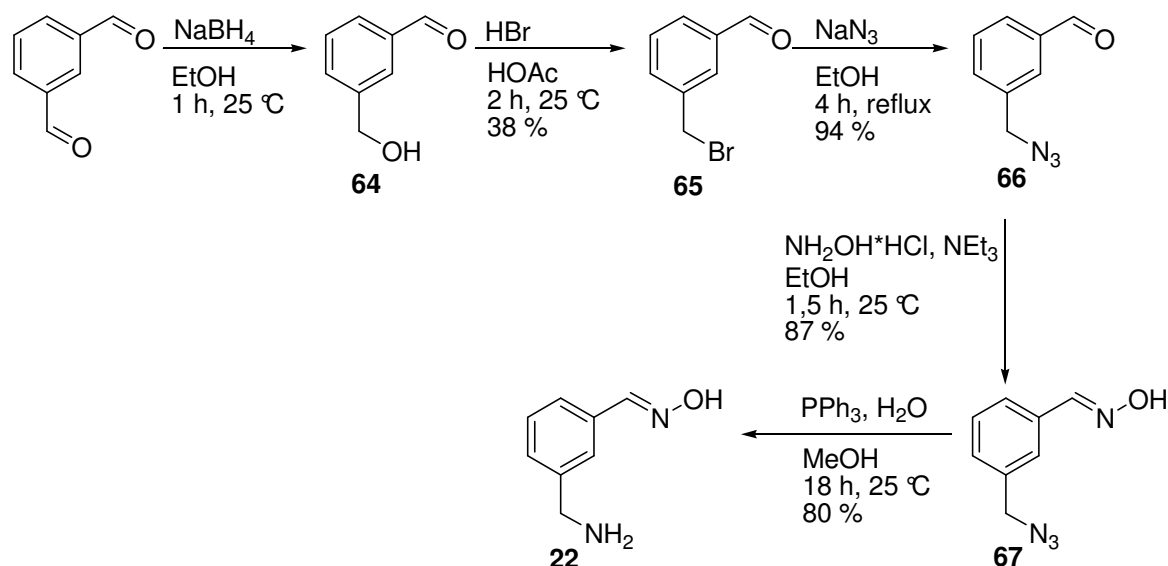
Schema 3.8

Aldoxime und Ketoxime

Während aktive Einheiten, die Stickstoff- und Sauerstoffnucleophile enthalten, bis auf die oben genannten Beispiele kommerziell erhältlich waren, mussten die Vorstufen für Cyclodextrinderivate mit α -Effekt-Nucleophilen als reaktive Gruppen zunächst synthetisiert werden.

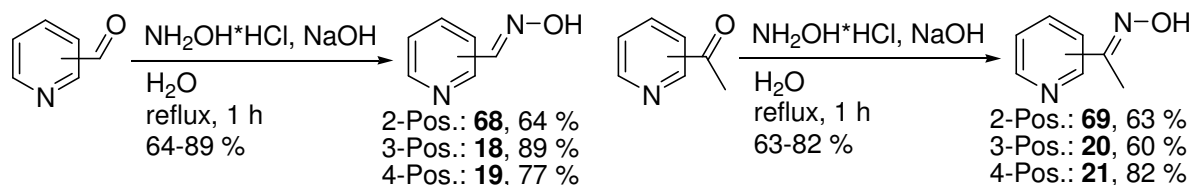
Ein zu Verbindung **63** analoges Oxim wurde ausgehend von Isophthalaldehyd erhalten. Dieser wurde zum Alkohol **64** reduziert, welcher ohne Isolierung mit Bromwasserstoffsäure weiter zum Bromid **65** umgesetzt wurde.^[125] Das Bromid wurde in das entsprechende Azid **66** überführt, welches anschließend mit *in situ* hergestelltem Hydroxylamin zum entsprechenden Oxim **67** umgewandelt wurde. Die Reduktion der Azidgruppe konnte nicht wie bei Verbindung **62** an einem Palladium/Kohle-Katalysator in einer Wasserstoffatmosphäre durchgeführt werden, da unter diesen Bedingungen das Oxim ebenfalls reduziert würde. Daher wurde in diesem Falle auf die Staudinger-Reduktion zurückgegriffen, um **22** zu erhalten (Schema 3.9).

3. Eigene Ergebnisse



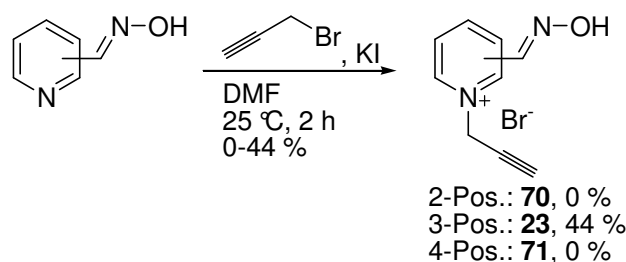
Schema 3.9

Eine größere Bandbreite an pyridinhaltigen Oximen und Ketoximen wurde ausgehend von den entsprechenden Aldehyden und Ketonen hergestellt. Durch Umsetzung mit Hydroxylamin konnten die Pyridinaldoxime **18**, **19**, **68** und Pyridinketoxime **20**, **21**, **69** in guten Ausbeuten und in hoher Reinheit erhalten werden (Schema 3.10).^[126] Diese Pyridinderivate sollten durch Umsetzung mit **40** in die entsprechenden Pyridiniumverbindungen überführt werden.



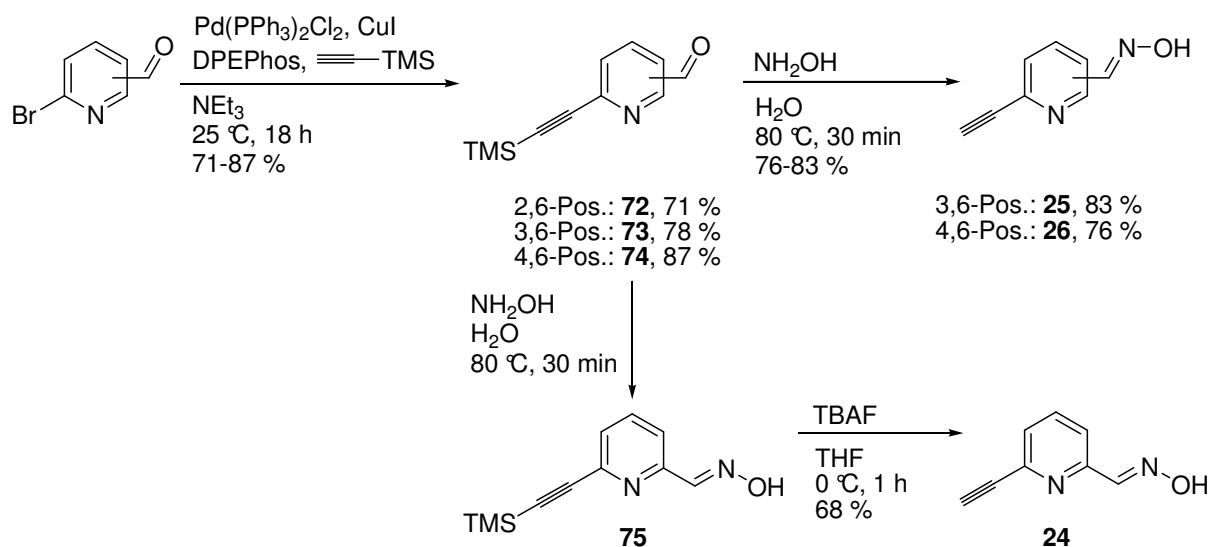
Schema 3.10

Die Verbindungen **18-21** und **68-69** ermöglichen also die Synthese von Pyridiniumoximen, in denen die Pyridiniumgruppe jeweils direkt am Cyclodextrinring gebunden ist und erst bei Reaktion mit dem aktivierten Cyclodextrinderivat entsteht. Alternativ kann man von Vorstufen ausgehen, die bereits eine Pyridiniumgruppe tragen und welche auf andere Weise mit dem Cyclodextrinring verknüpft werden. Entsprechend wurde versucht, Verbindungen **18-19** und **68** mit Propargylbromid in die resultierenden Pyridiniumaldoxime zu überführen, die dann durch eine CuAAC-Reaktion mit Cyclodextrinaziden verknüpft werden können. Erfolgreich war in diesem Fall nur die Synthese von **39**, das die Aldoximgruppe in 3-Position zum Pyridinstickstoff trägt (Schema 3.11). Wahrscheinlich ist in den anderen Fällen der Pyridinstickstoff durch den $-M$ -Effekt der Aldoximgruppe zu elektronenarm, um mit Propargylbromid zu reagieren.



Schema 3.11

Neutrale Pyridinderivate wurden durch Alkinylierung von Brompyridinderivaten durch Sonogashira-Hagihara-Reaktion erhalten.^[127] Durch Umsetzung von 2-Brompyridinaldehyden mit Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, DPEPhos und Trimethylsilylacetylen in Triethylamin wurden zunächst die TMS-geschützten Ethinylaldehyde **72-74** synthetisiert. Die anschließende Bildung der Oxime **24-26** konnte in Wasser durch Zugabe von wässriger Hydroxylaminlösung erreicht werden. Es handelt sich hierbei um eine zweiphasige Reaktion, bei der Edukt und Produkt im Wasser unlöslich sind, sodass die gewünschten Oxime leicht isoliert werden konnten.

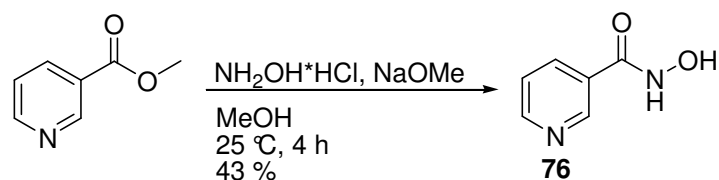


Schema 3.12

Bei Umsetzung von **73** und **74** zu den entsprechenden Oximen wurde bei Zugabe eines Überschusses an Hydroxylamin gleichzeitig die Trimethylsilylschutzgruppe abgespalten, sodass die gewünschten Oxime **25** und **26** direkt erhalten wurden. Für das 2,6-disubstituierte Derivat **75** war das nicht der Fall, sodass die TMS-Gruppe in einer Folgereaktion mit Tetrabutylammoniumfluorid unter Bildung von **24** gespalten wurde (Schema 3.12).

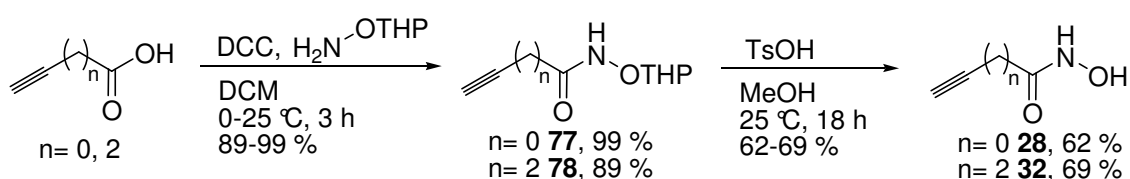
Hydroxamsäuren

Ausgehend von Nicotinsäuremethylester wurde die entsprechende Hydroxamsäure dargestellt, die analog zu den Pyridinaldoximen unter Bildung eines Pyridiniumsalzes mit Tosylat **40** umgesetzt werden sollte. Hierzu wurde Nicotinsäuremethylester mit *in situ* generiertem Hydroxylamin analog einer Literaturvorschrift zu **76** umgesetzt (Schema 3.13).^[128]



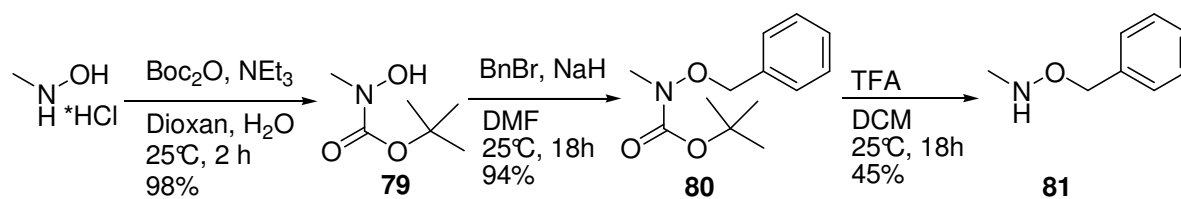
Schema 3.13

Um neutrale Cyclodextrinderivate mit Hydroxamsäuregruppen herzustellen, wurde wiederum auf Vorstufen zurückgegriffen, die terminale Alkylgruppen tragen, welche mit Aziden durch CuAAC verknüpft werden können. Zunächst wurde die strukturell einfachste hierfür einsetzbare Hydroxamsäure, welche auf Propiolsäure basiert, dargestellt. In einer Amidkupplungsreaktion in Gegenwart von Propiolsäure mit THP-geschütztem Hydroxylamin^[129] wurde zu der literaturbekannten Verbindung **77** umgesetzt. Die Schutzgruppe wurde anschließend unter Säurekatalyse abgespalten, wobei die freie Hydroxamsäure **28** erhalten wurde.^[130] Um den Einfluss des Abstands zwischen dem zu generierenden Triazolring und der Hydroxamsäure auf die Aktivität der Cyclodextrinderivate zu untersuchen, wurde neben Propiolsäure auch Pentinsäure als Startmaterial verwendet. Auf analogem Wege wurde die entsprechende Hydroxamsäure **32** erhalten (Schema 3.14).



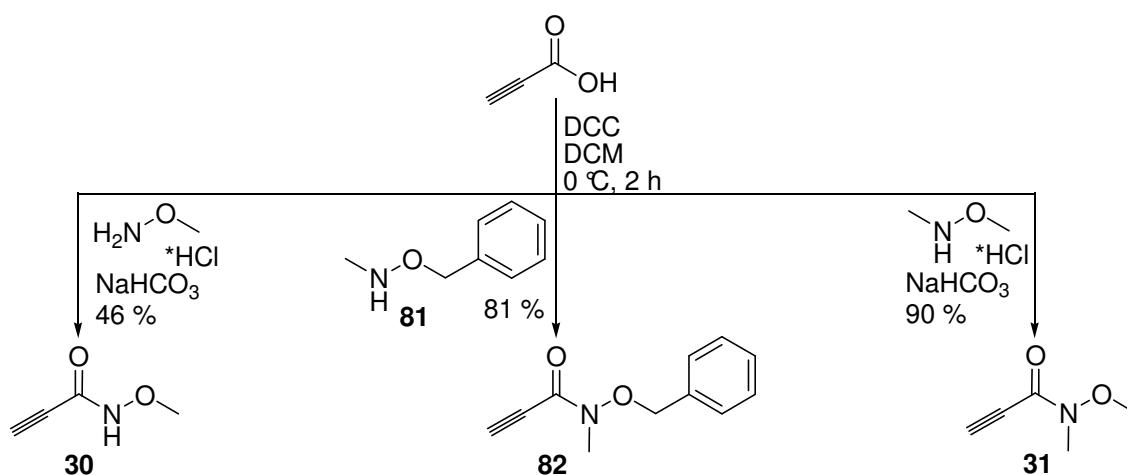
Schema 3.14

Weiterhin wurden methylierte Derivate von **28** dargestellt, die dazu verwendet werden sollten, Informationen über den Mechanismus des NOP-Abbaus zu erhalten. Durch selektive Methylierung am Sauerstoff, am Stickstoff oder an beiden Heteroatomen der Hydroxamsäure sollten Informationen erhalten werden, welches nucleophile Zentrum für die Reaktion mit den NOPs verantwortlich ist und ob Wasserstoffbrücken zwischen der N-H-Gruppe der Hydroxamsäure und dem Phosph(on)atsauerstoff eine Rolle spielen. Da es nicht möglich ist, auf Stufe der Hydroxamsäure selektiv Methylgruppen an den gewünschten Positionen einzuführen, musste von anderen Vorstufen ausgegangen werden. Um eine N-methylierte Verbindung darzustellen, war es erforderlich, ein entsprechend modifiziertes Hydroxylaminderivat zu synthetisieren. Dafür wurde N-Methylhydroxylaminhydrochlorid zunächst am Stickstoffatom mit einer Boc-Schutzgruppe nach einer modifizierten Literaturvorschrift versehen.^[131] Verbindung **79** konnte nach Deprotonierung durch Natriumhydrid und Umsetzung mit Benzylbromid in **80** überführt werden. Unter Standardbedingungen wurde die Boc-Schutzgruppe abgespalten wobei das sekundäre Amin **81** erhalten wurde.^[132]



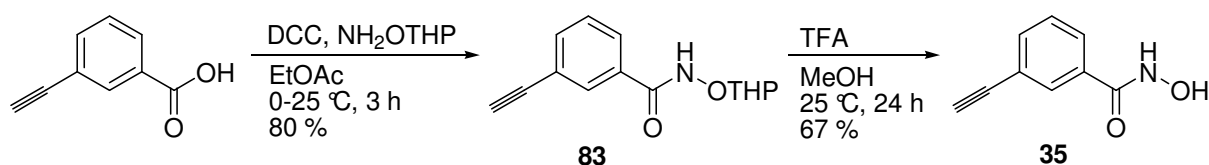
Schema 3.15

Verbindung **81** wurde nun mit Propiolsäure in Gegenwart von DCC als Kupplungsreagenz umgesetzt. Die erhaltene *N*-benzylierte Hydroxamsäure **82** wurde erst nach Kopplung an ein Cyclodextrin hydrogenolytisch debenzyliert. Die *O*-methylierte Hydroxamsäure **30** und *N,O*-dimethylierte Hydroxamsäure **31** wurden unter analogen Bedingungen aus kommerziell erhältlichen methylierten bzw. dimethylierten Hydroxylaminderivaten dargestellt (Schema 3.16).



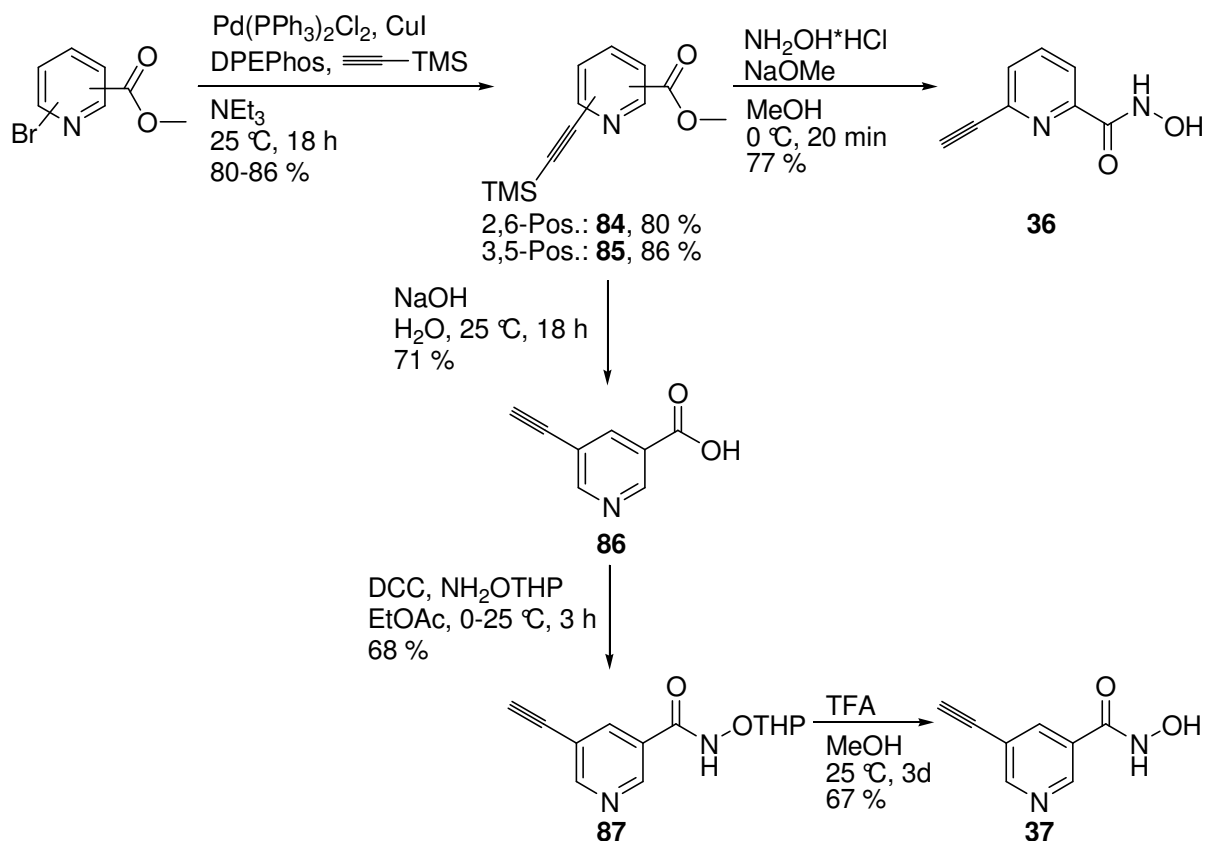
Schema 3.16

Neben der Modifikation der Hydroxamsäure durch Methylierung der Heteroatome besteht eine weitere Strukturvariation in der Verwendung aromatischer Gruppen zwischen dem zu bildenden Triazolring und der Hydroxamsäuregruppe. Entsprechend wurde die 3-Ethynylbenzolhydroxamsäure (**35**) in zwei Stufen aus der kommerziell erhältlichen 3-Ethynylbenzoesäure dargestellt. Nach einer modifizierten Literaturvorschrift wurde im ersten Schritt analog zur Synthese von **77** eine Amidkupplung mit THP-Hydroxylamin durchgeführt.^[133] Das Produkt **83** wurde dann unter Säurekatalyse entschützt, wobei die gewünschte Hydroxamsäure **35** erhalten wurde (Schema 3.17).^[133]



Schema 3.17

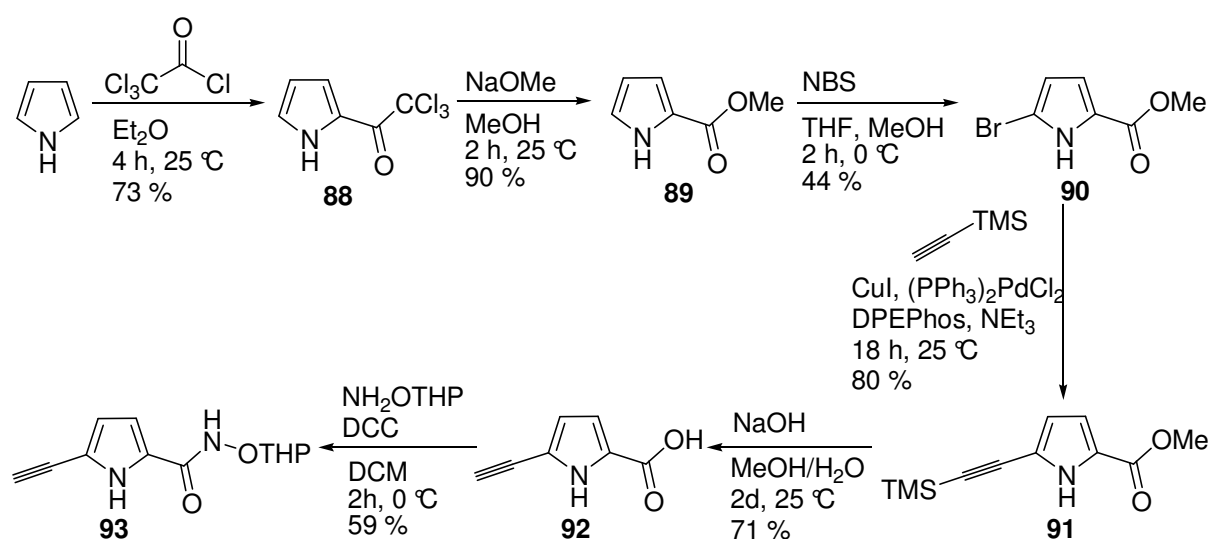
Ersetzt man den Benzolring in dieser Hydroxamsäure durch einen Pyridinring, verändert sich der pK_s -Wert der OH-Gruppe. So sind 2- und 3-Pyridinhydroxamsäure mit pK_s -Werten von 8.7^[134] und 8.3^[134] etwas acider als Benzolhydroxamsäure mit einem pK_s -Wert von 8.9.^[135] Um den Einfluss dieser Unterschiede auf die Abbaugeschwindigkeit von NOPs zu untersuchen, wurden entsprechende ethylierte Pyridinhydroxamsäuren hergestellt. Dazu wurde von den Brompyridincarbonsäuremethylestern ausgegangen, die zunächst durch Sonogashira-Hagihara-Reaktionen in die entsprechenden Alkine **84** und **85** überführt wurden. Das in 2,6-Position disubstituierte Pyridin konnte im Anschluss direkt mit Hydroxylamin zur gewünschten Hydroxamsäure **36** umgesetzt werden, wobei bei dieser Reaktion auch gleichzeitig die Trimethylsilylschutzgruppe am terminalen Alkin abgespalten wurde. Für das 3,5-disubstituierte Derivat wurde ebenfalls die direkte Umsetzung mit Hydroxylamin versucht, jedoch wurde in diesem Fall keinerlei Umsatz festgestellt. Aus diesem Grund musste ein synthetisch aufwendigerer Weg gewählt werden. Hierbei wurde zunächst der Ester hydrolysiert, wobei gleichzeitig auch die TMS-Schutzgruppe abgespalten wurde. Verbindung **86** wurde dann mit THP-Hydroxylamin zur THP-geschützten Hydroxamsäure **87** umgesetzt. Unter Säurekatalyse wurde abschließend die THP-Schutzgruppe abgespalten, wobei die Alkinhydroxamsäure **37** erhalten wurde (Schema 3.18).



Schema 3.18

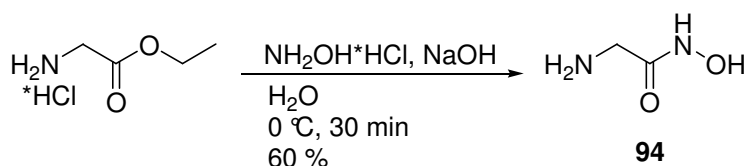
Neben elektronenarmen Pyridinderivaten sollte auch der Einfluss elektronenreicher, aromatischer Ringe an der Hydroxamsäuregruppe auf die Abbaugeschwindigkeit von NOPs untersucht werden. Hierfür sollten entsprechende Pyrrolderivate synthetisiert werden,

deren NH-Gruppe zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zu den P=O-Gruppen der NOPs ausbilden kann. Eine 2,5-disubstituierte Pyrrolhydroxamsäure mit zusätzlicher Ethinylgruppe konnte ausgehend von Pyrrol in einer 6-stufigen Synthese dargestellt werden. Im ersten Schritt wurde **88** durch Umsetzung von Pyrrol mit Trichloracetylchlorid erhalten. Nach Überführung in den Methylester **89** wurde mit NBS in 5-Position der Pyrroleinheit Brom eingeführt.^{[136][137]} Aus dem Produkt **90** konnte durch Sonogashira-Hagihara-Reaktion mit TMS-Acetylen das ethinylierte Derivat **91** dargestellt werden. Esterverseifung, bei der ebenfalls die Trimethylsilylschutzgruppe abgespalten wurde, gefolgt von Kupplung der freien Säure **92** mit THP-geschütztem Hydroxylamin in Gegenwart von DCC lieferte die THP-geschützte Hydroxamsäure **93** (Schema 3.19). Die THP-Schutzgruppe wurde in diesem Fall erst nach Kupplung von **93** an ein Cyclodextrinazid entfernt, da eine CuAAC-Reaktion zwischen der entschützten Form von **93** und einem Azid nicht erfolgreich war.



Schema 3.19

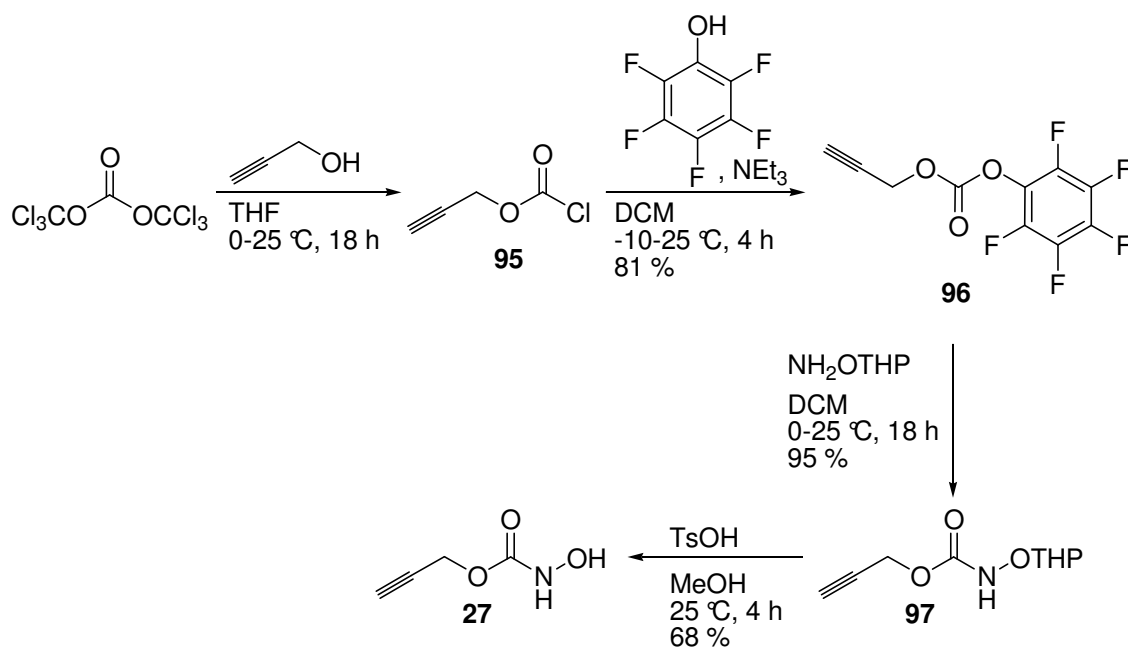
Verwendet man eine von Glycin abgeleitete Hydroxamsäure, stellt diese mit dem Amin, das zur Anknüpfung an ein Cyclodextrin unter Substitution eines Tosylats benötigt wird, auch einen Wasserstoffbrückendonator zur Verfügung. Ausgehend von Glycinethylester Hydrochlorid wurde durch Umsetzung mit Hydroxylamin unter basischen Bedingungen die entsprechende Glycinhydroxamsäure (**94**) erhalten (Schema 3.20).^[138]



Schema 3.20

Um zu untersuchen, inwieweit elektronenziehende Gruppen die Aktivität der Hydroxamsäuregruppe beeinflussen, wurden auch entsprechende *N*-Hydroxycarbamate in die Untersuchungen einbezogen. Als Ausgangsmaterial der Synthese wurde Triphosgen

verwendet, das mit Propargylalkohol unter Bildung des Kohlensäurechlorids **95** umgesetzt wurde. Behandlung von **95** mit Pentafluorphenol lieferte dann den Aktivester **96**.^[139] Zunächst wurde versucht, **96** mit Hydroxylamin direkt in das entsprechende *N*-Hydroxycarbamat umzuwandeln. Das gewünschte Produkt konnte zwar isoliert und spektroskopisch nachgewiesen werden, jedoch waren die Ausbeuten mit unter 10 % sehr gering. Aus diesem Grund wurde wieder auf das THP-geschützte Hydroxylamin zurückgegriffen, das mit **96** in sehr guten Ausbeuten zu Verbindung **97** umgesetzt werden konnte. Nach der säurekatalytischen Abspaltung der THP-Schutzgruppe wurde das gewünschte Produkt **27** erhalten (Schema 3.21).



Schema 3.21

Auf gleichem Wege wurde ausgehend von Thiophosgen auch die Synthese des entsprechenden Thiocarbamates versucht. Während die Synthese zum Analogon von **95** noch literaturbasiert^[140] durchgeführt werden konnte, wurde ab der zweiten Stufe keine Bildung der gewünschten Produkte mehr festgestellt.

3.2.3 Synthese der Scavenger

Die zur Synthese der Scavenger erforderliche Verknüpfung der Vorstufen der reaktiven Gruppen mit den Cyclodextrinderivaten wurde auf unterschiedliche Weisen realisiert. Vorstufen reaktiver Gruppen mit nucleophilen Gruppen wurden mit tosylierten oder halogenierten Cyclodextrinderivaten umgesetzt. Cyclodextrin **β 11₁**, das eine Aminogruppe trägt, wurde mit Verbindungen umgesetzt, die selbst Abgangsgruppen tragen. Alle Vorstufen mit Alkylgruppen wurden schließlich mittels CuAAC-Reaktionen mit Cyclodextrinen, die eine oder mehrere Azidgruppen tragen, verknüpft.

Synthese der Scavenger durch nucleophile Substitution

Neben den in Kapitel 3.2.2 beschriebenen reaktiven Gruppen wurde auch auf kommerziell erhältliche Nucleophile zurückgegriffen. Bei den kommerziell verfügbaren Verbindungen handelt es sich um Stickstoff- und Schwefelnucleophile, die mit aktivierten Cyclodextrinderivaten umgesetzt werden konnten. Daneben enthalten alle Verbindungen zusätzliche nucleophile Zentren, die den Abbau der NOPs induzieren sollen. Hierbei kann man zwischen Sauerstoffnucleophilen (**1**, **2**, **6**) und Stickstoffnucleophilen (**10**, **13**, **15**, **17**) unterscheiden.

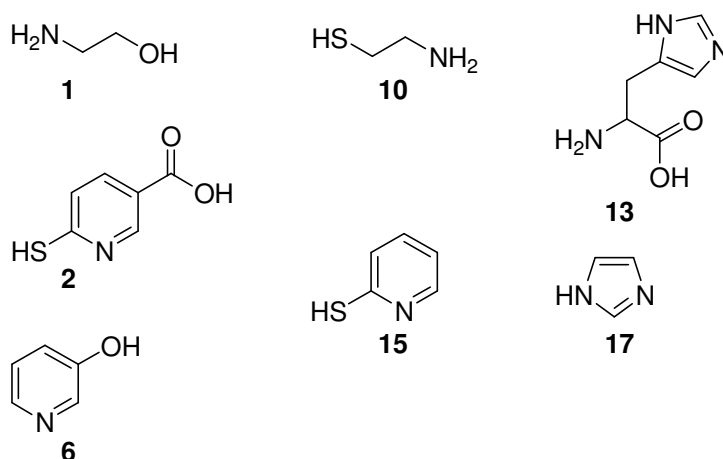
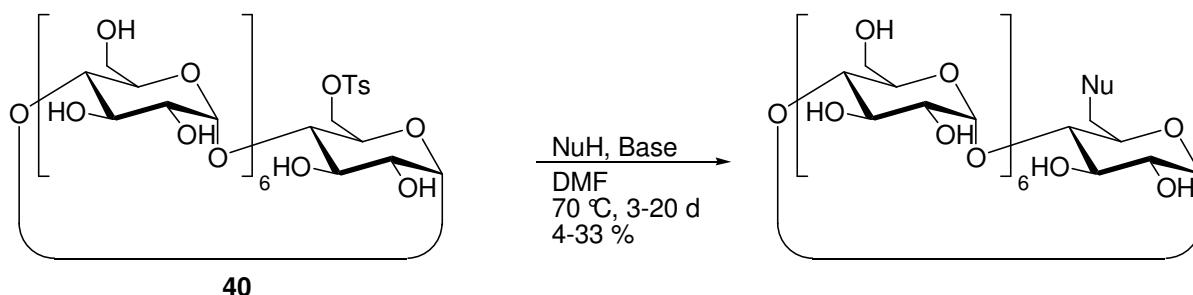


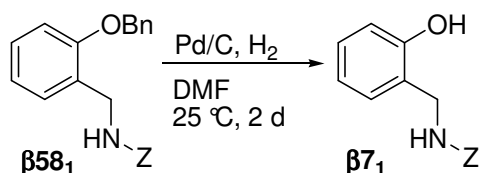
Abb. 3.1: Kommerziell erhältliche Nucleophile

Alle Synthesen wurden analog durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde stets DMF verwendet, da dieses als polar aprotisches Lösungsmittel für die S_N2 -Reaktion gut geeignet ist und zudem die Löslichkeit aller verwendeten Edukte garantiert. Handelte es sich bei der Umsetzung um ein Schwefelnucleophil, wurde eine Base in Form von Triethylamin oder Ammoniumhydrogencarbonat zugesetzt. Für die monosubstituierten Cyclodextrinderivate diente als Substrat das β -Cyclodextrinmonotosylat **40**. Bei Umsetzung von Nucleophil und Substrat bei 70 °C konnten innerhalb von typischerweise 3-20 Tagen die gewünschten Produkte nach Aufreinigung in Ausbeuten von 16-33 % analysenrein erhalten werden. In Schema 3.22 ist diese Reaktion in Form einer allgemeinen Reaktionsgleichung formuliert.



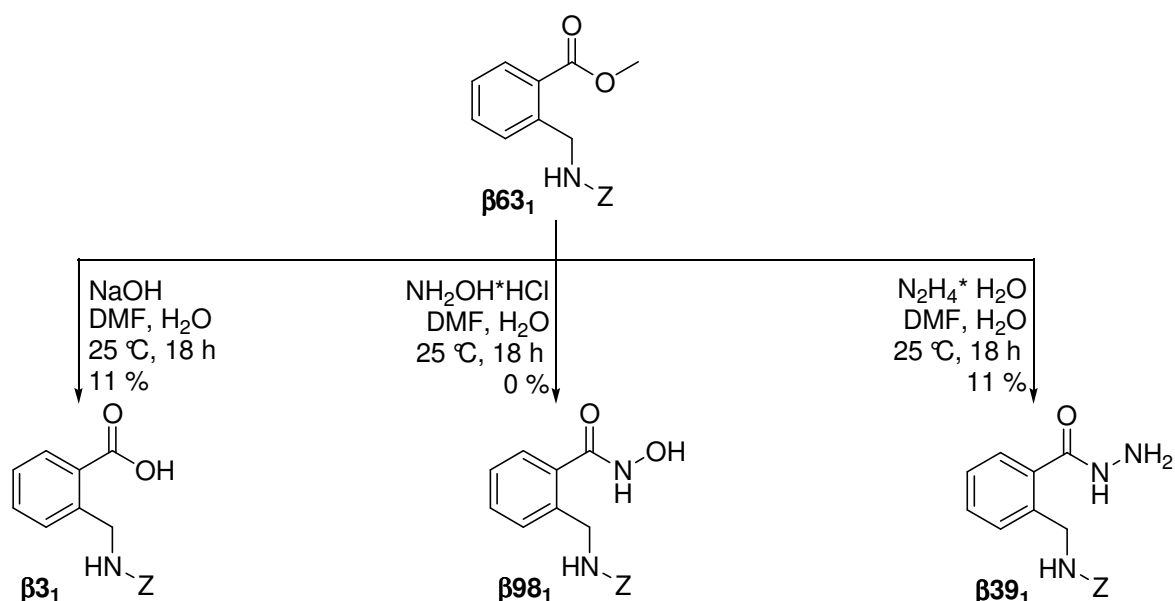
Schema 3.22

Verbindung **58** musste nach der nucleophilen Substitution mit Cyclodextrin **40** noch entschützt werden. Dies wurde hydrogenolytisch erreicht, wobei das freie Phenol **β7₁** entstand. (Schema 3.23).



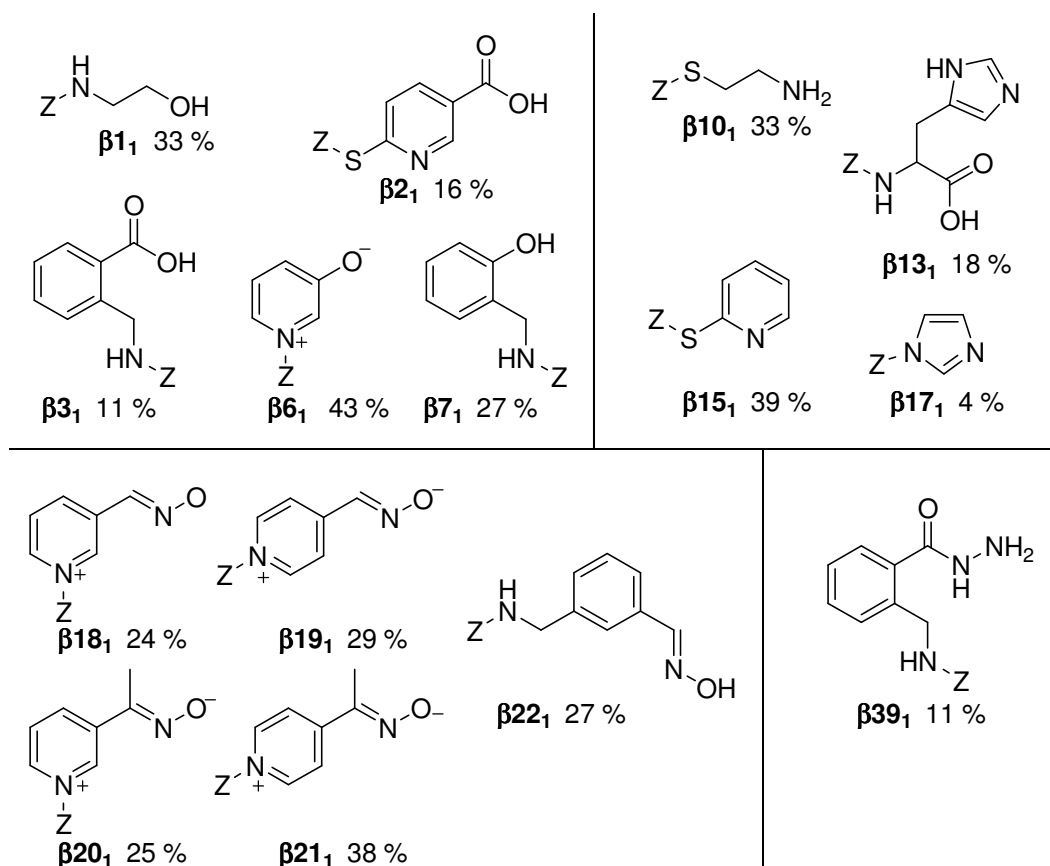
Schema 3.23

Der Ester von **63** wurde nach Reaktion mit **40** durch basische Esterverseifung zum Carboxylat **β3₁** gespalten. Weiterhin wurde **β63₁** mit Hydroxylamin bzw. Hydrazin zur Hydroxamsäure **β98₁** sowie zum Hydrazid **β39₁** umgesetzt (Schema 3.24). Dabei stellte sich heraus, dass die Überführung von **β63₁** direkt in die Hydroxamsäure **β98₁** nicht möglich war.



Schema 3.24

In Tab. 3.3 sind alle Zielverbindungen zusammengefasst, die durch Umsetzung geeigneter Nucleophile mit **40** im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich dargestellt werden konnten. Unter den Produkten sind neben bisher unbekanntem Verbindungen auch solche, die schon in der Literatur beschrieben sind. Sowohl **β1₁**,^[141] **β10₁**,^[142] **β15₁**,^[142] als auch **β17₁**,^[143] sind bereits beschrieben und wurden analog zur Literatur dargestellt.



Tab. 3.3: Erfolgreich synthetisierte Scavenger. Das Z steht als Platzhalter für eine Zuckereinheit, die in diesem Fall stets das monosubstituierte β -Cyclodextrin ist.

Die niedrigen bis mäßigen Ausbeuten aller Synthesen können auf mehrere Gründe zurückgeführt werden. Einerseits wurde beobachtet, dass während der meisten Reaktionen natives β -Cyclodextrin als Nebenprodukt gebildet wurde, was auf die Hydrolyse von **40** zurückzuführen ist. Weiterhin erwies sich die chromatographische Isolierung der Produkte häufig als schwierig. Anfallende Mischfraktionen wurden nicht weiter gereinigt, da für die folgenden Wirksamkeitsstudien trotz niedriger Ausbeuten in der Regel ausreichende Mengen sauberer Produkte erhalten werden konnten. Es sei schließlich erwähnt, dass die erhaltenen Ausbeuten typisch für die Darstellung von Cyclodextrinderivaten durch nucleophile Substitution sind und auch literaturbekannte Synthesen häufig Ausbeuten in ähnlicher Größenordnung liefern.

Neben den niedrigen Ausbeuten für manche Verbindungen, konnten manche Scavenger nicht dargestellt werden. Während die Pyridiniumderivate mit den Oxim- und Ketoximgruppen in 3- und 4-Position erfolgreich synthetisiert wurden, war die Synthese der entsprechenden in 2-Position substituierten Derivate nicht erfolgreich. Da in der Literatur die Umsetzung von Methyljodid mit 2-Pyridinaldoxim zu dem Reaktivator 2-PAM beschrieben ist, ist die nicht erfolgreiche Übertragung auf das Cyclodextrinsystem wahrscheinlich auf sterische Effekte zurückzuführen.^[144] Auch die Synthese von **β₇₆₁** konnte nicht realisiert werden, obwohl die Methylierung von Nicotinhydroxamsäure (**76**) ebenfalls in der Literatur beschrieben ist (Abb. 3.2).^[145]

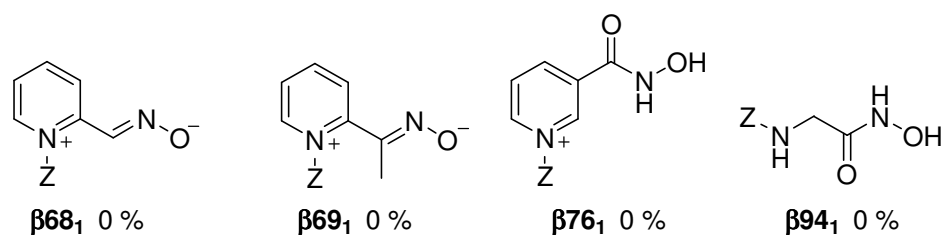


Abb. 3.2: Scavenger, die nicht dargestellt werden konnten. Z dient als Platzhalter für ein monosubstituiertes β -Cyclodextrin.

Ausgehend von dem Heptabromid **49** wurden die Verbindungen **$\beta 1_7$** ^[146] und **$\beta 15_7$** ^[142] erhalten. Das entsprechende α -Cyclodextrinderivat **$\alpha 15_6$** wurde aus **48** und 2-Thiopyridin (**15**) synthetisiert (Abb. 3.3).

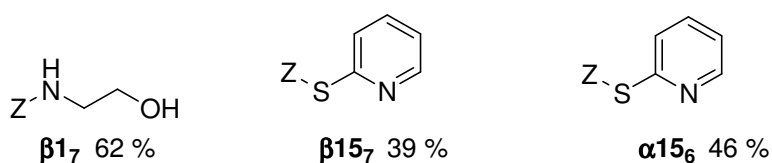


Abb. 3.3: Synthetisierte persubstituierte Cyclodextrinderivate. Z dient als Platzhalter für in C⁶-Position persubstituiertes α - oder β -Cyclodextrin.

Als Referenzsubstanzen für die Pyridiniumoxime und -ketoxime mit Cyclodextrinring wurden auch die entsprechenden Glucosederivate hergestellt. Hierfür wurde das Glucoseiodid **54** mit den jeweiligen Pyridinderivaten zu **$G 18_1$** , **$G 19_1$** und **$G 21_1$** umgesetzt. Das Ketoxim **$G 20_1$** konnte zwar spektroskopisch nachgewiesen werden, jedoch ist es bei dieser Verbindung nicht gelungen, die bei der Synthese gebildeten Nebenprodukte abzutrennen (Abb. 3.4).

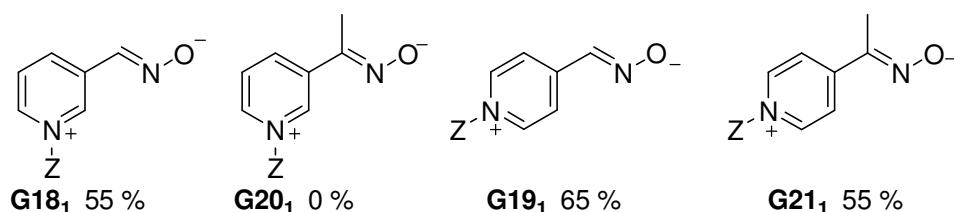
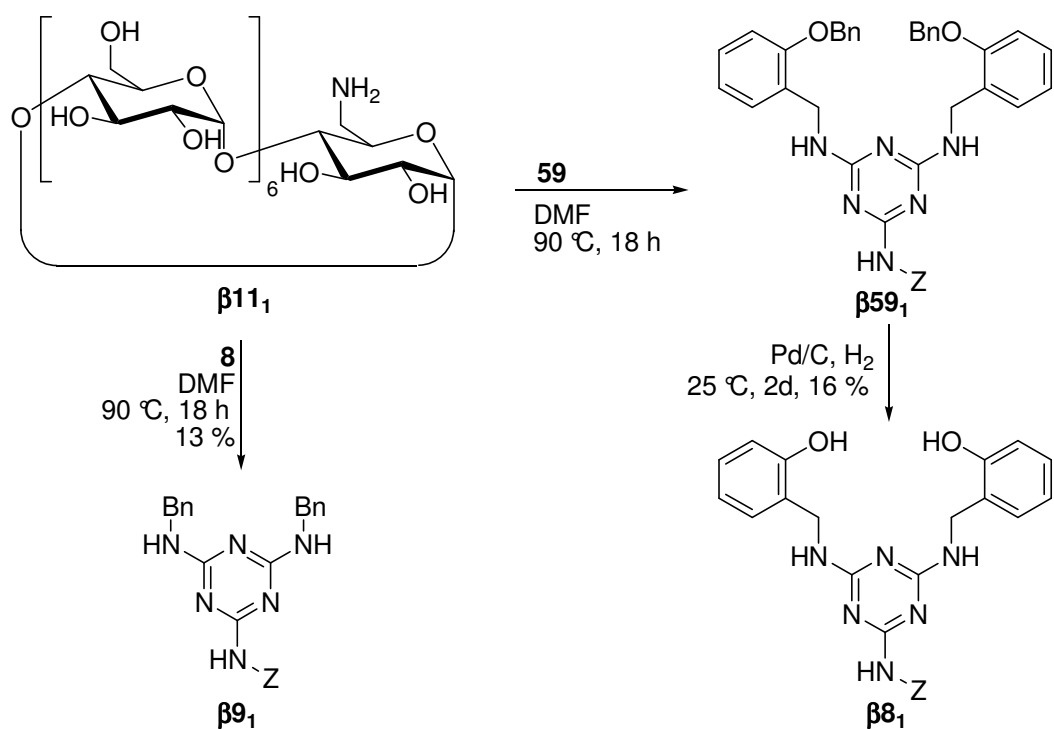


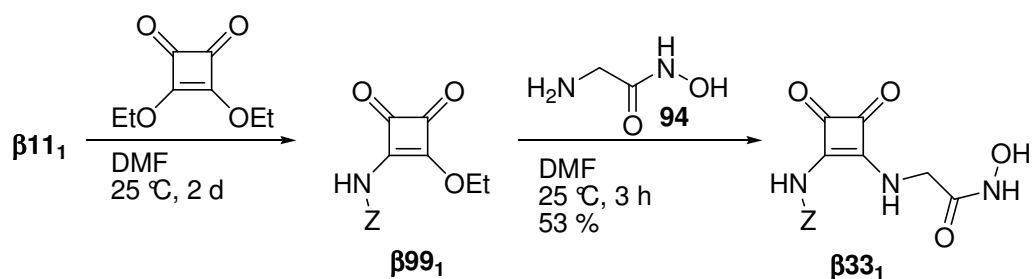
Abb. 3.4: Dargestellte Pyridiniumoxim und -ketoximderivate von α -D-Methylglucopyranosid. Z dient als Platzhalter für ein 6-substituiertes α -D-Methylglucopyranosid.

Ausgehend von Cyclodextrinamin **$\beta 11_1$** wurden weitere Derivate durch Umsetzung mit geeigneten Elektrophilen synthetisiert. So wurden aus **$\beta 11_1$** und den Cyanursäurederivaten **9** und **59** die Verbindungen **$\beta 9_1$** und **$\beta 59_1$** erhalten. Verbindung **$\beta 59_1$** wurde anschließend hydrogenolytisch unter Bildung des freien Phenols **$\beta 8_1$** debenzilyliert (Schema 3.25).



Schema 3.25

Auf analogem Wege wurde der Quadratsäurediethylester mit $\beta 11_1$ gekuppelt. In einem Folgeschritt wurde die verbleibende Esterfunktion der Verbindung $\beta 99_1$ durch Glycinhydroxamsäure (**94**) unter Bildung des Cyclodextrinderivats $\beta 33_1$ ersetzt (Schema 3.26).



Schema 3.26

Synthese der Scavenger durch CuAAC-Reaktionen

Für die Kopplung von potentiell reaktiven Gruppen an Cyclodextrine durch CuAAC wurde auf einige kommerziell erhältliche Alkine zurückgegriffen (Abb. 3.5).

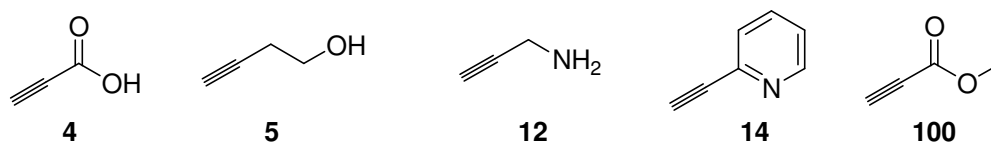
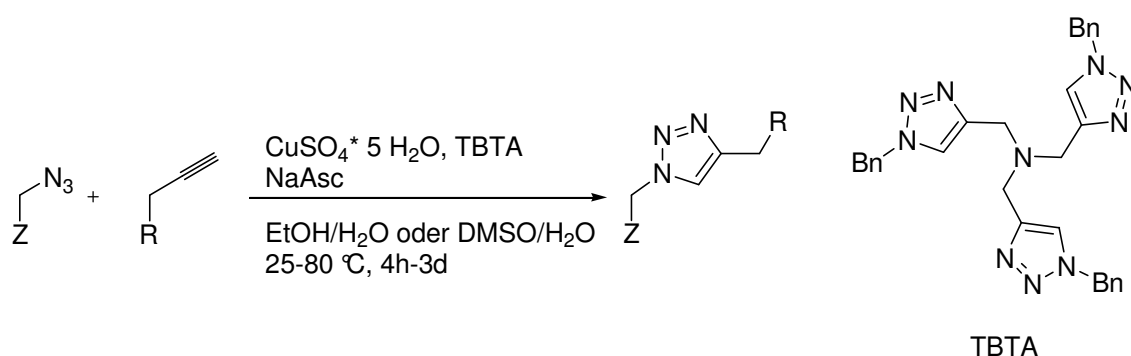


Abb. 3.5: Kommerziell erhältliche Alkine

In Schema 3.27 sind typische Reaktionsbedingungen für die durchgeführten CuAAC-Reaktionen angegeben. Als Kupferquelle wurde Kupfer(II)sulfat Pentahydrat eingesetzt, das *in situ* durch Natriumascorbat reduziert wurde. Weiterhin wurde Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA) zugesetzt, das als Ligand zur Stabilisierung der Kupfer(I)-Ionen diente.^[147] Testreaktionen mit Benzylazid und unterschiedlichen Alkinen zeigten, dass durch Einsatz des Liganden zum einen die Reaktionszeit verkürzt und zum anderen die Katalysatorbeladung auf 1 mol% reduziert werden konnte. In der Literatur werden als Lösungsmittel für CuAAC-Reaktionen meist wässrige Alkoholmischungen verwendet. Für die Cyclodextrine mit einer oder zwei Azidgruppen, **42** und **44**, sowie das Azidoglucopyranosid **56** wurde eine 1:1-Mischung aus Ethanol und Wasser verwendet, während bei den vollständig mit Azidgruppen substituierten Cyclodextrinen auf Grund der Löslichkeit in einer 1:4-Mischung aus Wasser und DMSO gearbeitet wurde.



Schema 3.27

Die in Abb. 3.5 gezeigten Alkine wurden entsprechend mit dem Cyclodextrinmonoazid **42** umgesetzt, wobei die in Abb. 3.6 gezeigten Cyclodextrinderivate gebildet wurden. Bei Verwendung des Alkins **4** wurde neben dem erwarteten Carbonsäurederivat **β4₁** auch die Bildung des Triazols **β16₁** beobachtet. Dieses entsteht wahrscheinlich durch Decarboxylierung von **β4₁**, wie für Triazolcarbonsäuren bei thermischer Behandlung bereits beschrieben.^[148] Allerdings sind auch Arylalkinylcarbonsäuren bei Reaktionstemperaturen von 60 °C in Anwesenheit von Cu(I) in der Lage zu decarboxylieren,^[149] sodass eine genaue Aussage, wann die Decarboxylierung bei der Bildung von **β16₁** erfolgt, nicht ohne weiteres möglich ist.

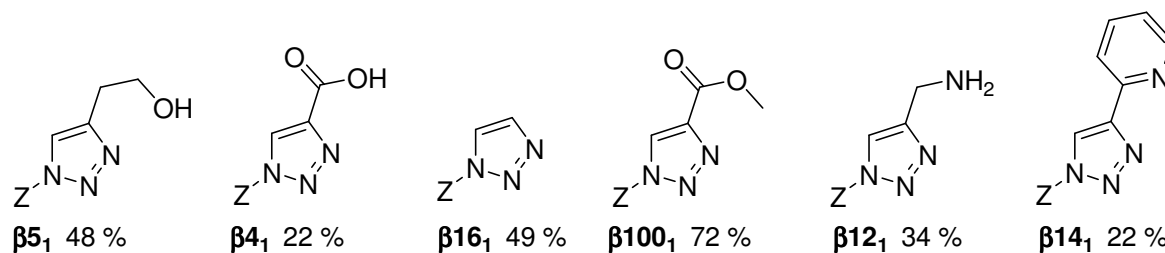
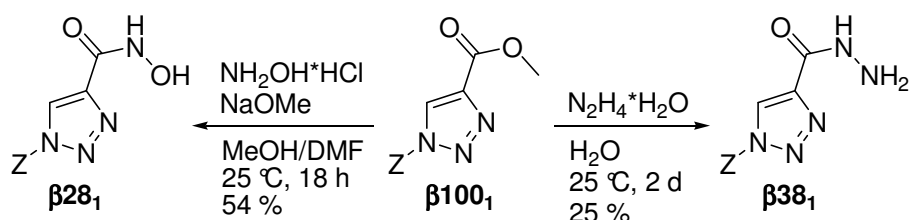


Abb. 3.6: Ausgehend von kommerziellen Alkinen synthetisierte Cyclodextrinderivate

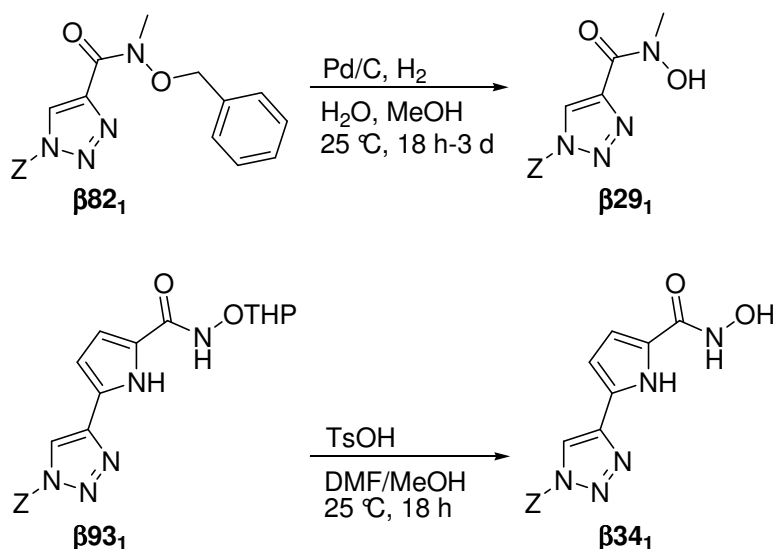
Der Carbonsäureester **$\beta 100_1$** wurde weiter in die entsprechende Hydroxamsäure **$\beta 28_1$** und das Hydrazid **$\beta 38_1$** überführt. Dazu wurde **$\beta 100_1$** mit *in situ* generiertem Hydroxylamin bzw. Hydrazinmonohydrat umgesetzt (Schema 3.28).



Schema 3.28

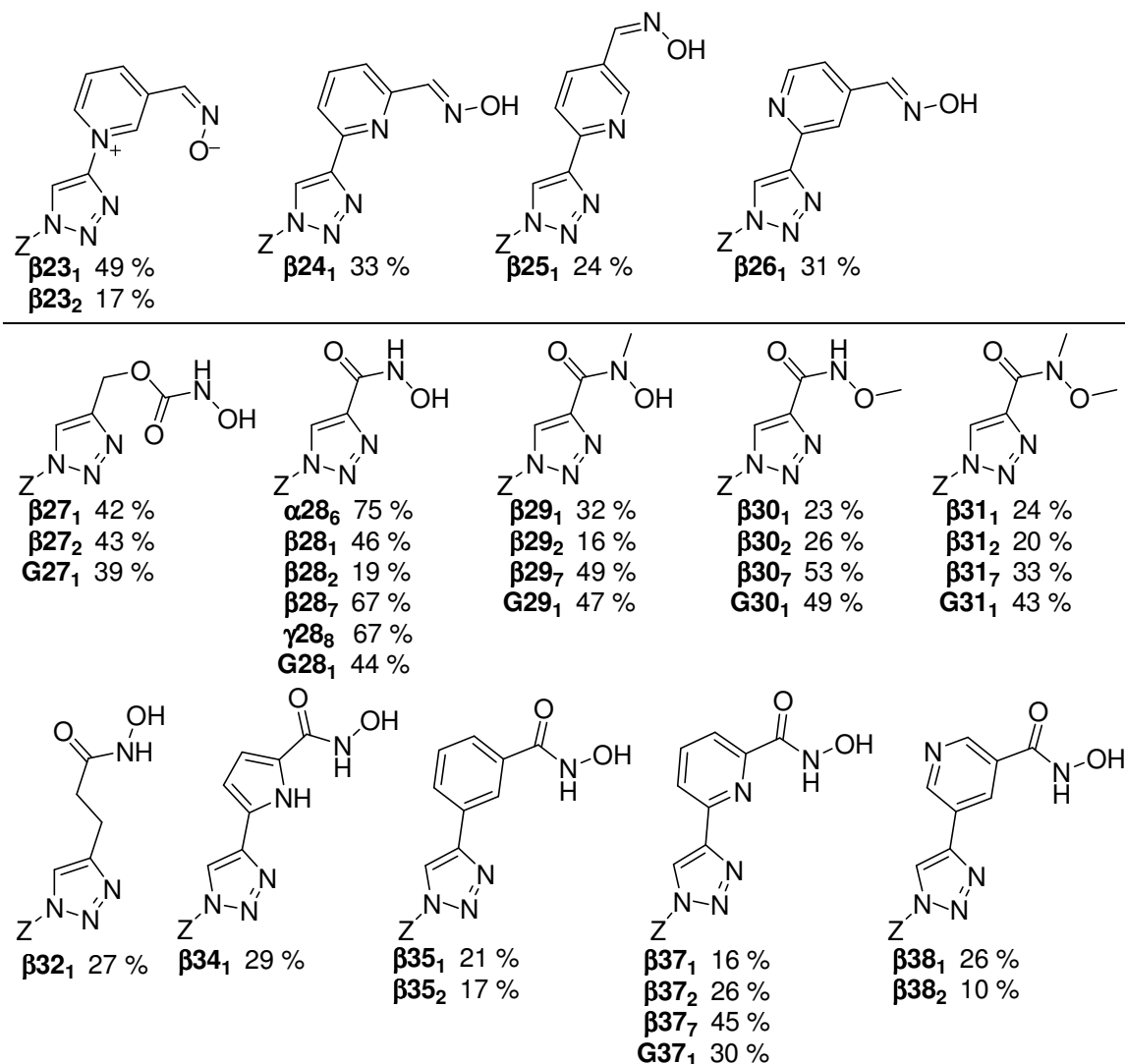
Das ^{13}C -NMR-Spektrum von **$\beta 28_1$** und **$\beta 38_1$** zeigte an, dass auf diesem Weg keine einheitlichen Produkte erhalten werden konnten. Aus diesem Grund war es erforderlich, einen Weg zu finden, diese Verbindungen in einheitlicher Form herzustellen. Eine Alternative besteht in der Synthese geeignet funktionalisierter Alkine, die dann mit einem gewünschten Azid verknüpft werden. Auf Grund der Probleme mit der Synthese von **$\beta 28_1$** wurde für alle weiteren Hydroxamsäuren dieser Weg gewählt.

Bei zweien der auf diesem Wege dargestellten Verbindungen war es nach der Kupplung an das Cyclodextrin oder die Glucose nötig, eine Entschützung durchzuführen. Die Benzylschutzgruppe des Hydroxamsäurederivats **$\beta 82_1$** wurde nach der CuAAC-Reaktion hydrogenolytisch abgespalten, woraus die *N*-methylierten Hydroxamsäuren **$\beta 29_1$** resultierte. Die Spaltung der THP-Schutzgruppe in **$\beta 93_1$** wurde unter sauren Bedingungen realisiert, wobei die Pyrrolhydroxamsäure **$\beta 34_1$** entstand (Schema 3.29). Die zweifach bzw. siebenfach substituierten β -Cyclodextrinderivate **$\beta 29_2$** und **$\beta 29_7$** , sowie das Glucosederivat **$G 29_1$** wurden auf analogen Wegen erhalten.



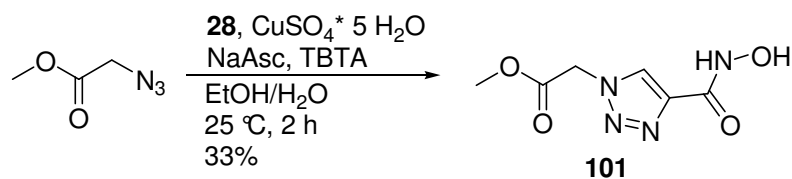
Schema 3.29

In Tab. 3.4 sind die synthetisierten Cyclodextrin- und Glucosederivate mit Hydroxamsäureeinheiten oder Oximgruppen zusammengefasst. Alle hier gezeigten Verbindungen wurden analysenrein erhalten, was durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie, MALDI-Massenspektrometrie und CHN-Verbrennungsanalyse bestätigt wurde.



Tab. 3.4: Mittels CuAAC-Reaktionen dargestellte Hydroxamsäuren und Oxime. Das Z ist Platzhalter für einen Zuckerrest aus Tabelle 3.1.

Um den Einfluss der Zuckerreste auf die Wirksamkeit der Verbindungen zu untersuchen, wurde auch eine Hydroxamsäure hergestellt, die als Rest am Triazolring einen Essigsäuremethylester trägt. Diese Hydroxamsäure **101** konnte ausgehend von Azidoessigsäure und der Hydroxamsäure **28** dargestellt werden (Schema 3.30).



Schema 3.30

3.2.4 Aufreinigung der synthetisierten Scavenger

Die Aufreinigung der hergestellten Scavenger erwies sich teilweise als schwierig. Während einige Glucosederivate über eine Kieselgelsäule mit einem Eluenten aus Dichlormethan und Methanol getrennt werden konnten, stellte die Reinigung der dargestellten Cyclodextrinderivate eine größere Herausforderung dar. Gerade bei der Umsetzung von β -Cyclodextrintosylat **40** mit Nucleophilen wurde in der Reaktionslösung oft natives β -Cyclodextrin nachgewiesen, das vermutlich durch Hydrolyse des Tosylats gebildet wurde.

In der Literatur sind zahlreiche Verfahren zur Trennung von Cyclodextringemischen beschrieben. Der Gebrauch von Nanofiltration unter Anwendung von molecular-weight-cutoff-Membranen stellt eine Möglichkeit dar, nicht abreagierte, niedermolekulare Edukte von den Produkten abzutrennen.^[150] Dieses Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, da zum einen die benötigten Filtrationsapparaturen nicht vorhanden waren und zum anderen die Abtrennung von freiem β -Cyclodextrin von dem gewünschten Produkt auf Grund des geringen Massenunterschieds unwahrscheinlich erschien. Andere Gruppen verwenden zur Produktreinigung die Größenausschlusschromatographie mit Sephadex als stationärer Phase, einem aus Polysacchariden aufgebauten Material.^[92] Dieses Verfahren wurde untersucht, jedoch zeigte sich, dass nicht die notwendige Trennleistung erreicht wurde und zudem lange Trennzeiten und hohe Lösungsmittelmengen benötigt wurden.

Erste Trennerfolge konnten mit einem von Estour und Mitarbeitern beschriebenen Verfahren erreicht werden.^[83] Hierbei wird das Cyclodextrinderivat über eine normale Kieselgelsäule unter Anwendung eines ternären Lösungsmittelgradienten getrennt. Als Eluenten kommen Ethylacetat, Isopropanol und Wasser zum Einsatz. Bei Reinigung von Cyclodextrinderivaten, die mit einem hohen organischen Anteil im Eluenten von der Kieselgelsäule eluieren, wurden zufriedenstellende Ergebnisse erhalten. Tragen die Cyclodextrine jedoch sehr polare Substituenten, wie z.B. primäre Amine oder Carboxylate, musste der wässrige Anteil erhöht werden. Dabei wurde auch das Kieselgel teilweise gelöst, sodass nach Entfernen des Lösungsmittels aus den Produktfraktionen noch Reste von Kieselgel entfernt werden mussten. Aus diesem Grund wurde von der Verwendung dieser Methode wieder Abstand genommen.

Die reversed-phase-Säulenchromatographie wird in der Literatur ebenfalls zur Aufreinigung von Cyclodextrinderivaten eingesetzt.^[151] Bei ersten Versuchen zur Verwendung dieses Verfahrens im Rahmen dieser Arbeit kam eine RP-8-Säule und ein Acetonitril/Wassergemisch als Eluenten zum Einsatz, dessen Zusammensetzung kontinuierlich verändert wurde. Erste Erfolge wurden erzielt, indem zunächst mit reinem Wasser eluiert wurde, sodass das Produktgemisch am Säulenbeginn fixiert wurde. Durch die folgende graduelle Erhöhung des Acetonitrilanteils im Elutionsmittel war es dann möglich, die einzelnen Verbindungen nacheinander zu eluieren. Ein Problem hierbei stellte die Tatsache dar, dass ebenfalls in der Reaktionsmischung vorhandenes freies β -Cyclodextrin nicht UV-aktiv ist und somit mittels UV-Detektor nicht nachgewiesen werden konnte. Daher wurde

3. Eigene Ergebnisse

über den Zeitraum der Messung das Eluat in Fraktionen gesammelt und diese mittels MALDI-Massenspektrometrie untersucht. Auf diese Weise wurde eine typische Retentionszeit für β -Cyclodextrin ermittelt. Diese unterschied sich deutlich genug von den Retentionszeiten der meisten synthetisierten Cyclodextrinderivate, sodass eine Trennung möglich war.

An einem Beispiel ist dies für das Chromatogramm von Verbindung $\beta 36_1$ gezeigt. Der Peak für das Produkt überlagert nicht mit dem Bereich, in dem β -Cyclodextrin eluiert (Abb. 3.7).

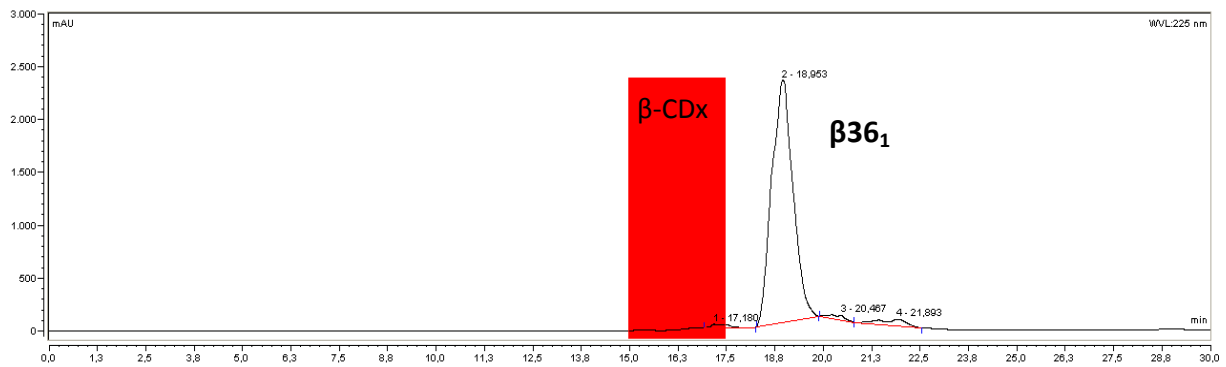


Abb. 3.7: Chromatogramm der Verbindung $\beta 36_1$. Die rot gekennzeichnete Fläche gibt den Bereich an, in dem β -Cyclodextrin von der Säule eluiert.

3. Eigene Ergebnisse

Ein weiteres Problem stellte die Aufreinigung der Pyridiniumoximate $\beta 18_1$, $\beta 19_1$, $\beta 20_1$, $\beta 21_1$, $\beta 23_1$ und $\beta 23_2$ dar. Unter den oben beschriebenen Bedingungen konnten keine scharfen Peaks in den Chromatogrammen erhalten werden. Wurde der wässrigen Phase jedoch 0.1 % einer 25 %-igen Ammoniaklösung zugesetzt, führte dies zu einer signifikanten Verbesserung der Qualität der Chromatogramme. Am Beispiel von $\beta 18_1$ ist dies in Abb. 3.8 dargestellt. Aus dem wenig aussagekräftigen Chromatogramm vor Zugabe von Ammoniak zum Eluenten konnte nach dessen Zugabe bei 17.3 Minuten ein Peak identifiziert werden, der Verbindung $\beta 18_1$ zugeordnet wurde.

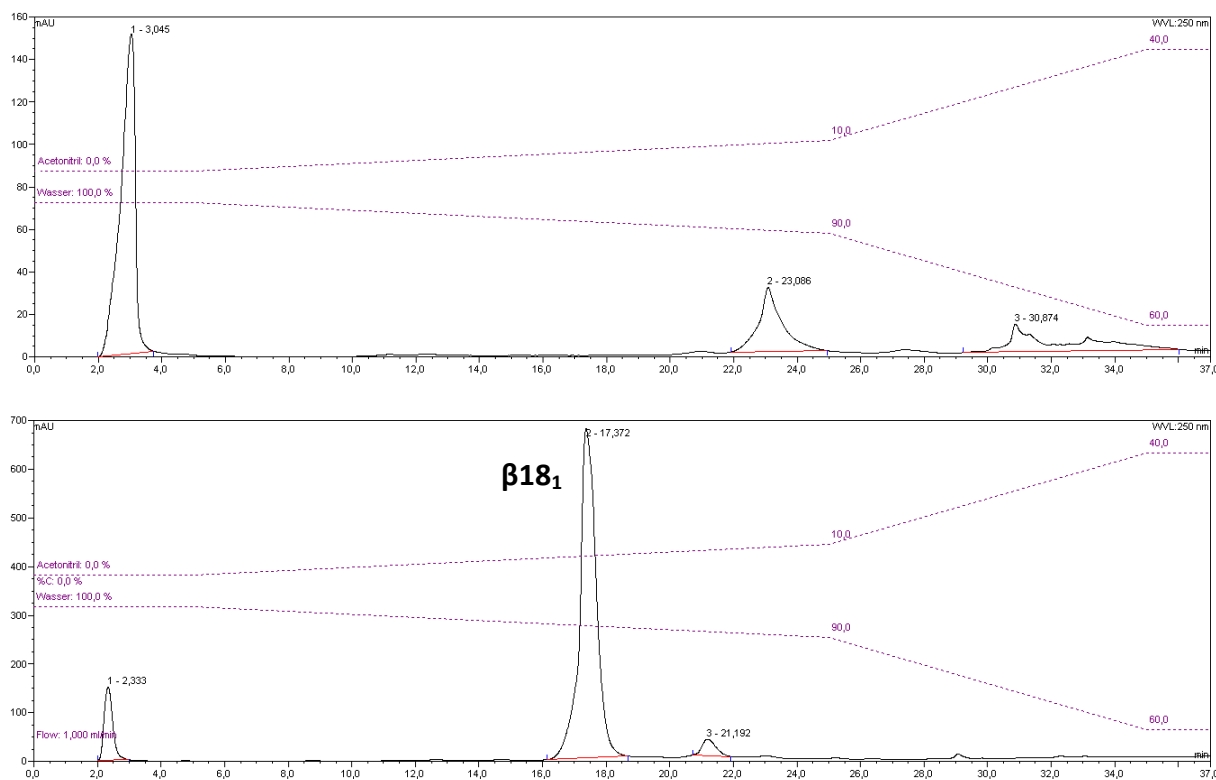


Abb. 3.8: Chromatogramm von $\beta 18_1$ ohne Ammoniak im Laufmittel (oben) und entsprechendes Chromatogramm mit Ammoniak im Laufmittel (unten).

Je nach Substanzklasse standen mit den beiden beschriebenen chromatographischen Methoden leistungsfähige Verfahren zur Verfügung, die die Reinigung der dargestellten Verbindungen bis zur Analysenreinheit gestatteten. Hierfür wurde eine semipräparative HPLC-Anlage mit Fraktionensammler verwendet, wodurch die Aufreinigung automatisiert werden konnte.

3.3 Ergebnisse

Alle in dieser Arbeit dargestellten Cyclodextrin- und Glucosederivate wurden auf ihre Fähigkeit getestet, neurotoxische Organophosph(on)ate abzubauen. Dazu wurde die Hydrolyseaktivität dieser Verbindungen mittels eines Enzymassays sowie eines GC-MS-Assays quantifiziert. Mittels NMR-Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie wurde zudem versucht, für einige ausgewählte Kombinationen aus NOP und Scavenger den Abbaumechanismus aufzuklären. Diese Untersuchungen wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München durchgeführt. Da Nervenkampfstoffe dem Chemiewaffenübereinkommen unterliegen und darüber hinaus hochtoxisch sind, gibt es nur wenige Laboratorien, denen der Umgang mit solchen Substanzen zu Forschungszwecken gestattet ist. Das Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr verfügt über eine solche Sondergenehmigung sowie die nötigen Sicherheitsstandards. Die für die Untersuchungen verwendeten Methoden wurden an diesem Institut entwickelt und von Herrn Dr. Florian Brandhuber während seiner Dissertation zum Teil auf die hier untersuchten Systeme angepasst.^{[152][153][154]}

3.3.1 Messmethoden zur Bestimmung der Abbauaktivität

Die Aktivität der dargestellten Scavenger auf den Abbau von NOPs wurde mit Hilfe von drei verschiedenen Methoden bestimmt. Alle Verbindungen wurden einem Aktivitätsscreening unterzogen. Scavenger die sich durch hohe Wirksamkeit auf den NOP-Abbau auszeichneten, wurden dann kinetischen Untersuchungen unterzogen. Dabei stand zum einen ein Enzymassay zur Verfügung, mit dem die Geschwindigkeitskonstanten sowie die Halbwertszeit des NOP-Abbaus bestimmt werden konnten. Weiterhin konnte mittels eines chiralen GC-MS-Assays untersucht werden, ob ein NOP enantioselektiv abgebaut wird.

Aktivitätsscreening

Um einen ersten Eindruck von der Wirksamkeit der dargestellten Verbindungen auf den Abbau von NOPs zu erhalten, wurden alle Verbindungen einem Aktivitätsscreening unterzogen. Als repräsentative NOPs kamen hierbei die vier Verbindungen Cyclosarin (GF), Tabun (GA), VX und Paraoxon-Ethyl (PXE) zum Einsatz (Abb. 3.9). Während GF, GA und VX Nervenkampfstoffe sind, handelt es sich bei Paraoxon-Ethyl um ein Insektizid. Letzteres wurde in die Untersuchungen mit einbezogen, um zu sehen, ob Cyclodextrin-basierte Scavenger auch zur Behandlung von NOP-Vergiftungen eingesetzt werden können, die im zivilen Bereich auftreten.

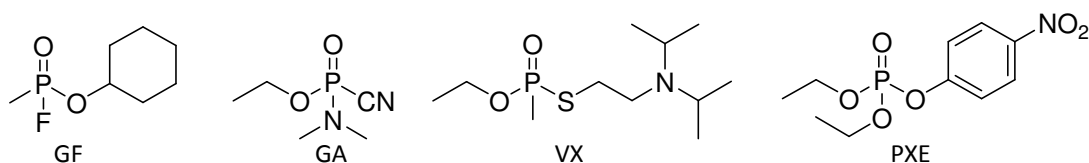


Abb. 3.9: In den Tests zur Hydrolyseaktivität eingesetzte Organophosph(on)ate

Der durchgeführte Test setzt das Ausmaß der Acetylcholinesterasehemmung durch ein NOP mit der Hemmung der AChE ins Verhältnis, die resultiert, wenn dasselbe NOP zuvor mit einem potentiellen Scavenger inkubiert wurde. Der daraus erhaltene Wert gibt Aufschluss über die Effizienz des eingesetzten Scavengers.^[152]

Enzymassay zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten

Um nähere Informationen über die Abbaugeschwindigkeiten zu erhalten, wurden Scavenger, die im Aktivitätsscreening hohe Aktivität zeigten, einem quantitativen Enzymassay unterzogen. Dabei konnten Geschwindigkeitskonstanten des NOP-Abbaus sowie entsprechende Halbwertszeiten bestimmt werden.^{[154][155]}

Enantioselektive Bestimmung des NOP-Abbaus

Da NOPs am Phosphoratom ein stereogenes Zentrum enthalten und dadurch in zwei enantiomeren Formen vorliegen, die unterschiedliche Toxizitäten aufweisen, war es weiterhin interessant zu untersuchen, ob eines der Enantiomere bevorzugt abgebaut wird. Dazu wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr ein enantioselektiver GC-MS-Assay entwickelt, mit dem die Abbaukinetiken der beiden Enantiomere getrennt verfolgt werden konnten.^[82]

3.3.2 Ergebnisse der Messungen

Alle Daten zur Bestimmung der Abbauaktivität wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München generiert. Die erhaltenen Messwerte sind Gegenstand der Dissertation^[154] von Herrn Dr. Florian Brandhuber oder aktuellen Arbeiten von Frau Anne Bierwisch, weshalb sie an dieser Stelle nicht im Einzelnen aufgeführt werden sollen. Die auf Basis dieser Werte resultierenden Eigenschaften der hergestellten Verbindungen werden im folgenden Kapitel im Zusammenhang diskutiert.

4. Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Wirksamkeitsstudien, geordnet nach den reaktiven Einheiten der Scavenger, beschrieben. Ein Großteil der Ergebnisse wurde bereits in drei Publikationen veröffentlicht, die in dieses Kapitel mit eingebunden sind.

4.1 Vorbemerkungen zum Paraoxonabbau

Im Rahmen des Aktivitätsscreenings wurde stets Paraoxon-Ethyl als Referenzsubstanz für ein zivil genutztes NOP mit untersucht. Allerdings konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Scavenger identifiziert werden, die in der Lage sind, Paraoxon-Ethyl abzubauen. Die fehlende Wirksamkeit der Verbindungen auf den Abbau dieses NOP kann mehrere Ursachen haben. Zunächst muss berücksichtigt werden, dass unter den Bedingungen des Aktivitätsassays das Verhältnis von Scavenger/Paraoxon mit ca. 1:8 deutlich ungünstiger ist als bei anderen NOPs, bei denen ein bis zu 500-facher Überschuss des Scavengers eingesetzt wurde. Dadurch macht sich ein potentieller Effekt des Scavengers auf den Paraoxonabbau weniger gut bemerkbar. Allerdings zeigen Untersuchungen von Herrn Dr. Florian Brandhuber, dass auch bei Erhöhung der Scavengerkonzentration PXE nicht signifikant schneller abgebaut wird.^[154] Das Ausbleiben eines Effektes ist also keine Konsequenz der Messbedingungen, sondern zeigt, dass alle untersuchten Scavenger bezüglich des PXE-Abbaus tatsächlich inaktiv zu sein scheinen. Da auf Grund der Struktur von PXE eigentlich mit einer Wechselwirkung mit β -Cyclodextrin zu rechnen ist – *p*-Nitrophenol bindet mit einer Bindungskonstante von 350 mol^{-1} in Wasser an β -Cyclodextrin^[48] – muss man annehmen, dass die nucleophilen Gruppen der Scavenger nicht in räumliche Nähe des Phosphoratoms von PXE in den gebildeten Komplexen gelangen. In der Tat zeigen Arbeiten von Herrn Luzian Porwol während seiner Diplomarbeit, dass Cyclodextrinderivate mit Hydroxamsäuregruppen entlang des weiteren Rands des β -Cyclodextrinrings eine merkliche, wenn auch immer noch geringe beschleunigende Wirkung auf den PXE-Abbau besitzen.^[91] Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass das PXE-Molekül bevorzugt mit dem Phosphoratom in der Nähe der sekundären OH-Gruppen der Glucoseeinheiten im β -Cyclodextrin angeordnet ist. Zukünftige Arbeiten zur Entwicklung von PXE-Scavengern sollten sich daher insbesondere auf β -Cyclodextrinderivate konzentrieren, die in C²- oder C³-Position substituiert sind.

4.2 Abbau von NOPs durch Stickstoff- und Sauerstoffnucleophile

Der durchgeführte Aktivitätsassay zeigte für alle Stickstoff- und Sauerstoffnucleophile einen positiven Einfluss auf den Abbau von GF, während jedoch sowohl GA und VX von keinem dieser Nucleophile in signifikantem Maße abgebaut wurde.

Im Falle von GF war bereits ein beschleunigter Abbau in Gegenwart von nativem β -Cyclodextrin zu beobachten, wohingegen bei α - und γ -Cyclodextrin ein solcher Effekt nicht beobachtet wurde. Auch andere Autoren beschrieben eine beschleunigende Wirkung von nativen Cyclodextrinen auf den Abbau von NOPs. Nach Befunden von van Hooijdonk wird Sarin beispielsweise in Gegenwart von α -Cyclodextrin beschleunigt entgiftet.^[75] Auf Grund des größeren Cyclohexylrests in GF scheint dieses NOP eher mit β -Cyclodextrin zu

wechselwirken. In einem aus GF und β -Cyclodextrin wahrscheinlich gebildeten Komplex scheint eine OH-Gruppe entlang des Cyclodextrinrings gut zum Phosphoratom des NOPs angeordnet zu sein, sodass ein nucleophiler Angriff erfolgen kann. Die geringere Aktivität von α - und γ -Cyclodextrin kann mit einer schwächeren Wechselwirkung von Cyclosarin mit diesen Cyclodextrinen und/oder ungünstigeren Komplexgeometrien zusammenhängen. Um die Wirksamkeit von nativem β -Cyclodextrin zu erhöhen, wurden Derivate dargestellt, die azidere Hydroxygruppen besitzen. Diese sollten bei physiologischem pH-Wert in größerem Anteil deprotoniert sein und somit eher nucleophil an einem Phosph(on)at angreifen. Aus diesem Grund wurden die Verbindungen $\beta 6_1$ und $\beta 7_1$ dargestellt, die mit einem pK_s -Wert von $4.96^{[156]}$ (für *N*-Methyl-3-hydroxypyridinium) und $9.88^{[157]}$ (für Phenol) unterhalb bzw. näher am physiologischen pH-Wert liegen. Bei Verbindung $\beta 7_1$ ist es zudem denkbar, dass die im Molekül vorhandene sekundäre Aminogruppe die Phenol OH-Gruppe intramolekular unter Ausbildung eines 6-gliedrigen Übergangszustands deprotonieren kann (Abb. 4.1).

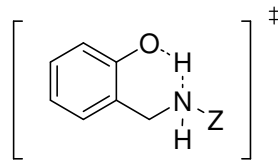


Abb. 4.1: Postulierter 6-gliedriger Übergangszustand der Deprotonierung in $\beta 7_1$.

Diese Verbindungen beschleunigen zwar den Abbau von GF gegenüber nativem β -Cyclodextrin, jedoch zeigt Verbindung $\beta 1_1$ mit einer aliphatischen Hydroxygruppe ein analoges Verhalten. Auffallend ist weiterhin, dass die Kombination von zwei nucleophilen Gruppen in $\beta 8_1$ zu einem Rückgang der Wirksamkeit im Vergleich zu nativem β -Cyclodextrin führt. Dies könnte daran liegen, dass die Melamineinheit die Struktur flexibel genug für die Einlagerung einer Phenoleinheit in den Cyclodextrinhohlraum macht, sodass eine NOP-Komplexierung verhindert wird (Abb. 4.2). Dies führt in der Folge zu geringen Abbauraten.

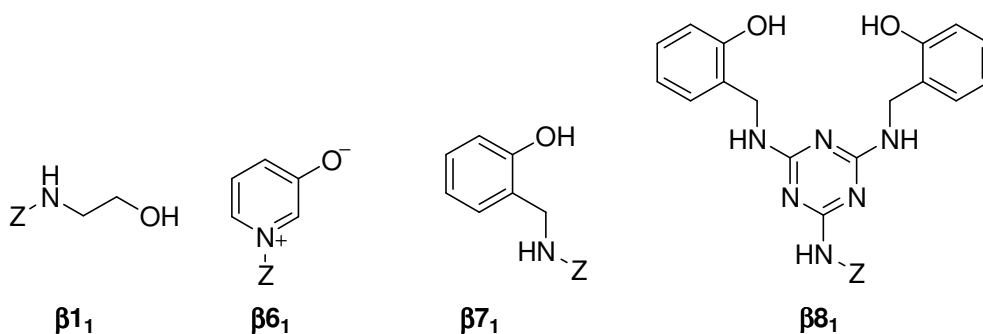


Abb. 4.2: Scavenger mit O-Nucleophilen

Neben den Scavengern mit O-Nucleophilen zeigten auch die Scavenger mit N-Nucleophilen keinen signifikanten Einfluss auf den Abbau eines der untersuchten NOP. Die meisten der untersuchten Verbindungen waren in der Lage, die Entgiftung von GF zu beschleunigen. Allerdings wurde für einige Verbindungen auch beobachtet, dass der GF-Abbau in ihrer Gegenwart langsamer verläuft als in Gegenwart von nativem β -Cyclodextrin. Insbesondere gilt dies für Cyclodextrinderivate, in denen alle OH-Gruppen am primären Rand substituiert

sind. Im Fall der Verbindungen **$\beta 15_7$** und **$\alpha 15_6$** ist der verlangsamte GF-Abbau wahrscheinlich auf die schlechte Löslichkeit der beiden Verbindungen in wässrigem TRIS-Puffer zurückzuführen. Dadurch ist die Scavengerkonzentration in Lösung herabgesetzt und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich unlösliche Scavenger-Cyclosarinkomplexe bilden, die aus dem Reaktionsmedium ausfallen und somit die Messung verfälschen.

Breslow und Mitarbeiter beobachteten, dass Cyclodextrine mit Imidazoleinheiten die Hydrolyse von cyclischen Phosphaten beschleunigen.^[63] Im Rahmen dieser Arbeit konnte für das Imidazolderivat **$\beta 17_1$** keine derartige Beschleunigung des NOP-Abbaus gefunden werden (Abb. 4.3).

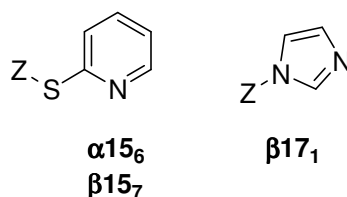
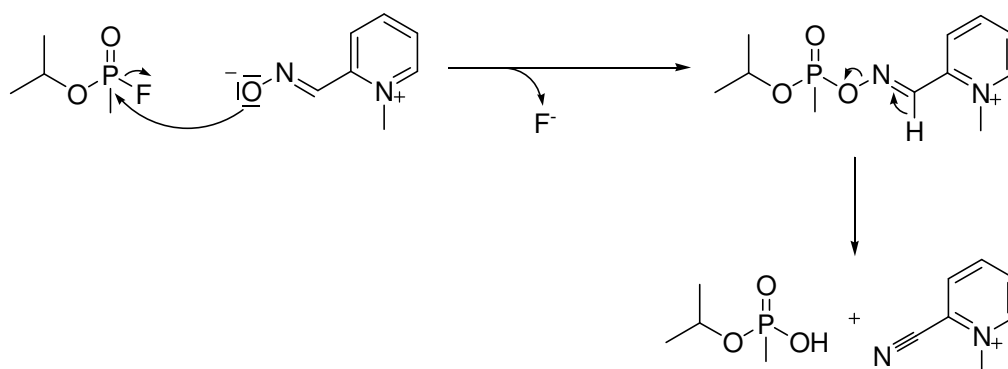


Abb. 4.3: Scavenger mit N-Nucleophilen

4.3 Abbau von NOPs durch Oxime

Oxime finden in der Therapie von NOP-Vergiftungen schon seit langer Zeit Verwendung. Die beiden in Deutschland zugelassenen Reaktivatoren Pralidoxim und Obidoxim für durch NOPs inhibierte AChE sind ebenfalls Oxime.^[24] Neben ihrer reaktivierenden Wirkung auf inhibierte AChE ist von Oximen bekannt, dass sie in wässrigem Medium auch direkt mit einem NOP reagieren können.^[158] Dabei findet in Folge des nucleophilen Angriffs des Oximats auf das Phosphoratom die Abspaltung einer Abgangsgruppe statt. Es entsteht ein phosphonyliertes Oxim,^[159] das in Abhängigkeit der Azidität des Carbonyliminoprotons eine hohe Stabilität aufweisen kann.^[160] Je höher die Azidität dieses Protons ist, umso leichter wird es allerdings in wässrigem Medium abgespalten, wodurch die Eliminierung eines Nitrils unter Freisetzung einer Phosphonsäure resultiert (Schema 4.1).^[161] Die gebildeten Nitrile können unter Abspaltung von Cyanid-Anionen weiter zerfallen.^[162]



Schema 4.1

Von den phosphonylierten Derivaten vieler auf Oximen basierender AChE-Reaktivatoren ist bekannt, dass sie eine hohe Toxizität besitzen, da sie AChE wiederum inhibieren können.^[163]

Für Reaktivatoren, die zwei aromatische Einheiten besitzen, wie z. B. Obidoxim, kann die Hemmwirkung des phosphonylierten Derivats sogar die des zu Grunde liegenden NOPs übersteigen.^[164] Dieser Effekt beruht auf der Rückübertragung des Phosphonatrests von einem Phosphonyloxim auf die AChE.^[161] Die Entwicklung von Scavengern auf Oximbasis ist also nicht unproblematisch, da phosphonylierte Oxime prinzipiell toxisch sein können. Allerdings ist auf Grund des sterischen Anspruchs des Cyclodextrinrings in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Scavengern nicht mit einer Bindung an AChE zu rechnen.

4.3.1 Abbau von GF durch Scavenger mit Oxim- und Ketoximgruppen

Die in Kapitel 4.3 beschriebene Direktreaktion zwischen Oxim und NOP motivierten zu der Untersuchung, ob β -Cyclodextrine mit Oxim- und Ketoximgruppen ebenfalls eine solche Direktreaktion eingehen können und den Abbau von NOPs beschleunigen können.

Besonders vielversprechende Ergebnisse wurden in diesem Zusammenhang bezüglich des Abbaus von GF erhalten. Diese Ergebnisse wurden in der folgenden Publikation im Beilstein Journal of Organic Chemistry zusammengefasst.

Meine Aufgabe im Rahmen dieser Publikation bestand in der Entwicklung und Synthese der Scavenger. Florian Brandhuber war für die Entwicklung und Durchführung des quantitativen und qualitativen Enzymassays verantwortlich. Christian Schneider hat im Rahmen eines Forschungspraktikums unter meiner Betreuung einige der beschriebenen Scavenger synthetisiert. Die Aufgabe von Herrn Worek bestand in der Koordination und wissenschaftlichen Betreuung der Arbeiten am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr. Herr Reiter hat den chiralen Aktivitätsassay entwickelt und war an den Messungen beteiligt. Herr Kubik war als Projektleiter für die Koordination und wissenschaftliche Betreuung an der Technischen Universität Kaiserslautern verantwortlich.

Publikation:

Highly efficient cyclosarin degradation mediated by a β -cyclodextrin derivative containing an oxime-derived substituent

M. Zengerle, F. Brandhuber, C. Schneider, F. Worek, G. Reiter, S. Kubik, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, 7, 1543-1554.

Reproduced by permission of Beilstein Journals.

Highly efficient cyclosarin degradation mediated by a β -cyclodextrin derivative containing an oxime-derived substituent

Michael Zengerle¹, Florian Brandhuber², Christian Schneider¹, Franz Worek², Georg Reiter² and Stefan Kubik^{*1}

Full Research Paper

Open Access

Address:

¹Fachbereich Chemie - Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße, D-67663 Kaiserslautern, Germany, Fax: +49-631-205-3921 and ²Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, Neuherbergstraße 11, D-80937 München, Germany

Email:

Stefan Kubik* - kubik@chemie.uni-kl.de

* Corresponding author

Keywords:

acetylcholinesterase; cyclodextrins; cyclosarin; neurotoxic organophosphonates; oximes

Beilstein J. Org. Chem. **2011**, *7*, 1543–1554.

doi:10.3762/bjoc.7.182

Received: 28 September 2011

Accepted: 08 November 2011

Published: 22 November 2011

This article is part of the Thematic Series "Supramolecular chemistry II".

Guest Editor: C. A. Schalley

© 2011 Zengerle et al; licensee Beilstein-Institut.

License and terms: see end of document.

Abstract

The potential of appropriately substituted cyclodextrins to act as scavengers for neurotoxic organophosphonates under physiological conditions was evaluated. To this end, a series of derivatives containing substituents with an aldoxime or a ketoxime moiety along the narrow opening of the β -cyclodextrin cavity was synthesized, and the ability of these compounds to reduce the inhibitory effect of the neurotoxic organophosphonate cyclosarin on its key target, acetylcholinesterase, was assessed in vitro. All compounds exhibited a larger effect than native β -cyclodextrin, and characteristic differences were noted. These differences in activity were correlated with the structural and electronic parameters of the substituents. In addition, the relatively strong effect of the cyclodextrin derivatives on cyclosarin degradation and, in particular, the observed enantioselectivity are good indications that noncovalent interactions between the cyclodextrin ring and the substrate, presumably involving the inclusion of the cyclohexyl moiety of cyclosarin into the cyclodextrin cavity, contribute to the mode of action. Among the nine compounds investigated, one exhibited remarkable activity, completely preventing acetylcholinesterase inhibition by the (–)-enantiomer of cyclosarin within seconds under the conditions of the assay. Thus, these investigations demonstrate that decoration of cyclodextrins with appropriate substituents represents a promising approach for the development of scavengers able to detoxify highly toxic nerve agents.

Introduction

Cyclodextrins, cyclic oligosaccharides composed of α -1,4-linked D-glucose units, represent one of the most important classes of host systems in supramolecular chemistry [1]. Their

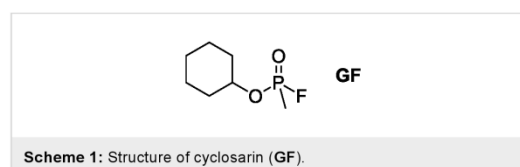
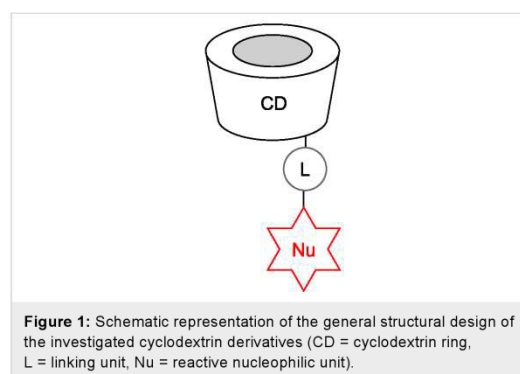
easy availability, their ability to include organic nonpolar molecules into the cavity made up by the cyclically arranged glucose units in aqueous solution, their predictable and controllable

binding properties, and their relatively straightforward chemical modification have made cyclodextrins indispensable tools in applications such as sensing [2], nanotechnology [3,4], polymer chemistry [5-8], medicinal chemistry [9,10], food chemistry [11], and others. Importantly, the scope of cyclodextrins goes beyond molecular recognition since the recognition event can in some cases be coupled with the chemical transformation of a substrate. This property was already realized in 1959 when it was shown that native cyclodextrins accelerate the cleavage of some acetic acid esters [12]. Subsequent work then established cyclodextrins containing appropriate substituents or dimeric cyclodextrins as a potent class of enzyme mimics [13,14]. Interestingly, it was also demonstrated relatively early in the field of cyclodextrin chemistry that native cyclodextrins are able to accelerate the cleavage of phosphates and phosphonates [15-18], including the highly neurotoxic organophosphonates (OP) sarin and soman [19-21]. While α -cyclodextrin, the cyclodextrin containing six anhydroglucose units along the ring, was shown to be most effective for sarin [17,22], the larger β -cyclodextrin with the seven-membered ring was demonstrated to also mediate soman degradation [19,20]. Moreover, the cyclodextrins were shown to act enantioselectively, being more effective for the more toxic (*R*)-(-)-enantiomer of sarin, for example [17,22]. Surprisingly, this work has largely been overlooked despite the fact that it provided strong indications for the potential applicability of cyclodextrins for the detoxification of chemical warfare agents. Only very recently has the use of cyclodextrins to induce degradation of neurotoxic OPs been addressed again. These investigations showed that β -cyclodextrin derivatives with a substituent along the wider rim of the cavity, bearing a nucleophilic group in the form of an iodosylbenzoate [23-25] or an oxime [26], efficiently react with paraoxon, cyclosarin (**GF**), and tabun thus reducing the inhibitory effects of these OPs on the key target of OP toxicity, acetylcholinesterase (AChE). Moreover, the results indicate that the mode of action of these cyclodextrin derivatives involves the formation of an inclusion complex with the OP.

The question thus arises as to whether suitable cyclodextrin derivatives could also be used *in vivo* as antidotes against OP poisonings. Such compounds should be able to act as scavengers by rapidly decomposing the OP into nontoxic byproducts before inhibition of AChE occurs. Catalytic action of the scavenger is desirable, reducing the necessary dose of the drug, but is not required if the toxicity is low. Since the amount of data currently available is too low to assess whether this approach has a realistic prospect of success, we initiated a research program aimed at the synthesis of a large number of structurally diverse cyclodextrin derivatives and the evaluation of their effect on OP degradation. In terms of structure, these compounds follow a common design principle, involving three

distinct subunits each of which has a characteristic function (Figure 1):

- A cyclodextrin ring, which forms the basis of each compound. Complex formation between this subunit and the substrate should bring the P-atom of the substrate into spatial proximity with the substituent on the ring, thus facilitating the attack by the reactive group on the substituent. The type of cyclodextrin in this subunit (α , β , γ) controls the substrate affinity.
- The linking unit between the cyclodextrin ring and the reactive part of the substituent. This group should be chosen to allow straightforward synthetic access to the cyclodextrin derivatives, ideally allowing the synthesis to proceed in a modular fashion.
- The reactive unit bearing a functional group that should be able to specifically cleave the P–X bond on the substrate. In the case of **GF** (Scheme 1), for example, the most labile P–F bond is the one that is most prone to cleavage. In general, the functional group contains a suitable nucleophilic center, with α -effect nucleophiles possessing particularly promising activities [27,28]. Accordingly, the first step of OP deactivation is expected to consist of the phosphorylation of this nucleophilic group, similar to the phosphorylation of the serine residue in the active site of AChE during OP-mediated inhibition of this enzyme. If the compound thus formed is hydrolytically unstable, it will be cleaved in the aqueous medium, releasing the original reactive unit and allowing it to mediate another reaction.

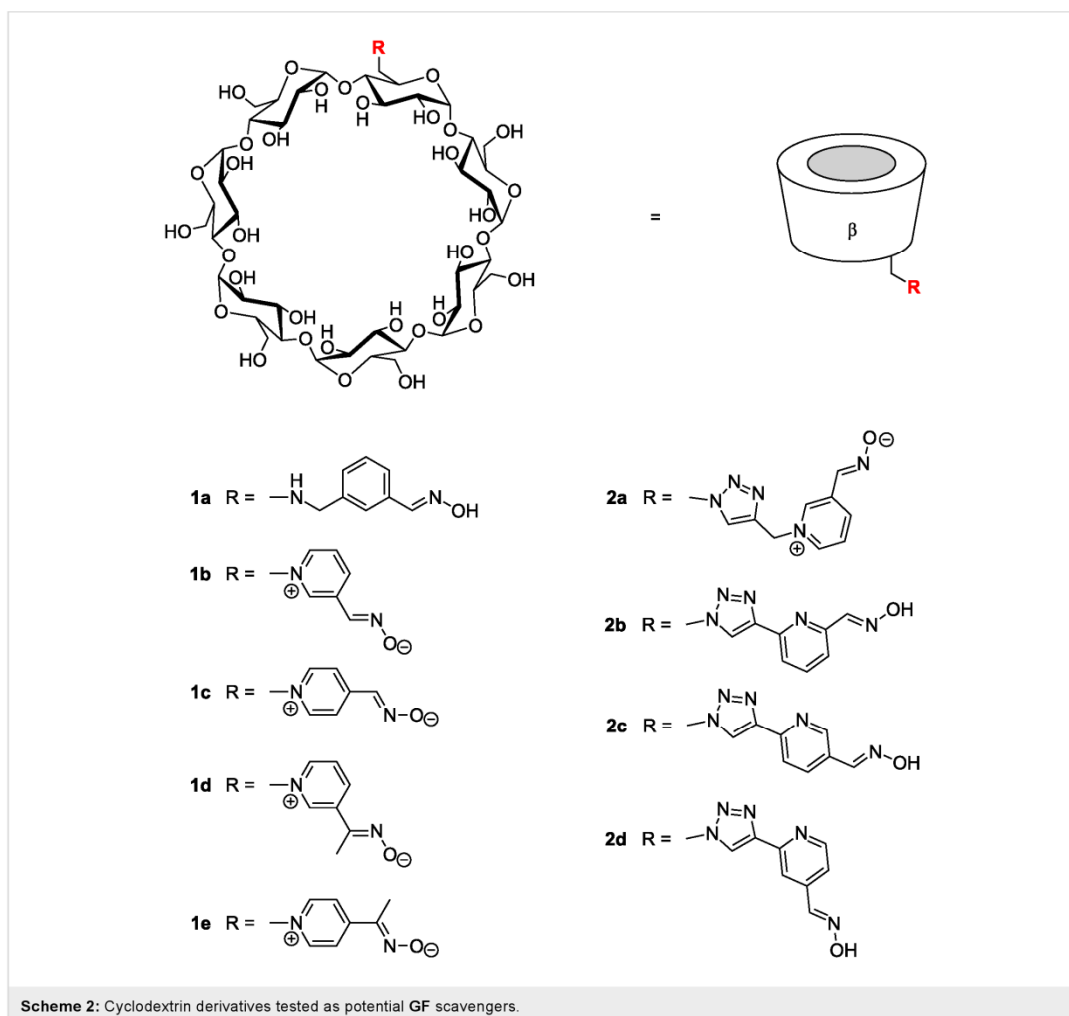


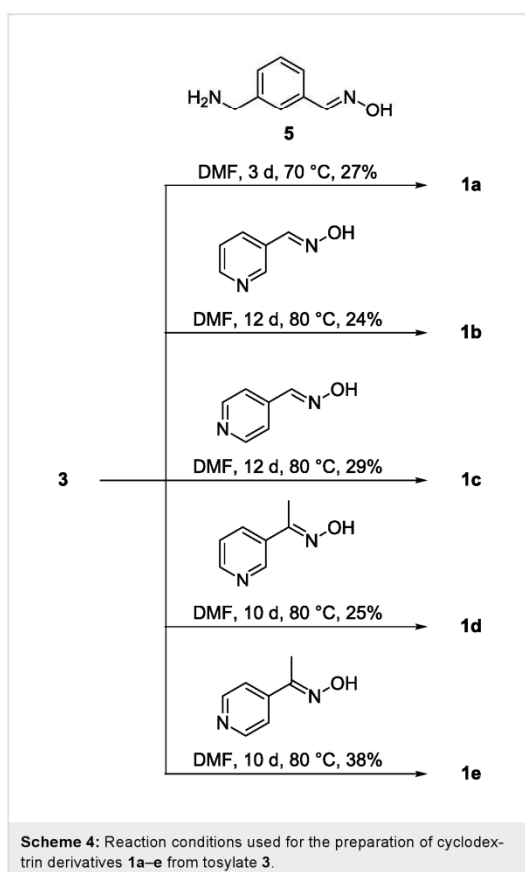
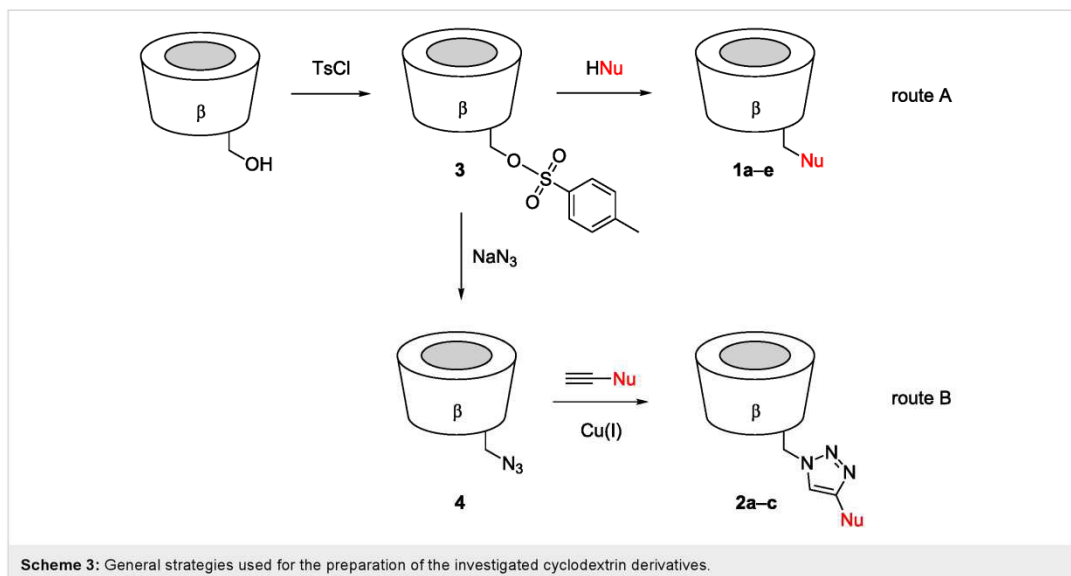
Here, we describe our first results in this project, involving a series of β -cyclodextrin derivatives with substituents on the primary face of the cyclodextrin ring, containing oximes as nucleophilic groups. Oximes are well-known antidotes for the treatment of OP poisonings. Their mode of action involves reactivation of the OP-inhibited acetylcholinesterase [29], yet previous work has also indicated that certain oximes are able to cleave OPs directly [30]. We show that some of our cyclodextrin derivatives efficiently reduce **GF** concentrations in solution under physiological conditions within seconds, thus preventing the OP from inhibiting AChE. The observed correlation of structural and electronic parameters of the cyclodextrin derivatives with their activity strongly indicates that the interaction between the cyclodextrin ring and the substrate plays a decisive role in the mode of action.

Results and Discussion

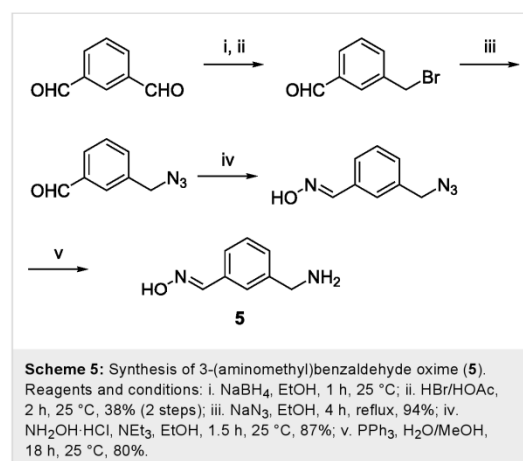
Synthesis. The cyclodextrin derivatives investigated in this study are shown in Scheme 2. All compounds derive from the seven-membered β -cyclodextrin and contain the substituent in the 6-position of a glucose unit, i.e., along the narrower rim of the cyclodextrin cavity.

These products were prepared by following two different routes. Cyclodextrins **1a–e** derive from mono-6-(*p*-tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin (**3**), which can be expediently prepared from β -cyclodextrin and *p*-tolylsulfonyl chloride [31]. Reaction of **3** with an appropriate nucleophile then afforded the functionalized products (Scheme 3, route A). Compound **1a** was prepared by the reaction of **3** with 3-(aminomethyl)benzaldehyde oxime (**5**) (Scheme 4), the latter of which was synthesized



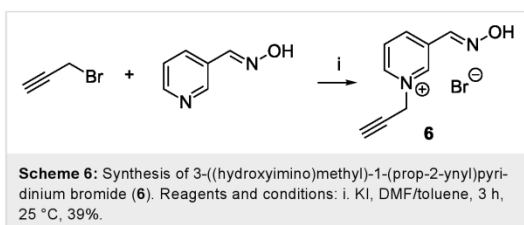


from isophthalaldehyde, as shown in Scheme 5. Compounds **1b–e** were obtained from **3** and the corresponding pyridine aldoximes or ketoximes (Scheme 4) all of which are easily accessible from the commercially available aldehydes or ketones by reaction with hydroxylamine [32]. Attempts to also prepare the analogous derivative with the oxime group in the 2-position of the pyridinium ring, by reaction of **3** with 2-formylpyridine oxime or 2-acetylpyridine oxime, unfortunately failed to produce the desired products.



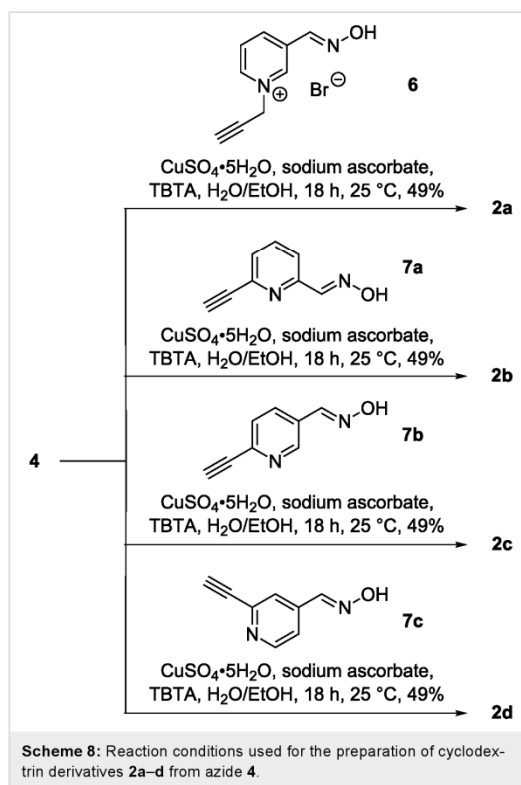
The cyclodextrin derivatives **2a–d** contain 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole moieties as the linking units. Accordingly, they were prepared by copper(I)-catalyzed azide–alkyne cycloadd-

dition (“click-reaction”) [33] from mono-6-azido-6-deoxy- β -cyclodextrin (**4**) and a functionalized alkyne (Scheme 3, route B). Conjugations by copper(I)-catalyzed azide–alkyne cycloadditions have become popular in many different fields of chemistry [33,34], including cyclodextrin chemistry [35–41]. The alkyne **6** required for the synthesis of **2a** was obtained from propargyl bromide and 3-formylpyridine oxime (Scheme 6), and those for **2b**, **2c**, and **2d**, following the routes shown in Scheme 7. Reaction of these alkynes with **4** in the presence of copper(II) sulfate, sodium ascorbate and tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA) [42] afforded the corresponding coupled products (Scheme 8).

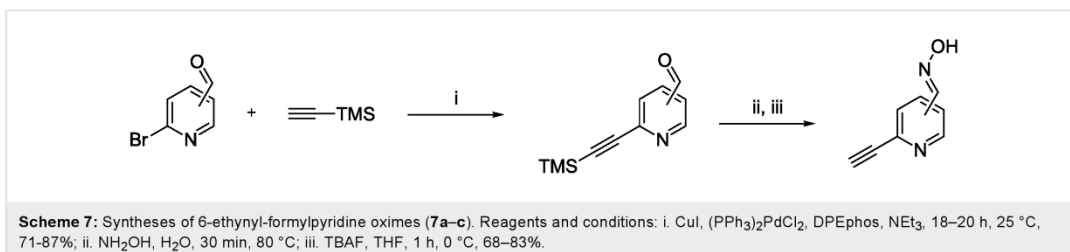


All functionalized cyclodextrins **1a–e** and **2a–d** were purified by preparative HPLC. To this end, a universal method was developed that involves the use of a reversed-phase C18 column and a gradient of a binary solvent mixture, acetonitrile/0.025% aqueous ammonia. All products were thus obtained in analytically pure form, which is necessary to ensure that the subsequent evaluation of activity yields reliable results. Elemental analyses and NMR spectroscopy indicated that the pyridinium-containing cyclodextrins do not contain a counterion and that they therefore most probably represent the betaine forms depicted in Scheme 2.

Qualitative assay. In a first step, the ability of the prepared cyclodextrin derivatives to reduce **GF** concentration in solution and, as a consequence, the inhibitory effect of this OP on AChE was estimated by using a fully automated high-throughput screening assay recently developed for the characterization of potential nerve agent detoxifying materials [43]. This test involves incubation of the nerve agent with an excess of a



respective cyclodextrin derivative at 37.0 °C in an aqueous TRIS-HCl buffer (pH 7.40). Aliquots of this solution were added to a solution containing human acetylcholinesterase (hAChE, EC 3.1.1.7), acetylthiocholine (ATCh) and 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) immediately after mixing and after 30 and 60 min. The inhibitory effect of **GF** on the enzyme was then quantified photometrically by following the rate of formation of the 2-nitro-5-thiobenzoate dianion (Ellman assay) [44,45]. A first order rate constant k_1 was derived from these curves by nonlinear regression analysis, which is a measure of the extent of enzyme inhibition: The larger the value of k_1 the stronger the inhibitory effect of the nerve agent on the enzyme activity. By relating k_1 to k_1^{ref} , the



rate constant determined in the absence of the cyclodextrin, and to k_1^{native} , the rate constant determined in a preliminary assay in the absence of both cyclodextrin and **GF**, one obtains $(k_1^{\text{ref}} - k_1) / (k_1^{\text{ref}} - k_1^{\text{native}}) \cdot 100\% = \Delta k_1$, a term which correlates with the activity of the cyclodextrin. If the extent of enzyme inhibition is the same in the absence and the presence of the cyclodextrin ($k_1^{\text{ref}} = k_1$) the cyclodextrin is inactive and $\Delta k_1 = 0\%$. If, however, the nerve agent is decomposed faster in the presence of the cyclodextrin than during the background reaction, k_1 becomes smaller with respect to k_1^{ref} until it approaches the value of k_1^{native} . As a consequence Δk_1 increases up to 100% for full enzymatic activity ($k_1 = k_1^{\text{native}}$). The results of this assay obtained for cyclodextrin derivatives **1a–e** and **2a–d** are summarized in Figure 2.

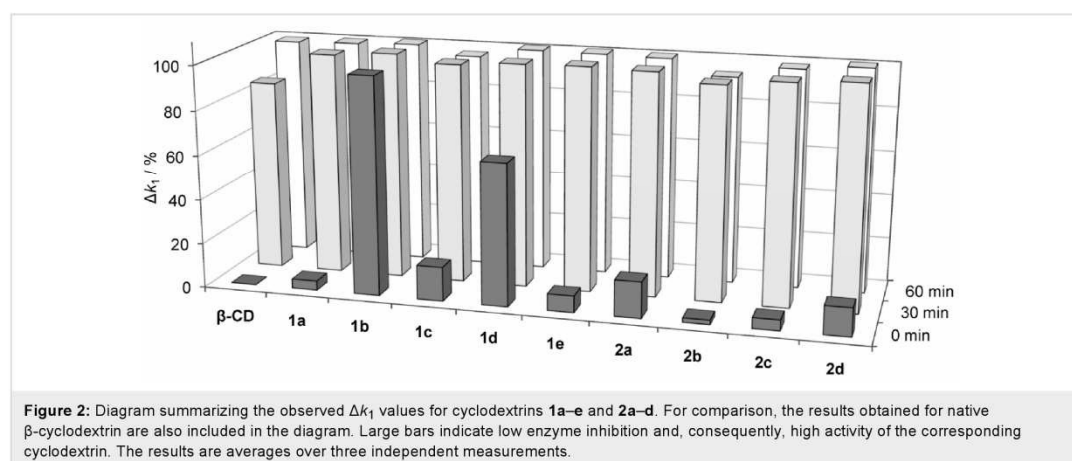
Figure 2 shows that even native β -cyclodextrin exhibits a substantial activity, consistent with the results of previous investigations [19,20]. The reduction of AChE inhibition is clearly visible after 30 min, and the enzyme is fully active when **GF** was incubated with β -cyclodextrin for 1 h prior to the Ellman assay. Notably, all substituted cyclodextrin derivatives already exhibit an effect in the first measurement, thus clearly demonstrating the enhancement of activity caused by the substituents. While this effect is small for most cyclodextrins, it is significant for **1d**, and the activity of **1b** is so high that no enzyme inhibition is observable even in the first measurement.

The correlation between the type of substituent on the cyclodextrin and the reduction of AChE inhibition, which is evidenced in Figure 2, indicates that the activity of these cyclodextrin derivatives depends sensitively on the structural parameters of the substituents in combination with the electronic properties. The generally larger activity of the pyridinium derivatives such as **1b–e** and **2a** with respect to compounds containing a neutral

pyridine ring can most probably be attributed to the higher acidity of the aldoxime proton in pyridinium aldoximes, for example. For reference, the pK_a of the aldoxime proton in 3-formylpyridine oxime amounts to 10.36 and that of the corresponding proton in the 1-methiodide of 3-formylpyridine oxime to 9.22. Correspondingly, the pK_a of the aldoxime proton in 4-formylpyridine oxime (9.99) also decreases by more than one order of magnitude to 8.57 upon methylation of the ring nitrogen [46]. Thus, oximes on pyridinium rings are deprotonated more easily, which renders them more nucleophilic.

The influence of structural effects on the activity becomes evident when comparing **1b** and **2a**, both of which have the oxime moiety in the same position on the aromatic ring. The significantly larger activity of **1b** is an indication that the positioning of the nucleophilic group closer to the cavity of the cyclodextrin facilitates the reaction with **GF**. Interestingly, even small structural variations such as shifting the substituent on the pyridinium ring from the 3- into the 4-position (**1b** versus **1c**) or replacing the aldoxime with a ketoxime (**1b** versus **1d**) are associated with a significant loss of activity. While the latter effect is presumably due to the lower acidity of ketoximes with respect to aldoximes by ca. one order of magnitude [32], the higher activity of **1b** with respect to **1c** is more likely to be a structural effect, since on the basis of the pK_a values of 1-methiodides of 3-formylpyridine oxime (9.22) and 4-formylpyridine oxime (8.57) one would expect the opposite trend.

The pronounced activity of the investigated cyclodextrin derivatives, in particular of **1b**, also indicates that noncovalent interactions, most probably the inclusion of the apolar cyclohexyl moiety of **GF** into the cyclodextrin cavity, are an important aspect of the mode of action. Assuming that the affinity of **GF**

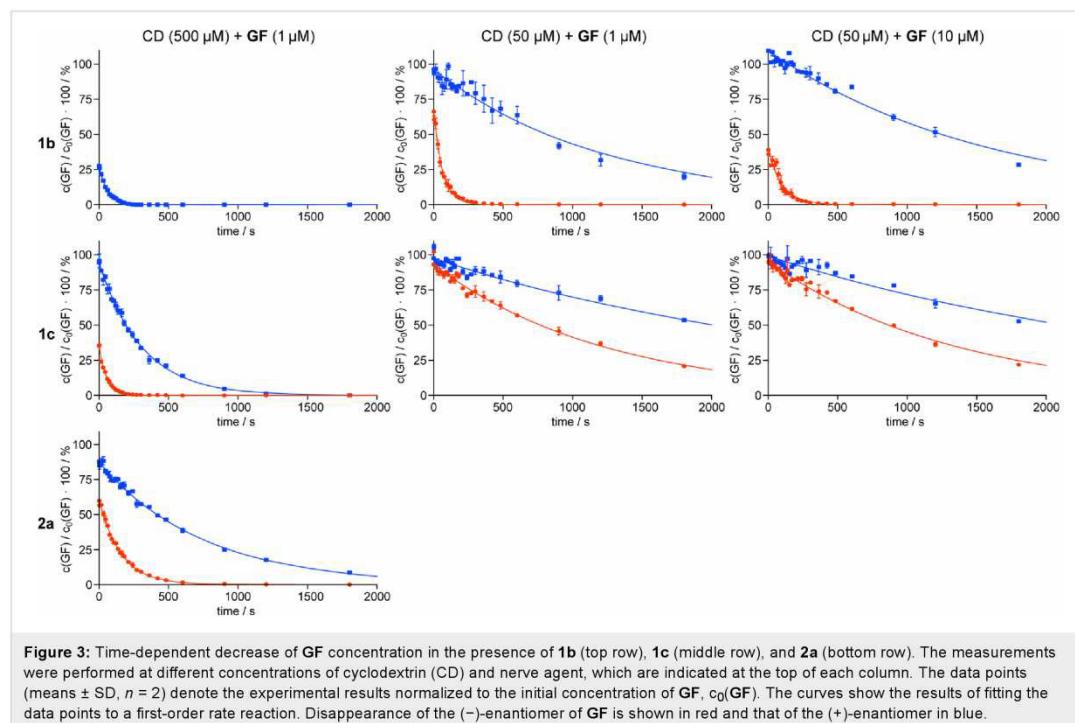


to β -cyclodextrin in water is similar to that of cyclohexanol (687 M^{-1} at $30 \text{ }^\circ\text{C}$) [47,48], and that it is approximately independent of the type of substituent, ca. 25% of the substrate molecules are estimated to reside in the cyclodextrin cavity under the conditions of the assay ($500 \text{ }\mu\text{M}$ cyclodextrin and $1 \text{ }\mu\text{M}$ GF). This value presumably represents a lower limit, because hydrogen-bonding interactions between the OH-groups along the rim of the cyclodextrin cavity and the P=O group of the substrate can cause the GF complex to be more stable than that of cyclohexanol. However, it indicates that complexation of only part of the total substrate amount could ensure efficient conversion, if the oxime group of the cyclodextrin can approach the phosphonate moiety of the substrate in the complex, and if complexation/decomplexation kinetics are fast as is usually the case for cyclodextrin complexes [49]. The remarkable high activity observed for **1b** prompted us to evaluate in more detail the rate with which GF is degraded in the presence of this compound. For comparison, the less active isomer of **1b**, 4-substituted derivative **1c**, and the triazole-linked derivative **2a** were also included in this study.

Quantitative assay. The kinetic parameters for the reduction of GF concentration in solution mediated by **1b**, **1c**, and **2a** were determined as described previously for other cyclodextrin derivatives [23]. Briefly, a buffered solution (pH 7.40)

containing the nerve agent was incubated at $37.0 \text{ }^\circ\text{C}$ and an aliquot was taken to determine the initial concentration of GF, $c_0(\text{GF})$. After the addition of a thermostatted cyclodextrin solution, aliquots were taken at defined intervals. These samples were immediately extracted with hexane and subjected to GC–MS analysis by using d_{11} -GF (GF with a perdeuterated cyclohexyl residue) as the internal standard. The use of a chiral stationary phase allowed independent evaluation of the effect of the cyclodextrin on both GF enantiomers. The results of these measurements are shown in Figure 3.

One important aspect that becomes immediately apparent when looking at the graphs in Figure 3 is that the cyclodextrins act enantioselectively, with the (–)-enantiomer of GF being the one that disappears faster, independent of the cyclodextrin derivative used. This result, which is consistent with those of previous investigations [22,23], is another indication of the involvement of the chiral cyclodextrin residue in the reaction. The top left graph shows that under the standard conditions of this measurement (–)-GF is consumed so quickly, with conversion being complete after ca. 5 s, that no reliable kinetic analysis could be performed. Decomposition of the corresponding (+)-enantiomer is slower, but also complete after ca. 4 min. In order to follow the rate with which (–)-GF disappears, the concentration of cyclodextrin during incubation with GF was reduced to



50 μM . As expected, this modification of conditions caused a reduced rate of conversion for both enantiomers, presumably because the amount of **GF** molecules bound inside the cyclodextrin cavity decreases by a factor of ca. 10. Performing the analysis at 50 μM of cyclodextrin and 10 μM of **GF** does not have a large effect on the rate of reaction, which is consistent with the fact that increasing the **GF** concentration does not shift the complex equilibrium to a large extent. It should be noted that this assay currently does not allow us to ascertain whether the action of the cyclodextrins is stoichiometric or catalytic, because the cyclodextrin derivatives were used in excess with respect to **GF**.

Similar trends were observed for the other cyclodextrin derivatives, although their overall rates of conversion were consistently lower than those of **1b**. Quantitative information in terms of the observed rate constants k_{obs} and half-lives $t_{1/2}$ was obtained by fitting the experimentally obtained decay curves to a first order reaction and subtracting the effect of spontaneous **GF** hydrolysis under these conditions ($1.5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) [23]. The results thus obtained are summarized in Table 1.

Comparison of these rate constants with ones obtained previously under similar conditions for native β -cyclodextrin and 2-*O*-(carboxy-iodosobenzyl)- β -cyclodextrin leads to the conclusion that the substituted cyclodextrins investigated here enhance the **GF** decomposition by at least one order of magnitude more efficiently than native β -cyclodextrin does [23]. Degradation of (+)-**GF** is ca. twice as fast in the presence of **1b** than in the presence of 2-*O*-(carboxy-iodosobenzyl)- β -cyclodextrin. Because of the relatively low enantioselectivity observed for 2-*O*-(carboxy-iodosobenzyl)- β -cyclodextrin, the activity of cyclodextrin **1b** is estimated to be at least one order of magnitude higher. More detailed information about the kinetics and

thermodynamics of the reaction could be obtained by following the dependency of the rate of reaction on the **GF** concentration (Michaelis–Menten kinetics). These measurements are, however, demanding in light of the complexity of the currently used kinetic assay and have therefore not yet been performed.

Conclusion

These investigations demonstrate that appropriately substituted cyclodextrin derivatives can efficiently reduce the inhibitory effect of **GF** on AChE under physiological conditions. The relatively strong effect of the cyclodextrin derivatives on **GF** degradation and, in particular, the observed enantioselectivity are good indications for noncovalent interactions between the cyclodextrin ring and the substrate, presumably involving the inclusion of the cyclohexyl moiety of cyclosarin into the cyclodextrin cavity, which contribute to the mode of action. In addition, the correlation between structural parameters and activity can be rationalized on the basis of the distance of the substituents from the cyclodextrin cavity, where OP binding presumably takes place, and the expected nucleophilicity of the oxime groups of the substituents. With **1b** a compound could be identified that, to the best of our knowledge, currently represents the most active cyclodextrin derivative mediating **GF** degradation in solution. These results make us optimistic that substituted cyclodextrins represent a very promising platform for the development of scavengers for highly toxic organophosphonates, including also ones that are more persistent than **GF**, such as tabun or VX. Work in this context is ongoing in our group.

Experimental

General details. The synthesized compounds were characterized as follows: Melting points, Müller SPM-X 300; NMR, Bruker Avance 600, Bruker DPX 400; MALDI-TOF-MS,

Table 1: Kinetic constants determined for **GF** degradation mediated by cyclodextrins **1b**, **1c**, and **2a** (k_{obs} in s^{-1} , $t_{1/2}$ in s).

cyclodextrin concentration	cyclodextrin		(-)- GF		(+) GF	
			1 μM		10 μM	
500 μM	1b	k_{obs}	n.d. ^a	$1.6 \cdot 10^{-2}$		
		$t_{1/2}$	n.d. ^a	43		
	1c	k_{obs}	$1.8 \cdot 10^{-2}$	$3.1 \cdot 10^{-3}$		
		$t_{1/2}$	39	211		
	2a	k_{obs}	$6.1 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^{-3}$		
		$t_{1/2}$	114	583		
50 μM	1b	k_{obs}	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$6.5 \cdot 10^{-4}$	$9.6 \cdot 10^{-3}$	$4.7 \cdot 10^{-4}$
		$t_{1/2}$	46	1071	72	1465
	1c	k_{obs}	$6.6 \cdot 10^{-4}$	$1.8 \cdot 10^{-4}$	$5.9 \cdot 10^{-4}$	$1.7 \cdot 10^{-4}$
		$t_{1/2}$	1053	3857	1179	4143

^ano reliable rate constant and half-life could be determined.

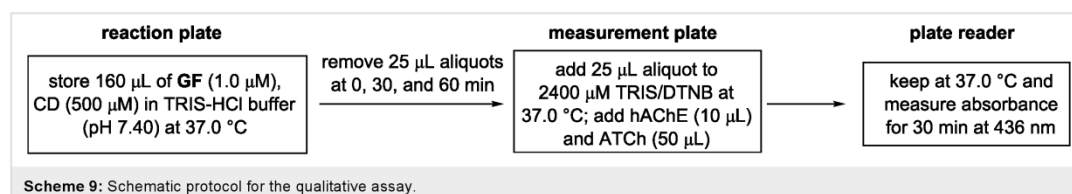
Bruker Ultraflex TOF/TOF; ESI-MS, Bruker Esquire 3000; IR, FT-IR System Spectrum BX, Perkin-Elmer; elemental analysis, Elementar vario Micro cube. All chemicals, unless other stated, are commercially available and were used without further purification. Cyclosarin and deuterated cyclosarin (d_{11} -cyclosarin, d_{11} -GF) (>98% by GC-MS, ^1H NMR, and ^{31}P NMR) were made available by the German Ministry of Defense (All experiments with cyclosarin were performed at the Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr). Hemoglobin-free erythrocyte ghosts as a source for human erythrocyte acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) were prepared according to the procedure of Dodge et al. [50] with minor modifications [51]. AChE activity was adjusted to 4000 U/l by dilution with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.40). Aliquots were stored at a temperature of $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Prior to use, ghosts were homogenized with a Sonoplus HD 2070 ultrasonic homogenator (Bandelin electronic, Berlin, Germany) twice for 5 s with a 20 s interval to achieve a homogeneous matrix. For the preparative HPLC the following conditions were used: HPLC, Dionex UltiMate 3000; column, Thermo Fisher, BetaBasic-18, $250 \times 21.2\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$ particle size; flow, 12 mL/min; eluent, aqueous: 0.025% aqueous ammonia, organic: acetonitrile; for the separation of neutral compounds (**1a**, **2b–2d**) the following gradient was used: 0–6 min, 0% organic; 6–27 min, linear increase of organic to 40%; 27–33 min, 40% organic; 33–39 min, linear decrease to 0% organic; 39–45 min, 0% organic; charged compounds (**1b–1e**, **2a**) were purified by employing a slightly different gradient: 0–6 min, 0% organic; 6–22 min, linear increase to 15% organic; 22–25 min, linear increase to 50% organic; 25–30 min, 50% organic; 30–37 min, linear decrease to 0% organic; 37–45 min, 0% organic.

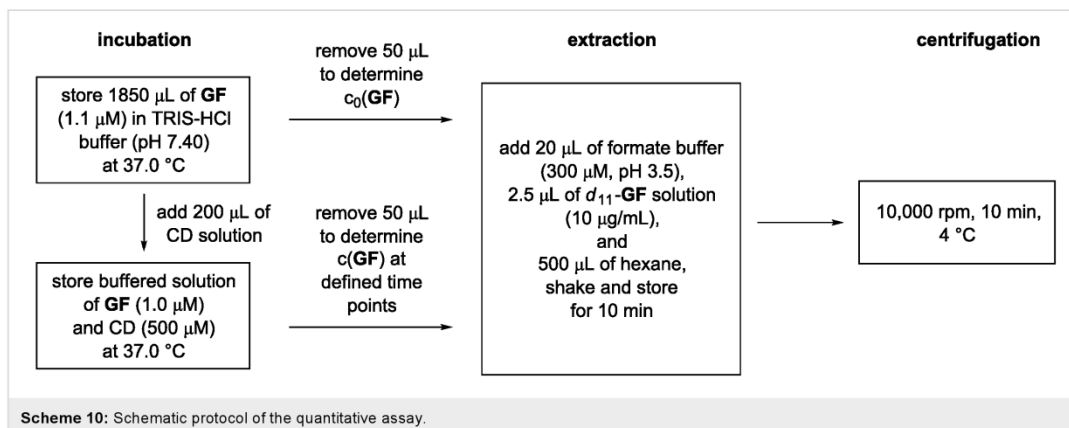
Qualitative assay. The qualitative test was performed by using a Tecan Freedom EVO liquid handling system (Männedorf, Switzerland) [43]. A solution of cyclodextrin (500 μM) and GF (1 μM) was prepared and incubated in TRIS-HCl buffer (0.1 M, pH 7.40) at $37.0\text{ }^\circ\text{C}$ (Scheme 9). Immediately after mixing, a sample (25 μL) was transferred to a measuring plate prefilled with buffer (2400 μL , 0.1 M TRIS-HCl, pH 7.40 and 0.3 mM DTNB) and human AChE (10 μL) and preheated to $37.0\text{ }^\circ\text{C}$. ATCh (50 μL , 49.7 mM) was added immediately, the microplate was transferred to a photometer and the absorption was measured at 436 nm for 30 min while the temperature was

maintained at $37.0\text{ }^\circ\text{C}$. Further aliquots of the test mixture were taken after 30 min and 60 min and treated analogously. The rate constants k_1 were determined by nonlinear regression analysis of the resulting curves by using Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) as described previously [43]. All results shown are mean values of $n = 3$ experiments. The value for k_1^{native} was determined in independent experiments to be $8.56 \cdot 10^{-5}\text{ s}^{-1}$.

Quantitative assay. The quantitative assay was performed in a stirred 2.0 ml cryo vial (Wheaton Science Products, Millville, NJ, USA) positioned in a temperature controlled water bath. Buffer (1850 μL , TRIS-HCl 0.1 M, pH 7.40) containing GF (1.1 μM) was incubated at $37.0\text{ }^\circ\text{C}$ and an aliquot (50 μL) was removed to determine the initial concentration of GF, $c_0(\text{GF})$ (Scheme 10). After preheated cyclodextrin solution (200 μL , final concentration 500 μM) was added, aliquots (50 μL) were taken at defined time points. These samples were transferred into a tube containing sodium formate buffer (20 μL , 300 μM , pH 3.5) and a solution of the internal standard d_{11} -GF in 2-propanol (2.5 μL , 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Afterward, ice-cold hexane (500 μL) was immediately added, and the mixture was shaken vigorously and stored on ice. Each sample was centrifuged as soon as possible (10.000 rpm, 10 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$), and the organic layer was removed immediately and transferred to GC vials for analysis. The experimental results were normalized to the initial concentration of GF in the absence of cyclodextrin, $c_0(\text{GF})$. The kinetic constants k_{obs} were determined by, first, nonlinear regression analysis of the resulting decay curves (using GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, USA) on the basis of the following equation: $c_{(+/-)\text{GF},t} = c_{(+/-)\text{GF},0} \cdot \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t)$, in which $c_{(+/-)\text{GF},t}$ denotes the concentration of (+)-GF or (–)-GF at a certain time t and $c_{(+/-)\text{GF},0}$ the concentration of (+)-GF or (–)-GF immediately after cyclodextrin addition, followed by subtracting the effect of spontaneous GF hydrolysis ($1.5 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$) [23]. All data shown are the mean values of $n = 2$ experiments.

Quantification of GF enantiomers by PCI MS. Quantification of GF enantiomers was performed by GC-MS, as described before but with slight modifications [52]. In brief, a gas chromatographic system 6890N coupled with a mass spectrometer detector 5973 with positive chemical ionization





(PCI) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), large volume injection (LVI), and a GAMMA DEX™ 225 GC column (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness, Sigma–Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) was used (Table 2). CI quantification was performed by applying ammonia 6.0 as reactant gas with a flow rate of 2.0 mL/min and helium as carrier gas with a flow rate of 1.3 mL/min. The following oven temperature program was applied: 50 °C for 4.5 min, increase to 100 °C at 40 °C/min and subsequently to 135 °C at 3 °C/min, maintain this temperature for 2 min, further increase to 170 °C at 40 °C/min. The limit of quantification was estimated to be 2.5 pg per enantiomer.

Supporting Information

Supporting Information File 1

Detailed experimental procedures and physical data for all newly prepared compounds.

[<http://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-7-182-S1.pdf>]

Acknowledgements

This research was supported by a contract of the German Armed Forces (E/UR3G/9G127/9A803). The generous funding is gratefully acknowledged.

References

- Dodziuk, H., Ed. *Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2006.
- Ogoshi, T.; Harada, A. *Sensors* **2008**, *8*, 4961–4982. doi:10.3390/s8084961
- Ling, X. Y.; Reinhoudt, D. N.; Huskens, J. *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81*, 2225–2233. doi:10.1351/PAC-CON-09-07-04
- Ludden, M. J. W.; Reinhoudt, D. N.; Huskens, J. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1122–1134. doi:10.1039/b600093m
- Chen, G.; Jiang, M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2254–2266. doi:10.1039/c0cs00153h
- Harada, A.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 875–882. doi:10.1039/b705458k
- Wenz, G.; Han, B.-H.; Müller, A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 782–817. doi:10.1021/cr970027+
- Ritter, H.; Tabatabai, M. *Prog. Polym. Sci.* **2002**, *27*, 1713–1720. doi:10.1016/S0079-6700(02)00022-9

Table 2: GC–MS parameters for PCI analysis of GF.

injection program		MS parameters	
injection volume	50 µL	detected mass	m/z 198, m/z 209
injection speed	20 µL/min	dwel time	125 ms
initial temperature	40 °C, hold for 0.05 min	solvent delay	13.00 min
initial end temperature	260 °C, hold for 2 min		
initial time	2.70 min		
vent time	2.60 min		
vent flow	10.0 mL/min		
purge time	4.60 min		

9. Aniskevich, S.; Leone, B. J.; Brull, S. J. *Expert Rev. Neurother.* **2011**, *11*, 185–198. doi:10.1586/ern.11.2
10. Loftsson, T.; Brewster, M. E. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *62*, 1607–1621. doi:10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x
11. Szente, L.; Szejtli, J. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 137–142. doi:10.1016/j.tifs.2003.09.019
12. Cramer, F.; Dietsche, W. *Chem. Ber.* **1959**, *92*, 1739–1747. doi:10.1002/cber.19590920804
13. Marinescu, L.; Bols, M. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2009**, *21*, 309–323. doi:10.4052/tigg.21.309
14. Breslow, R.; Dong, S. D. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1997–2012. doi:10.1021/cr970011j
15. Mochida, K.; Matsui, Y.; Ota, Y.; Arakawa, K.; Date, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 3119–3123. doi:10.1246/bcsj.49.3119
16. Brass, H. J.; Bender, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5391–5399. doi:10.1021/ja00797a046
17. van Hoodonk, C.; Groos, C. C. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1970**, *89*, 845–856. doi:10.1002/recl.19700890810
Interestingly, this work contains an early application of an indicator displacement assay, a sensing technique whose usefulness in supramolecular chemistry was demonstrated in recent years particularly by the Anslyn group, see: Wiskur, S. L.; Ait-Haddou, H.; Lavigne, J. J.; Anslyn, E. V. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 963–972. doi:10.1021/ar9600796
18. Hennrich, N.; Cramer, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1121–1126. doi:10.1021/ja01083a032
19. Désiré, B.; Saint-André, S. *Experientia* **1987**, *43*, 395–397. doi:10.1007/BF01940424
20. Désiré, B.; Saint-André, S. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1986**, *7*, 646–657. doi:10.1016/0272-0590(86)90114-4
21. van Hoodonk, C. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1972**, *91*, 1103–1109. doi:10.1002/recl.19720910910
22. van Hoodonk, C.; Breebaart-Hansen, J. C. A. E. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1970**, *89*, 289–299. doi:10.1002/recl.19700890309
23. Müller, S.; Koller, M.; Le Provost, R.; Lafont, O.; Estour, F.; Wille, T.; Thiermann, H.; Worek, F.; Reiter, G. *Toxicol. Lett.* **2011**, *200*, 53–58. doi:10.1016/j.toxlet.2010.10.014
24. Wille, T.; Tenberken, O.; Reiter, G.; Müller, S.; Le Provost, R.; Lafont, O.; Estour, F.; Thiermann, H.; Worek, F. *Toxicology* **2009**, *265*, 96–100. doi:10.1016/j.tox.2009.09.018
25. Masurier, N.; Estour, F.; Froment, M.-T.; Lefèvre, B.; Debouzy, J.-C.; Brasme, B.; Masson, P.; Lafont, O. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 615–623. doi:10.1016/j.ejmech.2005.02.008
26. Le Provost, R.; Wille, T.; Louise, L.; Masurier, N.; Müller, S.; Reiter, G.; Renard, P.-Y.; Lafont, O.; Worek, F.; Estour, F. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3026–3032. doi:10.1039/c0ob00931h
27. Smith, B. M. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 470–478. doi:10.1039/b705025a
28. Morales-Rojas, H.; Moss, R. A. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2497–2522. doi:10.1021/cr9405462
29. Marrs, T. C.; Rice, P.; Vale, J. A. *Toxicol. Rev.* **2006**, *25*, 297–323.
30. Louise-Lerich, L.; Păunescu, E.; Saint-André, G.; Baati, R.; Romieu, A.; Wagner, A.; Renard, P.-Y. *Chem.–Eur. J.* **2010**, *16*, 3510–3523. doi:10.1002/chem.200902986
31. McNaughton, M.; Engman, L.; Birmingham, A.; Powis, G.; Cotgreave, I. A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 233–239. doi:10.1021/jm030916r
32. Ginsburg, S.; Wilson, I. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 481–485. doi:10.1021/ja01559a067
33. Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015. doi:10.1021/cr0783479
34. Lallana, E.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 8794–8804. doi:10.1002/anie.201101019
Angew. Chem. **2011**, *123*, 8956–8966. doi:10.1002/ange.201101019
35. Ward, S.; Ling, C.-C. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4853–4861. doi:10.1002/ejoc.201100445
36. Böhm, I.; Ritter, H. *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 1080–1085. doi:10.1002/macp.201100006
37. Christensen, H. S.; Sigurskjold, B. W.; Frihed, T. G.; Marinescu, L. G.; Pedersen, C. M.; Bols, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 5279–5290. doi:10.1002/ejoc.201100671
38. Jazkewitsch, O.; Ritter, H. *Macromolecules* **2011**, *44*, 375–382. doi:10.1021/ma102456n
39. Méndez-Ardoy, A.; Guilloteau, N.; Di Giorgio, C.; Vierling, P.; Santoyo-González, F.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5882–5894. doi:10.1021/jo2007785
40. Tran, D. N.; Blaszkiewicz, C.; Manuel, S.; Roucoux, A.; Philippot, K.; Hapiot, F.; Monflier, E. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 210–218. doi:10.1016/j.carres.2010.11.024
41. Trellenkamp, T.; Ritter, H. *Macromolecules* **2010**, *43*, 5538–5543. doi:10.1021/ma100812q
42. Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855. doi:10.1021/ol0493094
43. Wille, T.; Thiermann, H.; Worek, F. *Toxicol. in Vitro* **2010**, *24*, 1026–1031. doi:10.1016/j.tiv.2009.11.023
44. Eyer, P.; Worek, F.; Kiderlen, D.; Sinko, G.; Stugin, A.; Simeon-Rudolf, V.; Reiner, E. *Anal. Biochem.* **2003**, *312*, 224–227. doi:10.1016/S0003-2697(02)00506-7
45. Worek, F.; Mast, U.; Kiderlen, D.; Diepold, C.; Eyer, P. *Clin. Chim. Acta* **1999**, *288*, 73–90. doi:10.1016/S0009-8981(99)00144-8
46. Mason, S. F. *J. Chem. Soc.* **1960**, 22–26. doi:10.1039/JR96000000022
47. Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875–1918. doi:10.1021/cr970015o
48. Rekharsky, M. V.; Schwarz, F. P.; Tewari, Y. B.; Goldberg, R. N.; Tanaka, M.; Yamashoji, Y. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4098–4103. doi:10.1021/j100066a032
49. Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325–1358. doi:10.1021/cr960371r
50. Dodge, J. T.; Mitchell, C.; Hanahan, D. *J. Arch. Biochem. Biophys.* **1963**, *100*, 119–130. doi:10.1016/0003-9861(63)90042-0
51. Worek, F.; Reiter, G.; Eyer, P.; Szinicz, L. *Arch. Toxicol.* **2002**, *76*, 523–529. doi:10.1007/s00204-002-0375-1
52. Reiter, G.; Koller, M.; Thiermann, H.; Dorandeu, F.; Mikler, J.; Worek, F. *J. Chromatogr., B* **2007**, *859*, 9–15. doi:10.1016/j.jchromb.2007.08.040

License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions: (<http://www.beilstein-journals.org/bjoc>)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at:
[doi:10.3762/bjoc.7.182](https://doi.org/10.3762/bjoc.7.182)

Supporting Information

for

Highly efficient cyclosarin degradation mediated by a β -cyclodextrin derivative containing an oxime-derived substituent

Michael Zengerle¹, Florian Brandhuber², Christian Schneider¹, Franz Worek², Georg Reiter²,
Stefan Kubik^{*1}

Address: ¹Fachbereich Chemie - Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern,
Erwin-Schrödinger-Straße, D-67663 Kaiserslautern, Germany, Fax: +49-631-205-3921 and
²Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, Neuherrbergstraße 11, D-80937
München, Germany

Email: Stefan Kubik - kubik@chemie.uni-kl.de

*Corresponding author

Detailed experimental procedures and physical data for all newly prepared compounds

Content

3-(Azidomethyl)benzaldehyde	S2
3-(Azidomethyl)benzaldehyde oxime	S2
3-(Aminomethyl)benzaldehyde oxime (5)	S2
6-(1-(3-(Hydroxyiminomethyl)phenyl)methylaminy)-6-deoxy- β -cyclodextrin (1a)	S2
Cyclodextrins 1b–1e	S3
3-((Hydroxyimino)methyl)-1-(prop-2-ynyl)pyridinium bromide (6)	S3
General procedure for the preparation of 6-((trimethylsilyl)ethynyl)-formylpyridines	S4
General procedure for the preparation of 6-ethynyl-formylpyridine oximes	S5
Cyclodextrins 2a–2d	S6
References	S8

S1

3-(Azidomethyl)benzaldehyde. 3-Bromobenzaldehyde [1] (2.10 g, 10.6 mmol) was dissolved in ethanol (150 ml). Sodium azide (2.74 g, 42.2 mmol) was added and the resulting mixture was heated to reflux for 4 h. After the solvent was removed, the residue was dissolved in water, the aqueous phase was extracted with dichloromethane, the combined organic layers were dried over sodium sulfate, and the solvent was removed in vacuo. Yield: 1.61 g (94%); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4.45 (s, 2H), 7.56–7.58 (m, 2H), 7.84–7.86 (m, 2H), 10.03 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 54.2, 129.0, 129.7, 129.8, 134.0, 136.8, 137.0, 192.0; IR (cm^{-1}) 1701 (v(C=O)), 2102 (azide); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$: C, 59.62; H, 4.38; N, 26.07; found: C, 59.44; H, 4.37; N, 25.94.

3-(Azidomethyl)benzaldehyde oxime. Hydroxylamin hydrochloride (1.39 g, 20.0 mmol) and triethylamine (3.04 ml, 22.0 mmol) were dissolved in ethanol (50 ml). After the addition of 3-azidobenzaldehyde (1.61 g, 10.0 mmol) the resulting reaction mixture was heated to reflux for 1.5 h. The solvent was removed and the residue was purified by column chromatography by using hexane/MTBE, 9:1 (v/v) as eluent. Yield: 1.26 g (72%); R_f 0.23 (hexane/MTBE, 9:1 (v/v)); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4.40 (s, 2H), 7.24–7.26 (m, 1H), 7.34–7.38 (m, 1H), 7.55 (s, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.33 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 54.6, 126.7, 127.2, 129.5, 129.8, 132.8, 136.3, 150.1; IR (cm^{-1}) 2102 (azide); ESI-TOF MS, m/z (%) 176.9 (100%) $[\text{M} + \text{H}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_4\text{O}$: C, 54.54; H, 4.58; N, 31.80; found: C, 54.33; H, 4.83; N, 31.73.

3-(Aminomethyl)benzaldehyde oxime (5). 3-(Azidomethyl)benzaldehyde oxime (1.26 g, 7.17 mmol) and triphenylphosphine (3.76 g, 14.3 mmol) were dissolved in methanol (50 ml). Water (258 mg, 14.3 mmol) was added and the resulting reaction mixture was stirred for 18 h at 25 °C. After the solvent was removed, the residue was washed with MTBE and recrystallized from hexane/ethyl acetate. Yield: 851 mg (79%); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.82 (s, br, 2H), 3.72 (s, 2H), 7.29–7.33 (m, 2H), 7.39–7.42 (m, 1H), 7.55 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 11.22 (s, 1H); ^{13}C NMR (D_2O , 100.6 MHz) δ 45.5, 124.4, 125.0, 128.1, 128.5, 132.9, 144.8, 148.3; IR (cm^{-1}) 3286 (v(NH)), 3364 (v(NH)); ESI-TOF MS, m/z (%) 134.0 (26%) $[\text{M} - \text{OH} + \text{H}]^+$, 151.0 (100%) $[\text{M} + \text{H}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$: C, 63.98; H, 6.71; N, 18.65; found: C, 63.89; H, 6.74; N, 18.59.

6-(1-(3-(Hydroxyiminomethyl)phenyl)methylaminy)-6-deoxy- β -cyclodextrin (1a). Mono-6-(*p*-tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin (3) [2] (0.50 g, 0.4 mmol) and 3-(aminomethyl)benzaldehyde oxime (0.29 g, 1.94 mmol) were dissolved in dry DMF (5 ml). After being stirred at 70 °C under a nitrogen atmosphere for 3 d the reaction mixture was poured into acetone. The precipitate was filtered off and washed with acetone. Separation and

purification of the product was achieved by preparative HPLC. Yield: 133 mg (27%); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 1.83 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 2.90 (m, 1H), 3.31–3.41 (m, 14H, beneath H_2O signal), 3.49–3.73 (m, 28H), 4.43–4.55 (m, 6H), 4.83 (s, 7H), 5.69–5.82 (m, 14H), 7.29–7.32 (m, 2H), 7.43–7.45 (m, 1H), 7.52 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 11.18 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz) δ 49.0, 52.9, 59.9, 70.7–73.1, 81.5–83.7, 102.0–102.3, 124.6, 125.8, 128.5, 128.7, 132.9, 141.6, 148.3; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1251.7 (41%) $[\text{M} - \text{O} + \text{H}]^+$, 1267.8 (100%) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 1289.8 (63%) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1305.8 (17%) $[\text{M} + \text{K}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{50}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_{35} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 46.08; H, 6.34; N, 2.15; found: C, 45.86; H, 6.26; N, 2.06.

Cyclodextrins 1b–1e. The pyridine aldoximes and ketoximes were prepared as described in the literature [3]. Specifically, hydroxylamine hydrochloride (10 mmol) and sodium hydroxide (10 mmol) were dissolved in water (20 ml) at 80 °C. After the addition of a formyl or an acetyl pyridinium derivative (5 mmol), stirring was continued for 1 h at 80 °C. The reaction mixture was cooled to 25 °C whereupon the respective product crystallized as colorless needles in a yield of 60–89%. The oximes thus prepared were subjected to a reaction with mono-6-(*p*-tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin (**3**) [2]. To this end, **3** (500 mg, 0.39 mmol) together with potassium iodide (3 mg, 0.02 mmol) and a pyridine aldoxime (474 mg, 3.9 mmol, 10 equiv) or a pyridine ketoxime (369 mg, 2.7 mmol) were dissolved in dry DMF (5 ml). After being stirred at 80 °C under a nitrogen atmosphere, for 12 d in the case of aldoximes and 10 d in the case of ketoximes, the reaction mixture was poured into acetone. The precipitate was filtered off and washed with acetone. Separation and purification of the product was achieved by preparative HPLC.

6-(3-(Oxidoiminomethyl)pyridinium-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (1b). Yield: 115 mg (24%); ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ 2.61–2.63 (m, 1H), 2.90–2.93 (m, 1H), 3.41–3.72 (m, 17H), 3.76–4.13 (m, 22H), 4.28–4.34 (m, 1H), 4.96–5.25 (m, 7H), 8.02–8.06 (m, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.69–8.73 (m, 2H), 8.99 (s, 1H); ^{13}C NMR (D_2O , 100.6 MHz) δ 59.1, 60.3–62.3, 70.5–73.0, 80.8–83.1, 101.4–101.9, 128.1, 136.1, 140.6, 141.5, 141.7, 143.5; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1223.9 (100%) $[\text{M} - \text{O} + \text{H}]^+$, 1239.9 (29%) $[\text{M} + \text{H}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{N}_2\text{O}_{35} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: C, 43.97; H, 6.30; N, 2.14; found: C, 44.05; H, 6.54; N, 2.04.

6-(4-(Oxidoiminomethyl)pyridinium-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrine (1c). Yield: 275 mg (29%); ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ 2.74–2.78 (d, 1H, $J(\text{H,H}) = 12.2$ Hz), 2.97–3.00 (d, 1H, $J(\text{H,H}) = 12.4$ Hz), 3.40–3.65 (m, 14H), 3.66–4.01 (m, 23H), 4.10 (t, 1H, $J(\text{H,H}) = 9.8$ Hz), 4.62 (t, 1H, $J(\text{H,H}) = 10.4$ Hz), 4.98–5.18 (m, 8H), 8.05 (d, 2H, $J(\text{H,H}) = 5.9$ Hz), 8.23 (s, 1H), 8.61 (d, 2H, $J(\text{H,H}) = 6.0$ Hz); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz) δ 58.3–60.8, 70.1–

73.5, 80.1–83.7, 100.7–102.4, 116.1, 142.1, 144.7, 153.3; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1210.8 (13%) $[M - NO + H]^+$, 1223.8 (100%) $[M - O + H]^+$, 1239.7 (88%) $[M + H]^+$; elemental analysis calcd (%) for $C_{48}H_{74}N_2O_{35} \cdot 3H_2O \cdot C_3H_6O$: C, 45.33; H, 6.42; N, 2.07; found: C, 45.48; H, 6.38; N, 2.15.

6-(3-(1-(Oxidoimino)ethyl)pyridinium-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (1d). Yield: 123 mg (25%); 1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ 2.21 (s, 3H), 2.59–2.62 (m, 1H), 2.88 (d, 1H, $J(H,H) = 11.9$ Hz), 3.41–3.72 (m, 16H), 3.76–4.04 (m, 20H), 4.08–4.12 (m, 1H), 4.32–4.37 (m, 1H), 4.95–5.26 (m, 9H), 8.06–8.09 (m, 1H), 8.75–8.77 (m, 2H), 9.04 (s, 1H); ^{13}C NMR (D_2O , 100.6 MHz) δ 11.1, 59.2–62.3, 70.7–73.1, 80.7–83.0, 101.3–102.0, 127.6, 139.1, 141.6, 142.2, 143.6, 150.8; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1237.8 (100%) $[M - O + H]^+$, 1253.8 (19%) $[M + H]^+$; elemental analysis calcd (%) for $C_{49}H_{76}N_2O_{35} \cdot 6H_2O \cdot 0.5C_3H_6O$: C, 43.63; H, 6.60; N, 2.01; found: C, 43.66; H, 6.58; N, 1.88.

6-(4-(1-(Oxidoimino)ethyl)pyridinium-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (1e). Yield: 187 mg (38%); 1H NMR (D_2O , 600 MHz) δ 2.18 (s, 3H), 2.70–2.72 (m, 1H), 2.88 (d, 1H, $J(H,H) = 11.5$ Hz), 3.41–3.66 (m, 14H), 3.68–4.10 (m, 22H), 4.21 (t, 1H, $J(H,H) = 9.9$ Hz), 4.61–4.65 (m, 1H), 4.95–5.16 (m, 9H), 8.17 (d, 2H, $J(H,H) = 7.0$ Hz), 8.62 (d, 2H, $J(H,H) = 7.0$ Hz); ^{13}C NMR (D_2O , 151 MHz) δ 10.1, 59.3–60.8, 70.6–73.1, 81.0–83.1, 101.4–102.0, 122.0, 144.0, 153.0, 155.1; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1237.9 (100%) $[M - O + H]^+$, 1253.9 (38%) $[M + H]^+$; elemental analysis calcd (%) for $C_{49}H_{76}N_2O_{35} \cdot 5H_2O \cdot 0.5C_3H_6O \cdot 0.5C_2H_5OH$: C, 44.33; H, 6.65; N, 2.01; found: C, 44.15; H, 6.41; N, 1.57.

3-((Hydroxyimino)methyl)-1-(prop-2-ynyl)pyridinium bromide (6). A solution of picolinaldehyde oxime [3] (366 mg, 3 mmol) in DMF (1.5 ml) was added over the course of 2 h to a solution of propargyl bromide in toluene (80%, 1.34 g, 1.00 ml, 9.00 mmol) containing solid potassium iodide (50 mg, 0.30 mmol). A precipitate was formed which was filtered off, washed with DMF and acetone, and dried. Yield: 281 mg (39%); mp 167–169 °C; 1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ 3.31 (s, 1H), 5.57 (s, 2H), 8.14 (t, 1H, $J(H,H) = 6.6$ Hz), 8.38 (s, 1H), 8.77 (d, 1H, $J(H,H) = 8.0$ Hz), 9.01 (d, 1H, $J(H,H) = 5.7$ Hz), 9.24 (s, 1H); ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$, 151 MHz) δ 50.9, 73.4, 80.6, 128.4, 133.7, 142.1, 143.3, 144.0, 144.7; IR (cm^{-1}) 2131 (v ($C \equiv C$)); ESI MS, m/z (%) 160.9 (100%) $[M - Br]^-$; elemental analysis calcd (%) for $C_9H_9N_2OBr$: C, 44.84; H, 3.76; N, 11.62; found: C, 44.78; H, 4.00; N, 11.68.

General procedure for the preparation of 6-((trimethylsilyl)ethynyl)-formylpyridines. The corresponding 6-bromo-formylpyridine (500 mg, 2.69 mmol) was dissolved in freshly distilled triethylamine (10 ml) under an atmosphere of nitrogen. Copper(I)iodide (51.2 mg, 269 μ mol), bis(triphenylphosphine)palladium(II)dichloride (75.5 mg, 108 μ mol), bis[2-

diphenylphosphino)phenyl] ether (57.9 mg, 108 μmol) and ethynyltrimethylsilane (317 mg, 3.23 mmol) were added successively and the resulting mixture was stirred at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 18 h. Afterward, the solvent was removed and the residue was purified chromatographically by using hexane/ethyl acetate, 4:1 (v/v) as eluent.

6-((Trimethylsilyl)ethynyl)-2-formylpyridine. Yield 384 mg (71%); R_f 0.62 (hexane/ethyl acetate, 4:1 (v/v)); mp 63–64 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.29 (s, 9H), 7.66 (dd, 1H), 7.83 (t, 1H), 7.89 (dd, 1H), 10.06 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ -0.2, 97.0, 102.6, 120.7, 131.5, 137.4, 143.8, 153.0, 193.1; IR (cm^{-1}) 2155 (v ($\text{C}\equiv\text{C}$)), 1726 (v ($\text{C}=\text{O}$)); ESI-TOF MS, m/z (%) 203.9 (63%) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 225.9 (100%) $[\text{M} + \text{Na}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NOSi}$: C, 64.98; H, 6.44; N, 6.89; found: C, 65.09; H, 6.48; N, 6.92.

6-((Trimethylsilyl)ethynyl)-3-formylpyridine. Yield 427 mg (78%); R_f 0.53 (hexane/ethyl acetate, 4:1 (v/v)); mp 85–87 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.29 (s, 9H), 7.59 (d, 1H), 8.12 (dd, 1H), 9.01 (s, 1H), 10.09 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 151 MHz) δ -0.32, 100.1, 103.0, 127.6, 130.1, 136.0, 147.9, 152.3, 190.0; IR (cm^{-1}) 2164 (v ($\text{C}\equiv\text{C}$)), 1686 (v ($\text{C}=\text{O}$)); ESI-TOF MS, m/z (%) 203.9 (10%) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 225.9 (100%) $[\text{M} + \text{Na}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NOSi}$: C, 64.98; H, 6.44; N, 6.89; found: C, 65.20; H, 6.59; N, 6.91.

6-((Trimethylsilyl)ethynyl)-4-formylpyridine. Yield 472 mg (81%); R_f 0.45 (hexane/ethyl acetate, 4:1 (v/v)); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.29 (s, 9H), 7.59 (d, 1H), 8.12 (dd, 1H), 9.01 (s, 1H), 10.09 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 151 MHz) δ -0.3, 97.3, 102.7, 121.1, 126.1, 141.8, 144.8, 151.4, 190.8; IR (cm^{-1}) 2161 (v ($\text{C}\equiv\text{C}$)), 1710 (v ($\text{C}=\text{O}$)); ESI-TOF MS, m/z (%) 203.9 (100%) $[\text{M} + \text{H}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NOSi}$: C, 64.98; H, 6.44; N, 6.89; found: C, 64.83; H, 6.46; N, 6.80.

General procedure for the preparation of 6-ethynyl-formylpyridine oximes. The corresponding 6-((trimethylsilyl)ethynyl)-formylpyridine (300 mg, 1.48 mmol) was suspended in water (9 ml) and an aqueous solution of hydroxylamine (50%) (272 μl , 4.44 mmol) was added. The precipitate formed was filtered off after 30 min stirring at rt, washed with water, and dried. Further purification was achieved as described for the individual products below.

6-Ethynyl-2-formylpyridine oxime (7a). The crude product was dissolved in THF (10 ml) and tetrabutylammonium fluoride (387 mg, 1.48 mmol) was added at 0 $^{\circ}\text{C}$. After being stirred for 1 h the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (5 ml) and washed with water. The aqueous layer was extracted five times with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over sodium sulfate and the solvent was removed in vacuo. Further purification was achieved by recrystallization from a small amount of water. Yield: 121 mg (56%); R_f 0.55 (hexane/ethyl acetate, 1:1 (v/v)); mp 169–171 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 4.38 (s,

1H), 7.55 (d, 1H, $J(\text{H,H}) = 7.3$ Hz), 7.79 (d, 1H, $J(\text{H,H}) = 7.6$ Hz), 7.80 (t, 1H, $J(\text{H,H}) = 7.7$ Hz), 8.05 (s, 1H), 11.81 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz) δ 80.6, 82.7, 119.8, 127.4, 137.5, 141.5, 148.4, 152.7; IR (cm^{-1}) 2109 (ν (C \equiv C)); ESI-TOF MS, m/z (%) 147.0 (6%) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 168.9 (100%) $[\text{M} + \text{Na}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$: C, 65.75; H, 4.14; N, 19.17; found: C, 65.53; H, 4.45; N, 18.84.

6-Ethynyl-3-formylpyridine oxime (7b). The crude product was purified chromatographically by using hexane/MTBE, 1:1 (v/v) as eluent. Yield: 179 mg (83%); R_f 0.30 (hexane/MTBE, 1:1 (v/v)); mp 190–191 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 4.43 (s, 1H), 7.57 (d, 1H, $J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz), 7.98 (dd, 1H, $J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, $J(\text{H,H}) = 2.0$ Hz), 8.20 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 11.68 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz, 100 °C) δ 79.8, 82.5, 126.5, 128.3, 132.9, 141.5, 144.7, 147.5; IR (cm^{-1}) 2099 (ν (C \equiv C)); ESI-TOF MS, m/z (%) 147.0 (55%) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 168.9 (100%) $[\text{M} + \text{Na}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$: C, 65.75; H, 4.14; N, 19.17; found: C, 65.54; H, 4.45; N, 18.76.

6-Ethynyl-4-formylpyridine oxime (7c). This compound was pure without further purification. Yield: 198 mg (92%); R_f 0.42 (hexane/MTBE, 1:1 (v/v)); mp 198–200 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 4.38 (s, 1H), 7.58 (d, 1H, $J(\text{H,H}) = 5.0$ Hz), 7.68 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.57 (d, 1H, $J(\text{H,H}) = 5.1$ Hz), 11.94 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz) δ 80.5, 82.8, 120.2, 124.3, 141.1, 142.3, 146.1, 150.7; IR (cm^{-1}) 2109 (ν (C \equiv C)); ESI-TOF MS, m/z (%) 147.0 (100%) $[\text{M} + \text{H}]^+$; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$: C, 65.75; H, 4.14; N, 19.17; found: C, 65.71; H, 4.41; N, 19.05.

Cyclodextrins 2a–2d. Mono-6-azido-6-deoxy- β -cyclodextrin [4] (300 mg, 0.26 mmol) was dissolved in ethanol/water, 1:1 (v/v) (10 ml) under an atmosphere of nitrogen. Copper(II) sulfate pentahydrate (3.25 mg, 13.0 μmol), sodium ascorbate (10.3 mg, 0.05 mmol), TBTA (6.85 mg, 13.0 μmol), and the respective alkyne **7a**, **7b**, or **7c** (0.31 mmol) were added successively and the resulting mixture was stirred at 25 °C in the case of **2a** and 70 °C in the case of **2b–2d**, for 1 to 3 d. After conversion was complete, the reaction mixture was poured into acetone. The precipitate was filtered off and washed with acetone. Separation and purification of the product was achieved by preparative HPLC.

6-(4-(1-(3-((Oxidoimino)methyl)pyridinium-1-yl)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (2a). Yield: 193 mg (56%); ^1H NMR (D_2O , 600 MHz) δ 2.60 (d, 1H, $J(\text{H,H}) = 11.7$ Hz), 2.71 (d, 1H, $J(\text{H,H}) = 12.2$ Hz), 3.44–3.69 (m, 14H), 3.76–3.99 (m, 24H), 4.22–4.25 (m, 1H), 4.62–4.66 (m, 1H), 4.94–5.16 (m, 7H), 5.97 (s, 2H), 8.05 (t, 1H, $J(\text{H,H}) = 6.9$ Hz), 8.23 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.65 (d, 1H, $J(\text{H,H}) = 8.2$ Hz), 8.87 (d, 1H, $J(\text{H,H}) = 5.6$ Hz), 9.11 (s, 1H); ^{13}C NMR (D_2O , 151 MHz) δ 51.5, 55.3, 59.1–60.3, 70.3–73.0, 80.7–

83.1, 101.5–102.0, 127.7, 128.4, 136.1, 139.5, 141.0, 141.7, 142.7, 143.8; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1304.6 (100%) $[M - O + H]^+$, 1320.7 (35%) $[M + H]^+$; elemental analysis calcd (%) for $C_{51}H_{77}N_5O_{35} \cdot H_2O \cdot C_3H_6O$: C, 46.45; H, 6.14; N, 5.02; found: C, 46.54; H, 6.34; N, 5.08.

6-(4-(6-(Hydroxyimino)methyl-pyridine-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (2b). Yield 110 mg (33%); 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 3.06 (s, 2H), 3.23–3.41 (m, 14H), 3.54–3.65 (m, 22H), 4.08 (t, 1H, $J(H,H) = 7.4$ Hz), 4.29 (t, 1H, $J(H,H) = 5.3$ Hz), 4.49–4.53 (m, 6H), 4.73–4.94 (m, 8H), 5.11 (s, 1H), 5.69–5.75 (m, 14H), 7.74 (d, 1H, $J(H,H) = 7.7$ Hz), 7.92 (t, 1H, $J(H,H) = 7.8$ Hz), 7.98 (d, 1H, $J(H,H) = 7.7$ Hz), 8.11 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 11.76 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ 50.4, 58.9–59.9, 69.7–73.2, 81.0–82.1, 101.4–102.2, 118.9, 119.7, 125.0, 137.9, 146.4, 148.7, 149.9, 152.1; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1291.1 (41%) $[M - O + H]^+$, 1307.1 (19%) $[M + H]^+$, 1313.1 (74%) $[M - O + Na]^+$, 1329.1 (100%) $[M + Na]^+$; elemental analysis calcd (%) for $C_{50}H_{75}N_5O_{35} \cdot 6H_2O$: C, 42.46; H, 6.20; N, 4.95; found: C, 42.47; H, 6.26; N, 4.67.

6-(4-(5-(Hydroxyimino)methyl-pyridine-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (2c). Yield 79.4 mg (24%); 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 2.96 (s, 2H), 3.31–3.52 (m, 14H), 3.67–3.81 (m, 22H), 4.11 (t, 1H, $J(H,H) = 8.4$ Hz), 4.26 (t, 1H, $J(H,H) = 5.1$ Hz), 4.46–4.57 (m, 6H), 4.69–4.85 (m, 8H), 5.07 (s, 1H), 5.67–5.93 (m, 14H), 8.04 (d, 1H, $J(H,H) = 8.2$ Hz), 8.11 (d, 1H, $J(H,H) = 8.1$ Hz), 8.22 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 11.55 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz) δ 50.6, 58.7–60.4, 69.8–73.3, 80.7–83.5, 101.2–102.3, 119.5, 124.5, 128.0, 133.9, 145.6, 146.7, 148.1, 150.5; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1291.2 (49%) $[M - O + H]^+$, 1307.2 (25%) $[M + H]^+$, 1313.1 (85%) $[M - O + Na]^+$, 1329.1 (100%) $[M + Na]^+$; elemental analysis calcd (%) for $C_{50}H_{75}N_5O_{35} \cdot 4H_2O$: C, 43.57; H, 6.07; N, 5.08; found: C, 43.38; H, 6.35; N, 4.90.

6-(4-(4-(Hydroxyimino)methyl-pyridine-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (2d). Yield 106 mg (31%); 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 2.97 (s, 2H), 3.21–3.47 (m, 14H), 3.58–3.83 (m, 22H), 4.11 (t, 1H, $J(H,H) = 8.1$ Hz), 4.25 (t, 1H, $J(H,H) = 4.3$ Hz), 4.40–4.56 (m, 6H), 4.66–4.95 (m, 8H), 5.06 (s, 1H), 5.67–5.89 (m, 14H), 7.50 (d, 1H, $J(H,H) = 4.6$ Hz), 8.20 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.58 (s, 2H), 11.86 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100.6 MHz) δ 50.6, 58.6–60.4, 69.8–73.3, 80.8–83.5, 101.3–102.3, 116.2, 119.5, 124.4, 141.4, 146.8, 146.9, 150.1, 150.7; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1291.1 (49%) $[M - O + H]^+$, 1307.1 (100%) $[M + H]^+$, 1313.1 (42%) $[M - O + Na]^+$, 1329.1 (96%) $[M + Na]^+$; elemental analysis calcd (%) for $C_{50}H_{75}N_5O_{35} \cdot 7H_2O$: C, 41.93; H, 6.26; N, 4.89; found: C, 41.84; H, 6.29; N, 4.68.

References

1. Tanner, D.; Wennerström, O. *Acta Chem. Scand., Ser. B* **1983**, *37*, 693–698.
doi:[10.3891/acta.chem.scand.37b-0693](https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.37b-0693)
2. McNaughton, M.; Engman, L.; Birmingham, A.; Powis, G.; Cotgreave, I. A. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 233–239. doi:[10.1021/jm030916r](https://doi.org/10.1021/jm030916r)
3. Ginsburg, S.; Wilson, I. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 481–485.
doi:[10.1021/ja01559a067](https://doi.org/10.1021/ja01559a067)
4. Hamasaki, K.; Ikeda, H.; Nakamura, A.; Ueno, A.; Toda, F.; Suzuki, I.; Osa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5035–5040. doi:[10.1021/ja00065a012](https://doi.org/10.1021/ja00065a012)

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Publikation wurde der Effekt von neun β -Cyclodextrinderivaten, die mit Oxim- oder Ketoximgruppen modifiziert waren, auf den Abbau von GF untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Scavenger in der Lage sind, den Abbau von GF unter physiologischen Bedingungen zu beschleunigen. β -Cyclodextrine mit Pyridiniumoximaten als Substituenten zeichneten sich als deutlich aktivere Scavenger aus als Oxime mit ungeladenen Pyridinringen. Dieser Befund wurde durch die höhere Acidität von Oximgruppen an Pyridiniumringen im Vergleich zu Pyridinringen erklärt. Pyridiniumoxime sind um mehr als eine Größenordnung acider als entsprechende neutrale Verbindungen.^[165] Dies führt dazu, dass sie in Lösung in einem größeren Umfang deprotoniert vorliegen, was sich positiv auf die Reaktionsgeschwindigkeit des GF-Abbaus auswirkt.

Neben der Acidität der Verbindung scheint die Anwesenheit des Cyclodextrinrings ebenfalls eine wichtige Rolle während der Abbaureaktion zu spielen. Untersuchungen mit einem enantioselektiven GC-MS-Assay zeigten, dass die beiden Enantiomere von GF unterschiedlich schnell abgebaut werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich diastereomere Einschlusskomplexe aus den beiden GF-Enantiomeren und dem β -Cyclodextrin bilden. Die unterschiedlich schnellen Abbauraten der GF-Enantiomere können entweder darauf zurückgeführt werden, dass einer der beiden Komplexe stabiler ist oder dass in einem der Komplexe die Oximatgruppe optimaler zu dem Phosphoratom des eingelagerten GF orientiert ist (Abb. 4.4).

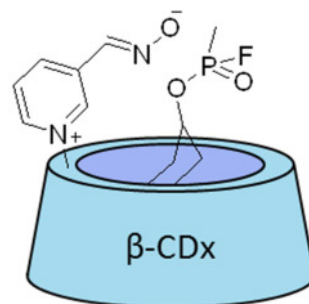


Abb. 4.4: Struktur des postulierten Komplexes aus Scavenger $\beta 18_1$ und GF.

Dass die Bindung von GF in der β -Cyclodextrinkavität den Abbau beschleunigt, konnte auch in nach dieser Publikation durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden, in denen die Wirkung von strukturanalogen Glucosederivaten auf den GF-Abbau untersucht wurden. Die Ergebnisse des Aktivitätsassays zeigten eindeutig, dass die Aktivität der Glucosederivate deutlich geringer ist als die der entsprechenden Cyclodextrinderivate, was einen synergistischen Einfluss von Oximgruppe und β -Cyclodextrinring auf den GF-Abbau belegt.

Die Kombination der Acidität des Pyridiniumoximats, der Bindung von GF in der Kavität des Cyclodextrins und der vermuteten optimalen Anordnung von Oximgruppe und dem GF P-Atom im Komplex erklären die hohe Wirksamkeit des Cyclodextrinderivats $\beta 18_1$ auf den GF-Abbau. Diese Verbindung kann GF unter den Bedingungen des Assays mit einer

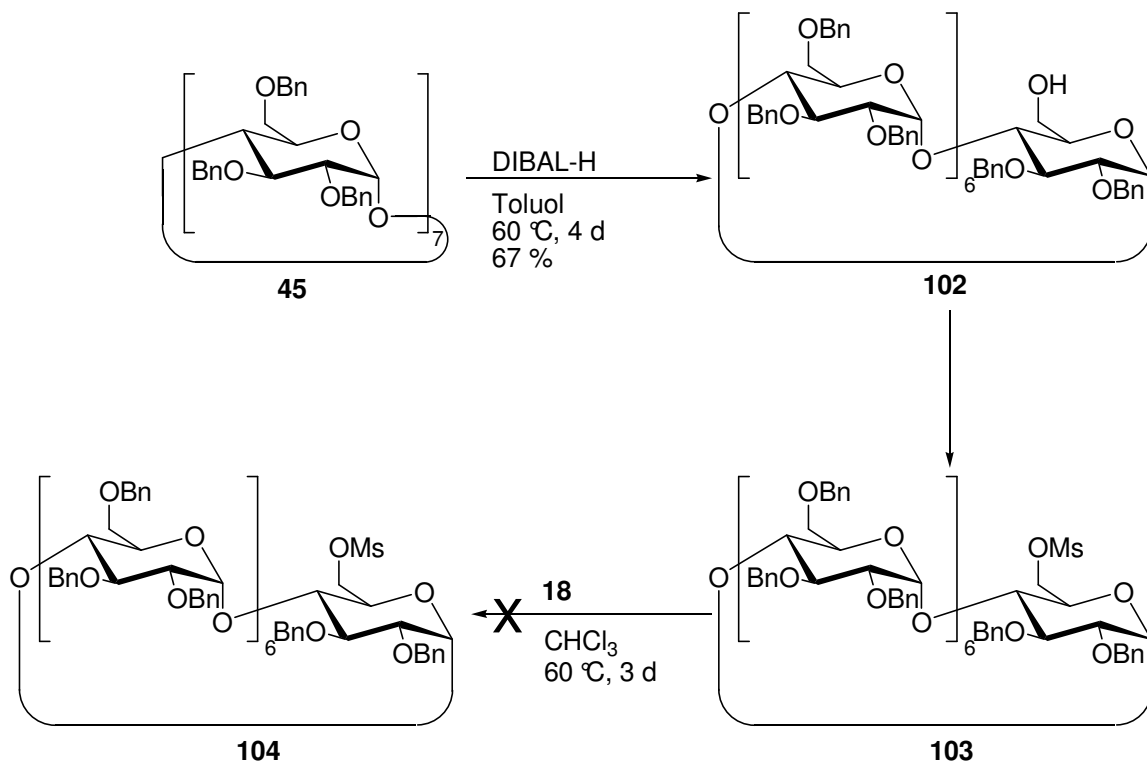
Halbwertszeit von weniger als einer Minute abbauen, wobei das toxischere (-)-Enantiomer um mehr als das 20-fache schneller abgebaut wird als das (+)-Enantiomer.

Syntheseoptimierung von $\beta 18_1$

Die sehr vielversprechenden Ergebnisse zum Abbau von GF durch $\beta 18_1$ weckten das Interesse an *in vivo* Studien. Hiermit könnte zum ersten Mal gezeigt werden, ob β -Cyclodextrin-basierte Scavenger tatsächlich als Antidote zur Behandlung von NOP-Vergiftungen eingesetzt werden können. Für diese Untersuchungen wurden von den Kooperationspartnern am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr größere Mengen des Scavengers $\beta 18_1$ benötigt.

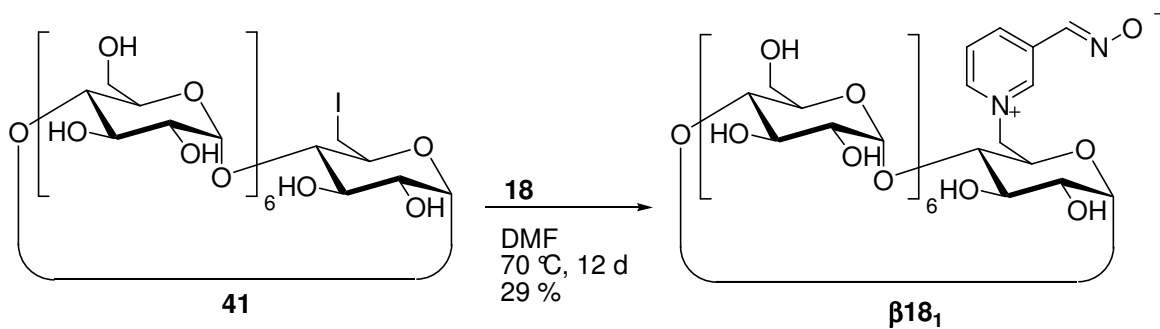
Wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, wurde Verbindung $\beta 18_1$ durch Umsetzung von 3-Pyridinaldoxim mit dem Tosylat **40** erhalten. Um an größere Substanzmengen zu gelangen, wurde der Ansatz vom 100 mg-Maßstab in den Grammmaßstab hochskaliert. Dabei war jedoch zu beobachten, dass die Ausbeute von zuvor schon mäßigen 24 % auf 14 % einbrach und zudem die Reinheit des erhaltenen Produktes nicht mehr für pharmakologische Untersuchungen geeignet war. Daher wurde nach alternativen Wegen für die Synthese von $\beta 18_1$ gesucht. Hierbei wurden zwei Wege verfolgt. Zum einen sollte **40** zuerst in das korrespondierende Iodid **41** überführt werden, um die Güte der Abgangsgruppe zu erhöhen, bevor mit 3-Pyridinaldoxims umgesetzt wurde. Weiterhin wurde untersucht, ob $\beta 18_1$ aus einem benzylgeschützten β -Cyclodextrinderivat erhalten werden kann.

Für den zweiten Weg wurde analog zu einer Literaturvorschrift das einfach debenzylierte Derivat **102** durch Behandlung von **45** mit DIBAL-*H* erhalten.^[96] Die freie OH-Gruppe von **102** wurde dann in das entsprechende Mesylat **103** überführt.^[166] Dieses wurde mit 3-Pyridinaldoxim in Chloroform umgesetzt. Es wurde ein möglichst unpolares Lösungsmittel gewählt, um das Produkt gegebenenfalls aus der Reaktionslösung auszufällen. Jedoch konnte nach Reaktionszeiten von bis zu 3 d keinerlei Bildung von **104** festgestellt werden. Auch ein Wechsel des Lösungsmittels zu DMF führte zu keiner Verbesserung (Schema 4.2).



Schema 4.2

Daher wurde von diesem Reaktionsweg Abstand genommen und der etwas einfachere Ansatz zur Syntheseoptimierung weiterverfolgt. Zunächst wurde hierfür das Tosylat **40** in das korrespondierende Iodid **41** überführt. Dieses wurde dann analog zu den bisher genutzten Reaktionsbedingungen mit 3-Pyridinaldoxim umgesetzt (Schema 4.3). Nach Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt $\beta\mathbf{18}_1$ in akzeptablen Ausbeuten von 30 % und in hoher Reinheit erhalten werden. Auf diesem Weg war es letztlich möglich, den Scavenger $\beta\mathbf{18}_1$ in einer Menge von 4 g herzustellen.



Schema 4.3

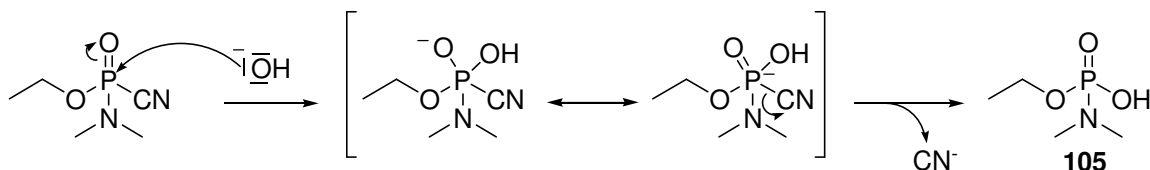
In vivo Untersuchungen zur Scavengeraktivität von $\beta 18_1$

Mit dem Scavenger $\beta 18_1$ wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr erste Tierversuchsstudien durchgeführt, die klare Hinweise auf die gewünschte Wirksamkeit von $\beta 18_1$ auch *in vivo* lieferten. Diese Ergebnisse werden in Kürze zur Publikation eingereicht. Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit der erste synthetische Scavenger entwickelt werden, der als Antidot für GF-Vergiftungen eingesetzt werden kann. Die Wirkungsweise beruht dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit auf dem Abbau von GF im Blut, bevor es zu einer AChE-Inhibierung kommen kann.

4.3.2 Hydrolyse von Tabun in wässrigem Medium

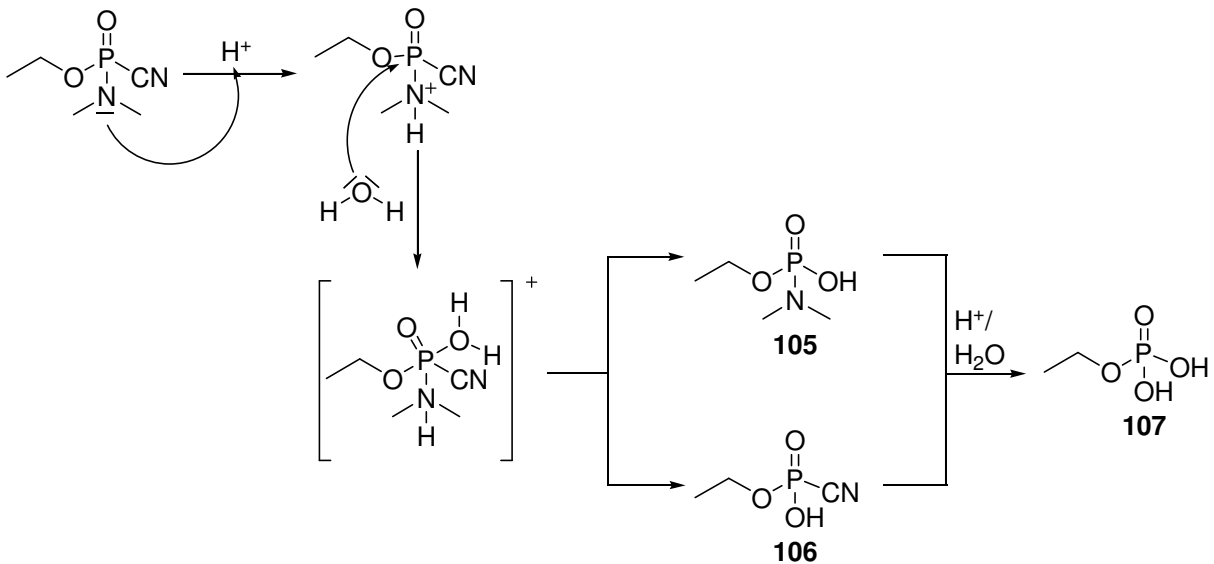
Die in Kapitel 4.3.1 beschriebenen β -Cyclodextrinderivate mit Oxim- und Ketoximgruppen wurden auch auf die Wirkung gegenüber dem G-Kampfstoff Tabun (GA) untersucht. Während es sich bei GF um ein Organophosphonat handelt, ist GA ein Organophosphat.

Für GA sind zwei unterschiedliche Wege der Hydrolyse beschrieben. Während die meisten NOPs im Basischen hydrolysiert werden und im Sauren relativ stabil sind, kann GA in beiden pH-Bereichen hydrolysiert werden.^[167] Unter basischen Bedingungen findet, wie bei anderen NOPs auch, ein nucleophiler Angriff eines Hydroxidions am Phosphoratom des Tabuns statt. Nach Abspaltung der Abgangsgruppe CN^- entsteht das Abbauprodukt Hydroxytabun **105** (Schema 4.4).



Schema 4.4

Die Hydrolyse unter sauren Bedingungen läuft nach einem anderen Mechanismus. Zunächst wird die Dimethylaminogruppe des GA protoniert.^[168] Der +M-Effekt der Dimethylaminogruppe wird dadurch zu einem -I-Effekt umgekehrt, wodurch die Nucleophilie des Sauerstoffatoms eines Wassermoleküls ausreicht, um nucleophil am Phosphoratom des Tabuns anzugreifen. Das auf diese Weise gebildete Intermediat zerfällt direkt wieder. Unter Spaltung der P-CN-Bindung wird auch in diesem Fall Hydroxytabun **105** gebildet und Blausäure freigesetzt. Zu einem gewissen Anteil wird jedoch auch die P-N-Bindung gespalten. Dabei entsteht unter der Abspaltung eines Dimethylammoniumions Verbindung **106**. Je niedriger der pH-Wert ist, umso schneller wird die Reaktion zu Verbindung **106**, während bei einem nahezu neutralen pH-Wert die Bildung von **106** nur eine untergeordnete Rolle spielt. Beide Hydrolyseprodukte, **105** und **106**, reagieren im Sauren dann in einer im Vergleich zu ihrer Bildung langsamen Reaktion weiter, wobei die noch jeweils vorhandene Abgangsgruppe abgespalten wird. Als Endprodukt wird schließlich der Monoethylphosphorsäureester **107** gebildet (Schema 4.5).^[167]



Schema 4.5

4.3.3 Abbau von GA durch Scavenger mit Oxim- und Ketoximgruppen

Die Ergebnisse zum Abbau von GA durch β -Cyclodextrinderivate mit Oxim- und Ketoximgruppen wurden in einer Publikation zusammengefasst, die in Toxicology veröffentlicht wurde.

Florian Brandhuber war bei dieser Publikation für die Entwicklung und Durchführung des quantitativen und qualitativen Enzymassays verantwortlich. Meine Aufgabe bestand in der Entwicklung und Synthese der Scavenger. Luzian Porwol hat im Rahmen seiner Diplomarbeit einige Verbindungen synthetisiert, die in dieser Publikation angesprochen werden. Oliver Tenberken hat Messzubehör und –methoden zur Verfügung gestellt und bei der Durchführung der Messungen geholfen. Herr Thiermann ist als Institutsleiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr für die Koordination der gesamten Forschungsvorhaben verantwortlich. Die Aufgabe von Herrn Worek bestand in der Koordination und wissenschaftlichen Betreuung der Arbeiten am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr. Herr Kubik war als Projektleiter für die Koordination und wissenschaftliche Bereuung an der Technischen Universität Kaiserslautern verantwortlich. Herr Reiter hat den chiralen Aktivitätsassay entwickelt und war an den Messungen beteiligt.

Publikation

Detoxification of tabun at physiological pH mediated by substituted β -cyclodextrin and glucose derivatives containing oxime groups

F. Brandhuber, M. Zengerle, L. Porwol. O. Tenberken, H. Thiermann, F. Worek, S. Kubik, G. Reiter, *Toxicology* **2012**, 302, 163-171.

Reproduced by permission of Elsevier.



Detoxification of tabun at physiological pH mediated by substituted β -cyclodextrin and glucose derivatives containing oxime groups

Florian Brandhuber^a, Michael Zengerle^b, Luzian Porwol^b, Oliver Tenberken^a, Horst Thiermann^a, Franz Worek^a, Stefan Kubik^{b,*}, Georg Reiter^a

^a Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, Neuherbergstraße 11, D-80937 München, Germany

^b Fachbereich Chemie - Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße, D-67663 Kaiserslautern, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2012

Received in revised form 28 August 2012

Accepted 29 August 2012

Available online 11 September 2012

Keywords:

Cyclodextrins
Organophosphorus compounds
Tabun
Enantiomers
Oximes
Scavenger
Acetylcholinesterase

ABSTRACT

The ability of 13 β -cyclodextrin and 2 glucose derivatives containing substituents with oxime groups as nucleophilic components to accelerate the degradation of tabun at physiological pH has been evaluated. To this end, a qualitative and a quantitative enzymatic assay as well as a highly sensitive enantioselective GC–MS assay were used. In addition, an assay was developed that provided information about the mode of action of the investigated compounds. The results show that attachment of pyridinium-derived substituents with an aldoxime group in 3- or 4-position to a β -cyclodextrin ring affords active compounds mediating tabun degradation. Activities differ depending on the structure, the number, and the position of the substituent on the ring. Highest activity was observed for a β -cyclodextrin containing a 4-formylpyridinium oxime residue in 6-position of one glucose subunit, which detoxifies tabun with a half-time of 10.2 min. Comparison of the activity of this compound with that of an analog in which the cyclodextrin ring was replaced by a glucose residue demonstrated that the cyclodextrin is not necessary for activity but certainly beneficial. Finally, the results provide evidence that the mode of action of the cyclodextrin involves covalent modification of its oxime group rendering the scavenger inactive after reaction with the first tabun molecule.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Organophosphorus compounds (OP) can possess considerable toxicity, which is why they form the basis of many insecticides, helminthicides, acaricides, or nematocides (Sultatos, 1994). Misuse of these often commercially available compounds including abuse with suicidal intentions poses a well-documented risk to human lives (Gunnell et al., 2007; Kwong, 2002). Even more problematic are the highly toxic phosphates and phosphonates such as tabun (GA), sarin (GB), or soman (GD) that were produced and stored as chemical warfare agents (nerve agents) during and after World War II. Remaining stockpiles as well as relative facile synthetic accessibility following methods described in the open literature render these compounds dangerous to the lives of civilians even today (Black and Harrison, 1996; Morita et al., 1995; Nagao et al., 1997; Suzuki et al., 1995; United Nations Security Council, 1984).

Intoxication by OP causes inhibition of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) by phosphorylation (denotes phosphorylation or phosphonylation) of a serine residue inside the active site,

leading to an inactive enzyme species. Accumulation of acetylcholine at cholinergic synapses resulting from the inability of inhibited AChE to cleave this neurotransmitter causes overstimulation of cholinergic receptors. Depending on dosage of the nerve agent and the corresponding extent of AChE inhibition, OP poisonings lead to the disturbance of numerous body functions and ultimately to respiratory arrest and death. In this context it is important to note that enantiomers of OPs usually exhibit characteristic differences in biological activity. The (–)-enantiomer of tabun is, for instance, much more toxic than the (+)-enantiomer (Tenberken et al., 2010a; Benschop and De Jong, 1988).

Atropine antagonizes the action of acetylcholine at muscarinic receptors, but is, for instance, ineffective to treat overstimulation of nicotinic receptors. Oximes, which remove the phosphyl moiety from the active site of the inhibited enzyme and thus restore enzyme activity, are therefore usually administered in addition to atropine (Eyer, 2003; Worek et al., 2007; Heath and Meredith, 1992). Problems nevertheless remain when using this combination of drugs to counteract acute OP poisonings such as insufficient oxime transport across the blood-brain-barrier, or ineffectiveness of oximes against aged enzymes or enzymes inhibited by different OPs (Worek et al., 2004). Another substantial problem is the slow clearance of different OPs, e.g. VX, from the organism (Reiter et al.,

* Corresponding author. Tel.: +49 631 205 2479; fax: +49 631 205 3921.
E-mail address: kubik@chemie.uni-kl.de (S. Kubik).

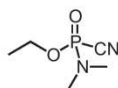


Fig. 1. Structure of tabun (GA).

2008, 2011; Tenberken et al., 2010b). Approaches to circumvent these problems involve pre-treatment (if OP exposure is anticipated) with carbamates that protect the active site of AChE from covalent modification (Herkert et al., 2008; Scott, 2007) or usage of scavengers that degrade OPs before they can react with AChE (Doctor et al., 1993; Lenz et al., 2007; Masson et al., 2008).

Among conceivable OP scavengers, cyclodextrin derivatives are particularly promising candidates. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides composed of six (α -CD), seven (β -CD), or eight (γ -CD) α -1,4-linked D-glucose units. These compounds are prototypes of host molecules able to engage in specific interactions with a variety of organic guest molecules in aqueous solution by incorporating apolar residues of the guests into their macrocyclic cavity (Szejtli, 1998). Not only are cyclodextrins and derivatives thereof efficient artificial enzyme models (Breslow and Dong, 1998), facile commercial availability and negligible toxicity also render these compounds indispensable tools in many applied areas such as food chemistry (Szejtli and Szente, 2005), cosmetics and textile industry (Hedges, 1998), nanotechnology (Ling et al., 2009), sensing (Ogoshi and Harada, 2008), and clinical medicine (Brewster and Loftsson, 2007; Loftsson et al., 2007; Szejtli, 1994; Naguib, 2007). With respect to their potential use as OP scavengers it has been shown that native cyclodextrins accelerate the cleavage of carboxylates (Cramer and Dietsche, 1959) as well as toxic phosphonates, for example sarin and soman (Desiré and Saint-André, 1987; Brass and Bender, 1973; Van Hooijdonk and Groos, 1970; Hennrich and Cramer, 1965). Moreover, modified cyclodextrins containing nucleophilic iodosylbenzoate (IBA) or oxime groups along the cavity have been shown to reduce the inhibitory effect of cyclosarin (GF), paraoxon, and tabun (GA) on AChE by mediating degradation of these OPs (Masurier et al., 2005; Wille et al., 2009; Le Provost et al., 2011; Zengerle et al., 2011). Mode of action is believed to involve a bimolecular nucleophilic substitution reaction at the OP phosphorus atom (SN2@P) (van Bochove et al., 2006; Van Hooijdonk and Breebaart-Hansen, 1970) after incorporation of the OP molecule into the cyclodextrin cavity. In native cyclodextrins, the attacking nucleophile is a deprotonated hydroxyl group most probably in 2-position of one glucose unit while modified cyclodextrins contain additional nucleophilic centers in their substituents. This combination of nucleophilic groups can lead to a synergism of the cyclodextrin ring and the substituent in OP degradation as observed, for example, for an IBA-containing β -cyclodextrin in GF degradation (Müller et al., 2011).

In spite of their promising properties, cyclodextrin derivatives active against persistent OPs such as VX are so far missing. Moreover, activities of many known cyclodextrin derivatives are still too low to effectively treat OP poisonings. We therefore initiated a research program to screen a large set of structurally diverse cyclodextrin derivatives for their ability to mediate OP degradation. This program involves synthesis of appropriately functionalized cyclodextrins and evaluation of their activity using qualitative and quantitative enzymatic assays (Wille et al., 2009, 2010) as well as an enantioselective and highly sensitive GC-MS method (Müller et al., 2011; Tenberken et al., 2010b) specifically developed for this purpose. Thus, we recently identified cyclodextrin derivative with an oxime-derived substituent (**1b**) that extremely efficiently mediates GF decomposition (Zengerle et al., 2011). Here, we show that such oxime-containing cyclodextrins also have a strong effect on the degradation of tabun (GA) (Fig. 1). In addition, we describe a

new assay developed to assess whether reaction with tabun renders the cyclodextrins inactive or not, i.e., if they act as stoichiometric or catalytic scavengers.

2. Materials and methods

2.1. Scavenger structures, syntheses, and characterization

The cyclodextrins tested as potential GA scavengers are shown in Fig. 2. All of these compounds are derivatives of the seven-membered β -cyclodextrin. They include the derivatives that have previously been investigated as GF scavengers (**1a–d** and **2a–d**) (Zengerle et al., 2011) but also new ones in which the position of the substituent on the glucose units was varied (**3a–c**). In addition, cyclodextrins were evaluated containing two substituents (**4a** and **4b**) to study the influence of the number of nucleophilic residues on activity, as well as compounds in which the cyclodextrin ring was replaced by a glucose moiety (**5a** and **5b**) to assess the effect of the macrocycle.

The new compounds **3a–c** and **4a,b** were obtained by copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition from 3-((hydroxyimino)methyl)-1-(prop-2-ynyl)pyridinium bromide and the corresponding cyclodextrin azides. Glucose derivatives **5a** and **5b** were prepared by treating 6-iodo-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranose with, respectively, 4-formylpyridine oxime or 4-acetylpyridine oxime. It should be noted that **3a–c** and **4b**, although prepared from β -cyclodextrin, are not cyclodextrin derivatives in the strictest sense because they not only contain glucose but also mannose (**3a**), allose (**3b**), or altrose (**3c** and **4b**) subunits along the ring. The presence of subunits in these compounds structurally differing from glucose is a result of the synthetic procedures used for preparation.

The following equipment was used for isolation and characterization of the newly prepared cyclodextrins: melting points, Müller SPM-X 300; NMR, Bruker Avance 600, Bruker DPX 400; MALDI-TOF-MS, Bruker Ultraflex TOF/TOF; ESI-MS, Bruker Esquire 3000; IR, FT-IR System Spectrum BX, Perkin-Elmer; elemental analysis, Elementar vario Micro cube; reversed-phase column chromatography: MERCK LiChroprep RP-18 (40–63 μ m) prepacked column size C (440-37); preparative HPLC, Dionex UltiMate 3000; column, Thermo Fisher Scientific, Beta Basic-18, 5 μ m; separation conditions for **3a–c** and **4a**: eluent, aqueous: water, organic: acetonitrile, solvent gradient: 0–6 min, 0% organic; 6–22 min, linear increase to 15% organic; 22–25 min, linear increase to 50% organic; 25–30 min, 50% organic; 30–37 min, linear decrease to 0% organic; 37–45 min, 0% organic; separation conditions for **4b**: eluent, aqueous: 0.025 M aqueous ammonia, organic: acetonitrile, solvent gradient: 0–5 min, 0% organic; 5–25 min, linear increase to 1.5% organic; 25–35 min, linear increase to 6% organic; 35–39 min, linear increase to 10% organic; 39–45 min, linear increase to 40% organic; 45–53 min, 40% organic; 53–55 min, linear decrease to 0% organic; 55–60 min, 0% organic.

Details about the synthetic work and the characterization of the compounds can be found in the Supporting information.

2.2. Materials for the assays

Acetylthiocholine iodide (ATCh), 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), and tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Disodium hydrogenphosphate dihydrate, potassium dihydrogenphosphate, and hydrochloric acid were purchased from Roth (Karlsruhe, Germany). Chloroform (SupraSolve) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany), ammonia (6.0) from Linde (Munich, Germany), and helium (6.0) from Air Liquide Germany (Munich, Germany). Ethyl *N,N*-dimethylphosphoramidocyanidate (tabun; GA; >98% by ^1H NMR and ^{31}P NMR) and the internal standard (IS) propyl *N,N*-dimethylphosphoramidocyanidate (>97% by ^1H NMR and ^{31}P NMR) were made available by the German Ministry of Defence (all experiments with GA were performed at the Bundeswehr Institute for Pharmacology and Toxicology in Munich). Hemoglobin-free human erythrocyte ghosts served as human AChE (hAChE) source and were prepared according to Dodge et al. (1963) with minor modifications (Worek et al., 2002). AChE activity was adjusted to 4000 U/L by dilution with sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.40). Aliquots of ghosts were stored at -80°C . Prior to use, ghosts were homogenized with a Sonoplus HD 2070 ultrasonic homogenator (Bandelin electronic, Berlin, Germany) twice for 5 s with a 20 s interval to achieve a homogeneous matrix.

2.3. Qualitative enzymatic assay

This assay was performed by using a Tecan Freedom Evo liquid handling system (Männedorf, Switzerland) analogously to the previously reported procedure (Wille et al., 2010). Specifically, solutions of cyclodextrin (40 μL , 2 mM, 0.1 M Tris-HCl buffer) and GA (40 μL , 36 μM , 0.1 M Tris-HCl buffer) were added to Tris-HCl buffer (80 μL , 0.1 M, pH 7.40) and incubated at 37.0°C . Immediately after mixing, a sample (25 μL) was transferred to a 24-well microplate filled with pre-heated buffer (2.40 mL, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.40 and 0.3 mM DTNB at 37.0°C) and hAChE (10 μL). After the addition of ATCh (50 μL , 49.7 mM) the microplate was transferred to a photometer and maintained at 37.0°C . AChE activity was determined by a modified Ellman assay (Ellman et al., 1961; Eyer et al., 2003; Worek et al., 1999) by following the change in absorption at 436 nm for 30 min to determine the rate of the

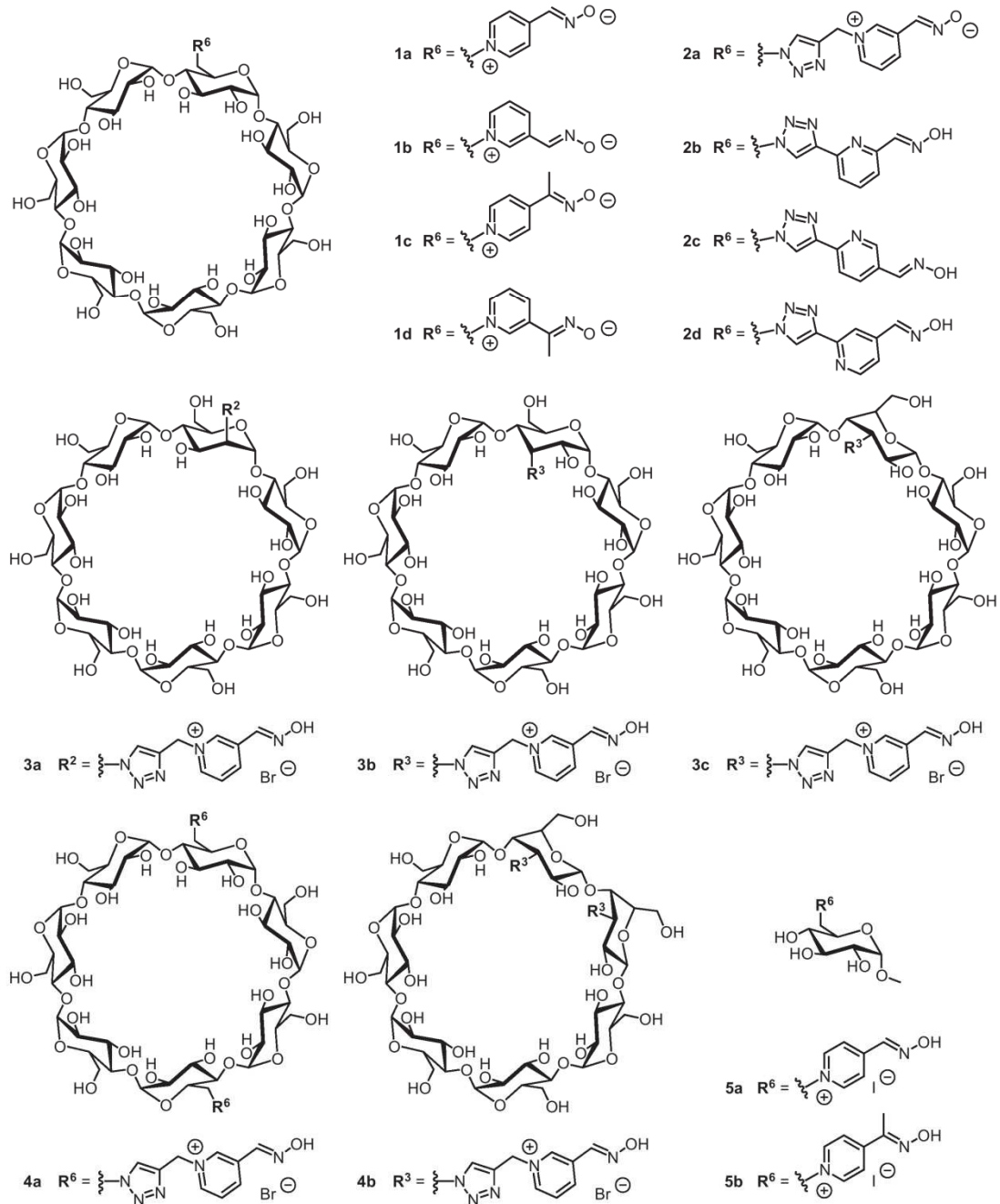


Fig. 2. Structures of the modified β -cyclodextrin and glucose derivatives used in this study. R^2 , R^3 and R^6 denote the substituent in the 2-, 3- or 6-position of a sugar subunit, respectively. Compounds **1a–d**, **2a–d** and **3a–c** are monosubstituted and **4a,b** disubstituted cyclodextrin derivatives. Compounds **5a** and **5b** represent the glucose derivatives used as reference compounds.

formation of the 2-nitro-5-thiobenzoate dianion (Ellman assay). Further aliquots of the incubation mixture were taken after 30 and 60 min and treated analogously.

First order inhibition rate constants k_1 were determined by non-linear regression analysis of the obtained curves by using Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) (Aurbek et al., 2006). Rate constants k_1^{ref} were determined by performing the assay in the absence of cyclodextrin. Finally, an independent experiment

performed in the absence of both cyclodextrin and organophosphate furnished the rate constant k_1^{native} . Relating k_1 to k_1^{ref} and k_1^{native} according to $(k_1^{ref} - k_1) / (k_1^{ref} - k_1^{native}) \cdot 100\%$ yielded Δk_1 , a term describing the activity of the cyclodextrin (Zengerle et al., 2011). If the extent of enzyme inhibition is the same in the absence and the presence of the cyclodextrin ($k_1^{ref} = k_1$) the cyclodextrin is inactive and $\Delta k_1 = 0\%$. If, however, the nerve agent disappears faster in the presence of the

Table 1
GC–MS parameters for PCI analysis of GA.

Injection program	MS parameters		
Injection volume	40 μ L	Detected masses	m/z 180, m/z 194
Injection speed	20.0 μ L/min	Dwell time	125 ms
Initial temperature	50.0 °C	Solvent delay	12.00 min
End temperature	200 °C, hold for 2.00 min		
Initial time	2.10 min		
Vent time	2.08 min		
Vent flow rate	10.0 mL/min		
Purge flow rate	50.0 mL/min		
Purge time	4.08 min		

cyclodextrin than during the background reaction, k_1 becomes smaller with respect to k_1^{ref} until it approaches the value of k_1^{native} . As a consequence Δk_1 increases up to 100% for full enzymatic activity ($k_1 = k_1^{\text{native}}$). All results shown are means \pm SD of $n=3$ experiments (SD < 10%). For the flowchart of this assay, see Fig. S1 (Supporting information).

2.4. Quantitative GC–MS assay

The quantitative GC–MS assay was performed in a stirred 2.0 mL cryo vial (Wheaton Science Products, Millville, NJ, USA) immersed in a temperature-controlled water bath (37.0 °C). GA (final concentration 1.1 μ M) was added to buffer (1.85 mL, Tris–HCl 0.1 M, pH 7.40, 37.0 °C) and an aliquot of the resulting solution (50 μ L) was immediately removed to determine the initial concentration of GA enantiomers, $c_{(+)-GA,0}$ and $c_{(-)-GA,0}$. After adding a CD solution pre-heated to 37.0 °C (200 μ L, final concentration 500 μ M) aliquots (50 μ L) were taken at defined times and transferred into a tube containing ice-cold chloroform (1.50 mL). A solution of propyl *N,N*-dimethylphosphoramidocyanidate as internal standard (IS) in 2-propanol (100 ng/mL, 10 μ L) was added immediately, the tube was shaken vigorously and placed on ice. Each sample was centrifuged (10,500 \times g, 5 min, 4.0 °C) for 10 min, the organic layer removed immediately, and transferred to a GC vial for analysis. The flowchart of this assay is depicted in Fig. S2 (Supporting information).

Quantification of GA enantiomers was performed by PCI–MS as described before (Tenberken et al., 2010b) by using a 7890A gas chromatographic system coupled to a 5975 C mass spectrometer detector with positive chemical ionization (PCI) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), large volume injection (LVI) and a CIS 4plus cold injection system (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany). Chromatographic separation was performed on a Supelco Beta DexTM 225 GC column (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness, Sigma–Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany). Helium carrier gas was set at a constant flow of 1.3 mL/min. A solvent vent stop-flow injection mode was used. An aliquot of 40 μ L was injected into an unpacked deactivated baffled siltek liner within 2.0 min at a pre-column pressure of 0 bar (Table 1). The injector initial temperature was 50 °C. The final temperature of 200 °C was reached at a rate of 12 °C/s and was kept constant for 2.00 min. The initial time and vent time were set at 2.10 and 2.08 min, respectively. The vent flow rate was set at 10 mL/min, the purge flow rate at 50 mL/min with a purge time of 4.08 min. The column temperature program started at 50 °C which was held for 4.40 min. Then the temperature was raised to 170 °C with a rate of 12 °C/min and was maintained for 5.00 min. The following conditions were used for mass spectrometric analysis: positive chemical ionization with ammonia 6.0 as reactant gas with a flow rate of 2.0 mL/min, transfer line temperature 230 °C, ion source temperature 210 °C, solvent delay 12.00 min. The target ions [$M+NH_4$] $^+$ were detected in the selected ion monitoring (SIM) mode (dwell time 125 ms each) at m/z 180 for the GA isomers and at m/z 194 for the IS isomers. The limit of quantification was estimated to be 5 pg/mL per enantiomer.

The experimental results were normalized to the initial concentration of GA in the absence of cyclodextrin, $c_{(+)-GA,0}$ and $c_{(-)-GA,0}$ by taking the difference in the initial GA concentration (1.1 μ M vs. 1.0 μ M) into account. The kinetic constants k_{obs} were determined by non-linear regression analysis of the resulting decay curves (using GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, USA) on the basis of the following equation: $c_{(+)-GA,t} = c_{(+)-GA,0} \times \exp(-k_{\text{obs}} \times t)$, in which $c_{(+)-GA,t}$ denotes the concentration of (+)-GA at time t and $c_{(+)-GA,0}$ the concentration of (+)-GA immediately after CD addition. Analogous equations were used for (–)-GA. Spontaneous rate of GA hydrolysis was determined independently.

2.5. Quantitative enzymatic assay

The quantitative enzymatic assay was performed as described before (Wille et al., 2009). In brief, GA (1 μ M) was incubated with a cyclodextrin (500 μ M) in Tris–HCl buffer (0.1 M, pH 7.40) at 37.0 °C. Samples were taken at defined times, diluted with Tris–HCl buffer (16 μ L), and 10 μ L of the diluted solutions were incubated with a nine-fold excess of hemoglobin-free erythrocyte ghosts for 30 min at 37.0 °C. An aliquot was taken and residual AChE activity was measured photometrically (Cary 50 Bio, Varian GmbH, Darmstadt, Germany) by using a modified Ellman assay (Eyer et al., 2003; Worek et al., 1999). Activities thus obtained were

referenced to a control and data are given as % of control. Processing of experimental data for the determination of detoxification rate was performed by non-linear regression analysis using curve-fitting routines implemented in GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Results shown are means \pm SD of $n=2$ experiments. Fig. S3 of the Supporting information shows a flowchart of this assay.

2.6. Repeated incubation of cyclodextrins or glucose with tabun

Separate stock solutions of cyclodextrin **1a** and glucose **5a** were prepared in Tris–HCl buffer (0.1 M, pH 7.40) and divided into a processing aliquot (990 μ L) and two control aliquots (298 μ L). The resulting six solutions were stored at 37.0 °C. A solution of tabun (GA) in acetonitrile (10.0 μ L, 1.00 mM) was added to the processing aliquot to obtain an overall volume of 1000 μ L and final concentrations of 10.0 μ M GA and 150.0 μ M scavenger. Aliquots (25 μ L) were removed at defined times and first order inhibition rate constants k_1 were determined as described in Section 2.3. Degradation of GA was complete after 6 h either due to cyclodextrin activity and/or spontaneous hydrolysis. Afterward, a solution of GA in acetonitrile (34.0 μ L, 6.17 mM) was added to 699 μ L of the remaining sample solution to obtain concentrations of 143 μ M scavenger and 286 μ M GA. This solution was incubated at 37.0 °C overnight. During the next 2 days incubation with GA, Ellman assay, and incubation with GA was performed two more times according to the flowchart depicted in Fig. S4 (Supporting information). A control sample without cyclodextrin, which allows assessing spontaneous GA hydrolysis, was analogously processed on the first day. For comparison, k_1 was also determined on the second and third day of a fresh sample (control aliquot) containing **1a** or **5a** without preliminary GA treatment. Prior to these measurements, 18 μ L on the second day and 36 μ L on the third of Tris–HCl buffer was added to the control aliquot to take the dilution of the test sample resulting from the repeated GA additions into account.

3. Results

3.1. Qualitative assay

The qualitative enzymatic assay employed to obtain first information about detoxification activity of the investigated compounds involves incubation of GA with an excess of the potential scavenger at physiological pH and estimation after defined times to what extent aliquots of these solutions inhibit AChE (Wille et al., 2010). The Ellman assay used for this purpose yields inhibition curves from which first order inhibition rate constants k_1 can be calculated. Relating these rate constants to ones determined for GA solutions lacking the scavenger gives Δk_1 , a term directly linked to scavenger activity: higher values for Δk_1 indicate higher activity. The results thus obtained for the compounds shown in Fig. 2 are summarized in Fig. 3.

Fig. 3 shows that native β -cyclodextrin exhibits no effect on GA degradation within the timeframe of the assay while clear effects are visible for most other compounds investigated. Moreover, these effects differ markedly depending on the type, position, and number of the substituents on the cyclodextrin ring. Highest activity was observed for **1a**, a cyclodextrin containing the oxime group in 4-position of a pyridinium ring. Interestingly, the corresponding 3-substituted derivative **1b**, which detoxifies GF significantly more efficiently than **1a** (Zengerle et al., 2011), has a lower activity. Compounds **1c** and **1d** with ketoximes instead of aldioximes are even less active. Compound **2a** in which the 3-substituted pyridinium residue is connected to the cyclodextrin ring via a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole moieties has similar activity as the corresponding compound **1b** with the pyridinium group directly attached to the cyclodextrin. In contrast **2b–d** with neutral pyridine rings are essentially inactive. Comparison of the activities of compounds **2a** and **3a–c** shows that the position of the substituent on the cyclodextrin ring has only a small influence on activity with the compounds containing a mannose (**3a**) and an altrose (**3c**) unit showing slightly higher activity than the ones with an allose (**3b**) or only glucose (**2a**) units. Although the number of oxime residues doubles under the conditions of the assay when the disubstituted compounds **4a** and **4b** are used, this increase in nucleophilic groups has almost no effect on activity in the case of **4b** that contains the two substituents in 3-position on two adjacent altrose units. Two

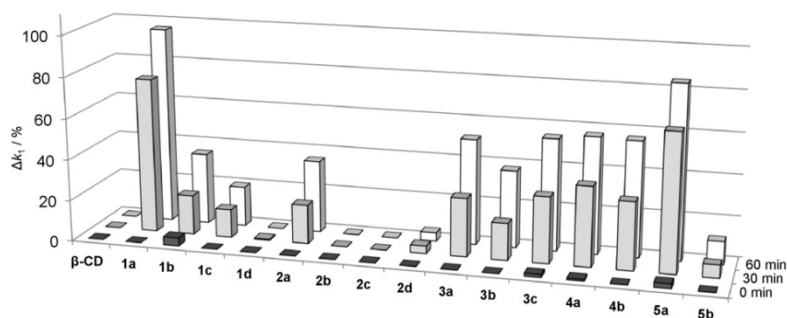


Fig. 3. Graphical representation of the Δk_1 values obtained in the qualitative enzymatic assay for the compounds shown in Fig. 2. Large columns indicate low enzyme inhibition and, consequently, high activity of the corresponding cyclodextrin. All results are means of $n = 3$ experiments (SD < 10%).

oximes in 6-position, however, cause a slightly less than two-fold increase in activity with respect to the monosubstituted derivatives (**4a** vs. **2a**). Increasing the concentration of **2a** in the assay resulted in Δk_1 values similar to those of **4a**. Most importantly, also the two glucose derivatives **5a** and **5b**, which are reference compounds for **1a** and **1c**, detoxify GA in spite of the absence of the cyclodextrin ring. Compound **5a** is somewhat less active than **1a** and **5b** shows the usual marked drop in activity characteristic for replacement of the aldoxime group in **5a** with the ketoxime group in **5b**. In this respect, it is worth mentioning that **5a** has almost no effect on the detoxification of GF (data not shown), demonstrating how important the correct combination of nucleophile and OP is for efficient detoxification.

3.2. Quantitative assays

A sensitive GC–MS assay and an enzymatic assay provided information about the exact rate with which some of the active compounds identified in the screening assay, namely the cyclodextrins **1a–c** and **2a** as well as the glucose derivative **5a**, mediate GA degradation. Previous work has shown that both assays give comparable results if detoxification is not stereoselective, i.e., if degradation of the two GA enantiomers proceeds with the same rate (Tenberken et al., 2010b; Wille et al., 2009). The advantage of the GC–MS assay is that degradation of the two enantiomers of GA, (+)-GA and (–)-GA, can be followed independently. Decay curves of selected measurements are depicted in Fig. 4.

Inactivation of GA by all compounds investigated followed strict first-order reaction kinetics ($R^2 > 0.99$) allowing calculation of rate constants k_{obs} . The results of all measurements are summarized in Table 2 along with the independently determined rate constants for the spontaneous hydrolysis of the individual enantiomers of GA.

Table 2 shows that all compounds accelerate GA degradation beyond the rate of spontaneous hydrolysis of this OP under the conditions of the assay. In addition, the results correlate well with the activities of the same compounds observed in the screening assay: highest degradation rate was mediated by **1a** containing an aldoxime group in 4-position of a pyridinium ring and the same nucleophilic group linked to glucose as in **5a** also induces relatively fast GA degradation. Half-times amount to minutes and are therefore larger than the ones observed for GF degradation where the most active scavenger (**1b**) induced detoxification of GF in less than a minute (Zengerle et al., 2011). Another important result is that GA degradation is not enantioselective: k_{obs} is the same for both GA enantiomers, while significantly different rates have previously been observed for the degradation of (+)-GF and (–)-GF (Zengerle et al., 2011).

3.3. Repeated incubation of cyclodextrin 1a with GA

In order to obtain information about the mode of action of the most potent cyclodextrin derivative **1a** and reference compound **5a** the effect of these compounds on GA degradation was followed after repeatedly treating it with an excess

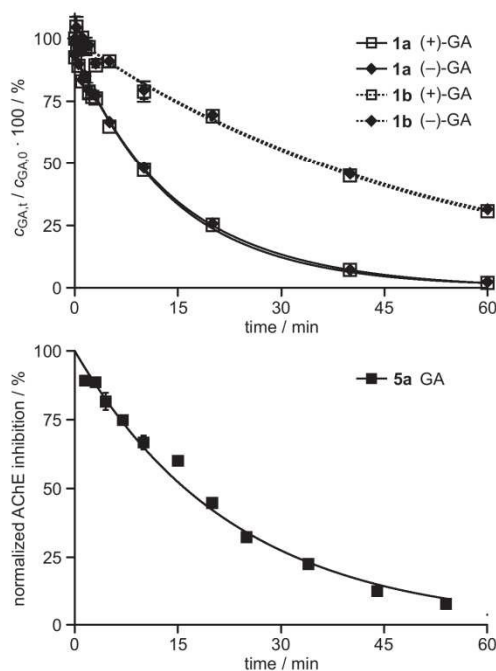


Fig. 4. Time-dependent decrease of GA concentration (initial concentration 1 μM) mediated by cyclodextrin derivatives **1a** (solid line) and **1b** (dashed line) (500 μM) at pH 7.40 and 37.0 $^\circ\text{C}$ (top graph) and of glucose derivative **5a** under the same conditions (bottom graph). The data points shown in the top graph were obtained by the quantitative GC–MS assay (means \pm SD of $n = 2$). They show the concentrations of (+)-GA and (–)-GA normalized to the initial concentrations of both enantiomers, $c_{(+)\text{-GA},0}$ and $c_{(-)\text{-GA},0}$. (+)-GA is shown as blank squares and (–)-GA as black diamonds. The lower diagram was obtained by using the quantitative enzymatic assay (means \pm SD of $n = 2$). The black squares show the time-dependent decrease of AChE inhibition mediated by the detoxification of racemic GA, which correlates with GA concentration. The obtained values were referenced to a control activity. The lines in both diagrams show the curve fits of the measurements to a first-order rate reaction ($R^2 > 0.99$).

4. Diskussion

168

F. Brandhuber et al. / Toxicology 302 (2012) 163–171

Table 2

Kinetic constants k_{obs} and half-times $t_{1/2}$ for GA degradation by cyclodextrin **1a–c**, **2a**, and glucose derivative **5a**.

	$k_{\text{obs}}/\text{min}$		$t_{1/2}/\text{min}$	
	(+)-GA	(-)-GA	(+)-GA	(-)-GA
Spontaneous GA hydrolysis	$(1.17 \pm 0.02) \times 10^{-2}$	$(1.13 \pm 0.04) \times 10^{-2}$	59.0	61.4
1a ^a	$(6.79 \pm 0.31) \times 10^{-2}$	$(6.66 \pm 0.20) \times 10^{-2}$	10.2	10.4
1b ^a	$(1.99 \pm 0.01) \times 10^{-2}$	$(1.95 \pm 0.03) \times 10^{-2}$	34.8	35.6
1c ^a	$(1.57 \pm 0.11) \times 10^{-2}$	$(1.50 \pm 0.03) \times 10^{-2}$	44.2	46.1
2a ^a	$(1.85 \pm 0.02) \times 10^{-2}$	$(1.86 \pm 0.04) \times 10^{-2}$	37.5	37.2
5a ^b	$(4.30 \pm 0.15) \times 10^{-2}$		16.1	

^a Quantitative GC–MS assay.

^b Quantitative enzymatic assay.

of GA. Specifically, **1a** and **5a** (150 μM) were incubated with GA (10 μM) and the first order inhibition rate constant k_1 was measured photometrically. After complete detoxification of GA a two-fold excess of GA was added, the mixture incubated

overnight, followed by another evaluation of the effect of an aliquot of the incubate on GA degradation. This procedure was repeated twice. The results of these measurements are shown in Fig. 5.

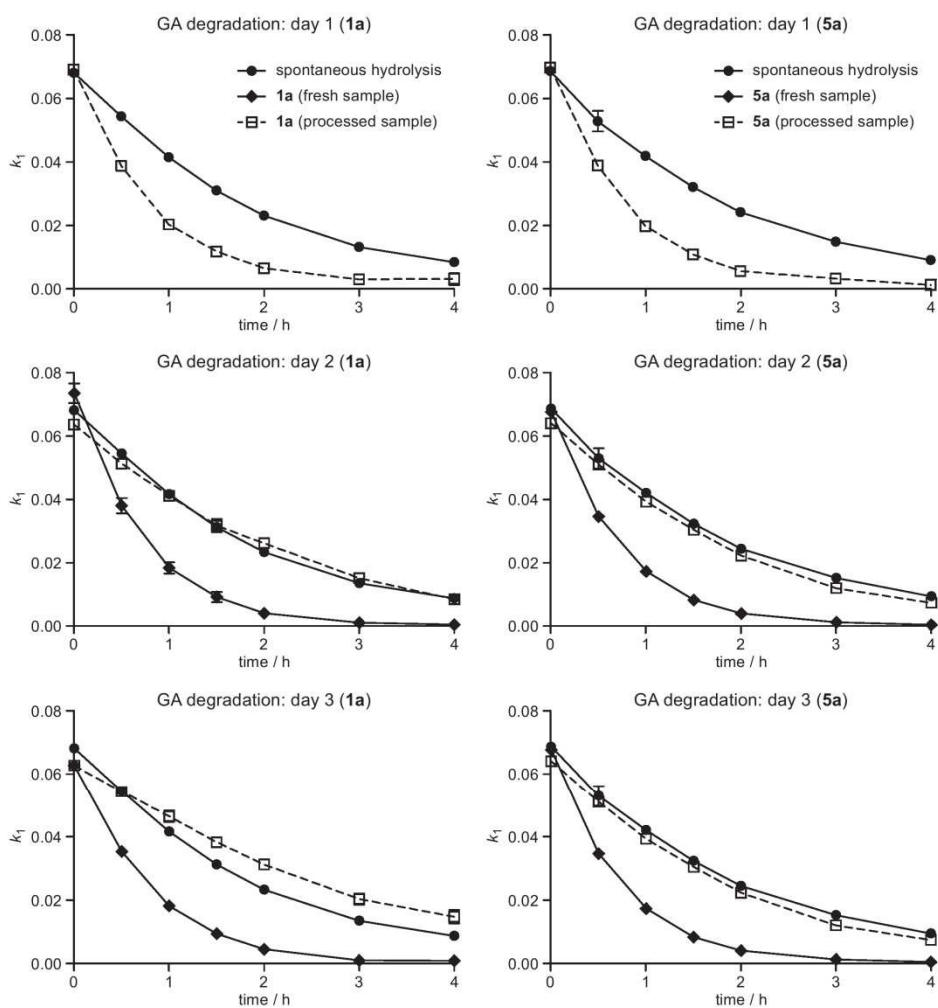


Fig. 5. Time-dependent decrease of the first order inhibition rate constant k_1 when following the degradation of GA (initial concentration 10 μM) mediated by **1a** (150 μM) (column of graphs on the left hand side) and by **5a** (150 μM) (column of graphs on the right hand side) (blank squares). The upper diagrams show the initial measurements, the center ones the measurements after a single treatment with GA (286 μM), and the bottom ones the measurements after the second treatment with GA (271 μM). The black dots indicate the rate of spontaneous GA hydrolysis. The additional curves (black diamonds) in the center and bottom diagrams show GA degradation (initial concentration 10 μM) mediated by previously untreated solutions of **1a** and **5a** prepared on day 1. All results are means \pm SD of $n = 2$ experiments.

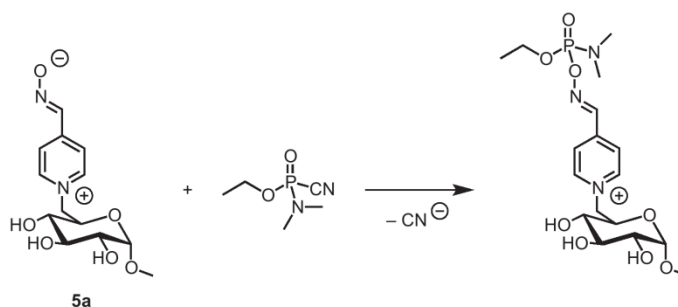


Fig. 6. Proposed mode of action of glucose derivative **5a** in the reaction with GA.

According to these measurements, degradation of GA mediated by untreated solutions of **1a** or **5a** is faster than spontaneous GA hydrolysis. A single treatment of both test compounds with an excess of GA results in a significant loss of degradation activity and the curves observed on the second and third day of the assay only reflect the rate of spontaneous GA hydrolysis. No restoration of activity was observed within the timeframe of the assay. To exclude that loss of activity after 24 h is due to degradation of **1a** and **5a**, control experiments were performed with solutions of both compounds incubated for 24 and 48 h at 37.0 °C and pH 7.40 prior to evaluating GA degradation. Fig. 5 shows that activities of both solutions are practically indistinguishable from activity of the processed solution on day 1.

4. Discussion

Our investigations show that oximes containing a β -cyclodextrin or a glucose residue are able to mediate the degradation of GA at physiological pH. Since unsubstituted β -cyclodextrin does not detoxify GA under the same conditions, the observed effects are clearly caused by the oxime groups in the substituted derivatives that, according to the design principle, seem to be able to induce GA degradation by reacting with the phosphorus atom of the OPs. The proposed initial reaction between these oximes and GA, involving phosphorylation of the oxime oxygen atom, is shown in Fig. 6 by using glucose derivative **5a** as an example. Subsequent decomposition of the initially formed phosphorylated oxime to give, e.g., a nitrile is possible (Becker et al., 1997, 2010).

Unfortunately, experimental evidence about the exact nature of the products is currently missing because our attempts to obtain information about the courses of the corresponding reactions by mass spectrometry or NMR spectroscopy have so far failed. However, it is well known that reactions between OPs and oximes generally proceed along the proposed way and it is therefore reasonable to assume that oximes **1a** or **5a** react analogously (Becker et al., 1997, 2010). Independent of the actual degradation mechanisms our results indicate that the products formed in the reaction exhibit no adverse effects on AChE because complete GA degradation yielded a fully active enzyme in our assays.

Comparison of the activities of the different oximes reveals various relationships. For example, ketoximes are generally much less active than aldoximes and pyridine derivatives possess markedly reduced activity with respect to pyridinium derivatives (Fig. 3). These effects correlate well with the pK_a values of aromatic oximes that are generally higher for pyridine than for pyridinium oximes and for ketoximes than for aldoximes. For reference, the pK_a of 3-formylpyridine, the 1-methiodide of 3-formylpyridine oxime, and the 1-methiodide of 3-acetylpyridine oxime amount to, respectively, 10.4, 9.2, and 10.2 (Ginsburg and Wilson, 1957; Mason,

1960). Oximes with lower pK_a values are deprotonated more easily, which also renders them more nucleophilic.

Among the compounds containing 3-substituted pyridinium rings differences in activities are visible but not very pronounced. The shift of the substituent on the β -cyclodextrin ring from the 6-position in **2a** into the 2-position in **3a** has a favorable effect on activity. A shift into the 3-position is only beneficial if the substituent is attached to an altrose (**3c**) rather than an allose (**3b**) moiety. These results provide evidence that the mutual arrangement of the GA molecule and the cyclodextrin ring in a possible complex has a notable, albeit small effect on degradation efficiency.

Increasing the number of substituents on the cyclodextrin ring does not have a beneficial effect beyond the mere increase in the number of nucleophilic groups causing **4a** to be ca. twice as active as **2a**. For **4b**, this effect is not visible, maybe because the two adjacent substituents in this compound cannot act independently and the first substituent prevents the second from participating in the reaction or because the cyclodextrin residue protects one of the substituents.

A significantly more pronounced increase in activity is observed by shifting the oxime group from the 3-position to the 4-position of the pyridinium ring (**1b** vs. **1a**). Again, this shift correlates with the acidity of the oxime with the 4-aldoximes of pyridinium derivatives being slightly more acidic than corresponding 3-oximes. The pK_a of the 1-methiodide of 3-formylpyridine oxime and the 1-methiodide of 4-formylpyridine oxime, for example, amount to 9.2 and 8.6 (Mason, 1960), respectively.

In this context, it is worth noting that **1a** and **1b** exhibit markedly different effects on GF and GA degradation (Zengerle et al., 2011). While **1b** is more effective to detoxify GF, **1a** is by far the better GA scavenger. This observation indicates that the acidity of the oxime group is not the only parameter to explain activity of these compounds. In the case of GF degradation, the higher activity of **1b** was rationalized by the better mutual arrangement of the oxime group and the OP phosphorus atom in the inclusion complex of both compounds, which facilitates nucleophilic attack on the phosphorus atom. An indication for the pronounced influence of the cyclodextrin ring on GF degradation was the strong enantioselectivity observed in this reaction. GA is, however, degraded with essentially no enantioselectivity. Moreover, glucose derivative **5a** lacking the cyclodextrin ring also has high activity. Thus, complexation of GA by the cyclodextrin ring seems to play a smaller role in the mode of action of **1a** and the activity is mainly due to the nucleophilicity of the oxime. This assumption is consistent with the generally lower affinity of β -cyclodextrins to substrates with short linear short alkyl chains in comparison to cyclohexanol derivatives (Buvari and Szejtli, 1983; Rekharsky and Inoue, 1998), which should render the complexes of β -cyclodextrin derivatives with GA less stable than the ones with GF. Nevertheless, our results demonstrate a favorable effect of the cyclodextrin ring on scavenger

activity. Not only is the half-time of GA degradation reduced by ca. 6 min when the glucose unit in **5a** ($t_{1/2} = 16.1$ min) is replaced by the cyclodextrin ring in **1a** ($t_{1/2} = 10.2$ min) also the dependence of degradation activity on the position of the nucleophilic group on the cyclodextrin ring indicates that specific interactions between the cyclodextrin and the OP contribute to the mode of action.

The new assay developed to obtain information on whether oxime-containing cyclodextrins react as stoichiometric or catalytic scavengers provided additional important information about the system. Considering that native β -cyclodextrin does not have any effect on GA degradation one can conclude that reaction between the potential scavenger and the OP takes place at the oxime OH group. If reaction between the oxime group in **1a** or **5a** and GA is irreversible the outcome should be a phosphorylated derivative such as the one shown in Fig. 6. This product should not be able to mediate further GA hydrolysis. If, however, the phosphoric acid ester initially formed is labile its hydrolysis will release the oxime group, which should then be able to induce degradation of further GA molecules.

The results shown in Fig. 5 demonstrate that overnight incubation of the scavengers with an excess of GA renders them completely inactive and that this loss of activity is not due to degradation of the scavengers. This result is an indication that the mode of action of these compounds does indeed involve nucleophilic attack of the oxime group on the tabun phosphorus atom to give a phosphorylated oxime. Loss of oxime nucleophilicity associated with this covalent modification explains the inactivity of the scavengers after the first round of incubation. Moreover, the phosphoric esters thus produced are sufficiently stable to resist hydrolysis during the timeframe of the assay. Complete detoxification of tabun therefore requires addition of at least one equivalent of the scavenger.

5. Conclusion

In conclusion, the systematic investigations carried out in this work provide valuable insights into the effect of oxime-containing cyclodextrin derivatives on GA degradation. Compound **1a** bearing a 4-formylpyridinium oxime residue was identified as a highly promising scavenger for the detoxification of GA at physiological pH. The structural relationship of the nucleophilic residues in **1a** to oximes used as reactivation agents for inhibited AChE, for example pralidoxime, is evident. Mode of action of the cyclodextrin derivative involves, however, direct detoxification of the OPs, presumably by mediating the cleavage of the hydrolytically most labile bond, namely the P–CN bond in GA. In addition, the results indicate that this reaction involves phosphorylation of the oxime group, a covalent modification that results in loss of activity. Complete detoxification of GA can therefore only be achieved by using the scavengers in stoichiometric amounts.

So far, our results demonstrate that the cyclodextrin ring in **1a** has a distinct but only moderate positively cooperative effect on scavenger activity. We attribute this effect to the interactions between the cyclodextrin and the GA molecule, which are, however, relatively weak. Future work will address the elucidation of the degradation mechanism and the development of strategies with which affinity between cyclodextrins and OPs can be increased. Thus, we hope to significantly increase the rate of GA detoxification to a level where in vivo applications become possible.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

This research was funded by the German Ministry of Defence (E/UR3G/9G127/9A803). The generous funding is gratefully acknowledged. In addition, the authors are grateful to M. Koller for helpful advice and E. Wagner, T. Hanning, and L. Windisch for skilful technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.08.013>.

References

- Aurbek, N., Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., Worek, F., 2006. Analysis of inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds with human and pig acetylcholinesterase. *Toxicology* 224, 91–99.
- Becker, G., Kawan, A., Szinicz, L., 1997. Direct reaction of oximes with sarin, soman, or tabun in vitro. *Arch. Toxicol.* 71, 714–718.
- Becker, C., Worek, F., John, H., 2010. Chromatographic analysis of toxic phosphorylated oximes (POX), a brief overview. *Drug Test. Anal.* 2, 460–468.
- Benschop, H.P., De Jong, L.P.A., 1988. Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation, and toxicology. *Acc. Chem. Res.* 21, 368–374.
- Black, R.M., Harrison, J.M., 1996. The chemistry of organophosphorus chemical warfare agents. In: Hartley, F.R. (Ed.), *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 781–840.
- Brass, H.J., Bender, M.L., 1973. Reactions of diaryl carbonates and methylphosphonates with cycloamyloses. *J. Am. Chem. Soc.* 95, 5391–5399.
- Breslow, R., Dong, S.D., 1998. Biomimetic reactions catalyzed by cyclodextrins and their derivatives. *Chem. Rev.* 98, 1997–2011.
- Brewster, M.E., Loftsson, T., 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 645–666.
- Buvari, A., Szejtli, J., 1983. Complexes of short-chain alcohols with β -cyclodextrin. *J. Inclusion Phenom.* 1, 151–157.
- Cramer, F., Dietsche, W., 1959. Stereospezifische Reaktionen mit Einschlußverbindungen. *Chem. Ber.* 92, 1739–1747.
- Desiré, B., Saint-André, S., 1987. Inactivation of sarin and soman by cyclodextrins in vitro. *Experientia* 43, 395–397.
- Doctor, B.P., Blick, D.W., Caranto, G., Castro, C.A., Gentry, M.K., Larrison, R., Maxwell, D.M., Murphy, M.R., Schutz, M., Waibel, K., Wolfe, A.D., 1993. Cholinesterases as scavengers for organophosphorus compounds – protection of primate performance against soman toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 87, 285–293.
- Dodge, J.T., Mitchell, C., Hanahan, D.J., 1963. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 119–130.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Eyer, P., 2003. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol. Rev.* 22, 165–190.
- Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., 2003. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal. Biochem.* 312, 224–227.
- Ginsburg, S., Wilson, L.B., 1957. Oximes of the pyridine series. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 481–485.
- Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M.R., Konraden, F., 2007. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health* 7, 357.
- Heath, A.J.W., Meredith, T., 1992. Atropine in the management of anticholinesterase poisoning. In: Ballantyne, B., Marrs, T.C. (Eds.), *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Butterworth & Heinemann, Oxford, pp. 543–554.
- Hedges, A.R., 1998. Industrial applications of cyclodextrins. *Chem. Rev.* 98, 2035–2044.
- Hennrich, N., Cramer, F., 1965. Inclusion compounds, 18. The catalysis of the fission of pyrophosphates by cyclodextrin. A model reaction for the mechanism of enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 1121–1126.
- Herkert, N.M., Eckert, S., Eyer, P., Bumm, R., Weber, G., Thiermann, H., Worek, F., 2008. Identical kinetics of human erythrocyte and muscle acetylcholinesterase with respect to carbamate pre-treatment, residual activity upon soman challenge and spontaneous reactivation after withdrawal of the inhibitors. *Toxicology* 246, 188–192.
- Kwong, T.C., 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther. Drug Monit.* 24, 144–149.
- Lenz, D.E., Yeung, D., Smith, J.R., Sweeney, R.E., Lumley, L.A., Cerasoli, D.M., 2007. Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: a mini review. *Toxicology* 233, 31–39.
- Le Provost, R., Wille, T., Louise, L., Masurier, N., Müller, S., Reiter, G., Renard, P.-Y., Lafont, O., Worek, F., Estour, F., 2011. Optimized strategies to synthesize β -cyclodextrin–oxime conjugates as a new generation of organophosphate scavengers. *Org. Biomol. Chem.* 9, 3026–3032.

- Ling, X.Y., Reinhoudt, D.N., Huskens, J., 2009. From supramolecular chemistry to nanotechnology: assembly of 3D nanostructures. *Pure Appl. Chem.* 81, 2225–2233.
- Loftsson, T., Vogensen, S.B., Brewster, M.E., Konradsdottir, F., 2007. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J. Pharm. Sci.* 96, 2532–2546.
- Mason, S.F., 1960. Tautomerism of *N*-heteroaromatic aldoximes. *J. Chem. Soc.* 22–26.
- Masson, P., Nachon, F., Broomfield, C.A., Lenz, D.E., Verdier, L., Schopfer, L.M., Lockridge, O., 2008. A collaborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters. *Chem. Biol. Interact.* 175, 273–280.
- Masurier, N., Estour, F., Froment, M.T., Lefèvre, B., Debouzy, J.C., Brasme, B., Masson, P., Lafont, O., 2005. Synthesis of 2-substituted β -cyclodextrin derivatives with a hydrolytic activity against the organophosphorylester paraoxon. *Eur. J. Med. Chem.* 40, 615–623.
- Morita, H., Yanagisawa, N., Nakajima, T., Shimizu, M., Hirabayashi, H., Okudera, H., Nohara, M., Midorikawa, Y., Mimura, S., 1995. Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. *Lancet* 346, 290–293.
- Müller, S., Koller, M., Le Provost, R., Lafont, O., Estour, F., Wille, T., Thiermann, H., Worek, F., Reiter, G., 2011. In vitro detoxification of cyclosarin (GF) by modified cyclodextrins. *Toxicol. Lett.* 200, 53–58.
- Nagao, M., Takatori, T., Matsuda, Y., Nakajima, M., Nijjima, H., Iwase, H., Iwadate, K., Amano, T., 1997. Detection of sarin hydrolysis products from sarin-like organophosphorus agent-exposed human erythrocytes. *J. Chromatogr. B* 701, 9–17.
- Naguib, M., 2007. Sugammadex: another milestone in clinical neuromuscular pharmacology. *Anesth. Analg.* 104, 575–581.
- Ogoshi, T., Harada, A., 2008. Chemical sensors based on cyclodextrin derivatives. *Sensors* 8, 4961–4982.
- Reiter, G., Mikler, J., Hill, I., Weatherby, K., Thiermann, H., Worek, F., 2008. Chromatographic resolution, characterisation and quantification of VX enantiomers in hemolysed swine blood samples. *J. Chromatogr. B* 873, 86–94.
- Reiter, G., Mikler, J., Hill, I., Weatherby, K., Thiermann, H., Worek, F., 2011. Simultaneous quantification of VX and its toxic metabolite in blood and plasma samples and its application for in vivo and in vitro toxicological studies. *J. Chromatogr. B* 879, 2704–2713.
- Rekharsky, M.V., Inoue, Y., 1998. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chem. Rev.* 98, 1875–1918.
- Scott, L., 2007. Pretreatment for nerve agent poisoning. In: Marrs, T.C., Maynard, R.L., Sidell, F.R. (Eds.), *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 343–353.
- Sultatos, L.G., 1994. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health* 43, 271–289.
- Suzuki, T., Morita, H., Ono, K., Maekawa, K., Nagai, R., Yazaki, Y., 1995. Sarin poisoning in Tokyo subway. *Lancet* 345, 980.
- Szejtli, J., 1994. Medicinal applications of cyclodextrins. *Med. Res. Rev.* 14, 353–386.
- Szejtli, J., 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 98, 1743–1753.
- Szejtli, J., Szente, L., 2005. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61, 115–125.
- Tenberken, O., Mikler, J., Hill, I., Weatherby, K., Thiermann, H., Worek, F., Reiter, G., 2010a. Toxicokinetics of tabun enantiomers in anaesthetized swine after intravenous tabun administration. *Toxicol. Lett.* 198, 177–181.
- Tenberken, O., Worek, F., Thiermann, H., Reiter, G., 2010b. Development and validation of a sensitive gas chromatography-ammonia chemical ionization mass spectrometry method for the determination of tabun enantiomers in hemolysed blood and plasma of different species. *J. Chromatogr. B* 878, 1290–1296.
- United Nations Security Council, 1984. Report S-16433, New York.
- van Bochove, M.A., Swart, M., Bickelhaupt, F.M., 2006. Nucleophilic substitution at phosphorus (S(N)2@P): disappearance and reappearance of reaction barriers. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 10738–10744.
- Van Hooidonk, C., Breebaart-Hansen, J.C.A.E., 1970. Stereospecific reaction of isopropyl methyl-phosphonofluoridate (sarin) with α -cyclodextrin. A model for enzyme inhibition. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 89, 289–299.
- Van Hooidonk, C., Groos, C.C., 1970. Model studies for enzyme inhibition. Part II. The stereospecific reaction of isopropyl *p*-nitrophenyl methylphosphonate with α -cyclodextrin in aqueous alkaline media. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 89, 845–856.
- Wille, T., Tenberken, O., Reiter, G., Müller, S., Le Provost, R., Lafont, O., Estour, F., Thiermann, H., Worek, F., 2009. Detoxification of nerve agents by a substituted β -cyclodextrin: application of a modified biological assay. *Toxicology* 265, 96–100.
- Wille, T., Thiermann, H., Worek, F., 2010. Development of a high-throughput screening for nerve agent detoxifying materials using a fully-automated robot-assisted biological assay. *Toxicol. In Vitro* 24, 1026–1031.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta* 288, 73–90.
- Worek, F., Reiter, G., Eyer, P., Szinicz, L., 2002. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Arch. Toxicol.* 76, 523–529.
- Worek, F., Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., 2004. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2237–2248.
- Worek, F., Eyer, P., Aurbek, N., Szinicz, L., Thiermann, H., 2007. Recent advances in evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning by in vitro analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 219, 226–234.
- Zengerle, M., Brandhuber, F., Schneider, C., Worek, F., Reiter, G., Kubik, S., 2011. Highly efficient cyclosarin degradation mediated by a β -cyclodextrin derivative containing an oxime-derived substituent. *Beilstein J. Org. Chem.* 7, 1543–1554.

Toxicology

Detoxification of tabun at physiological pH mediated by substituted β -cyclodextrin and glucose derivatives containing oxime groups

Florian Brandhuber^a, Michael Zengerle^b, Luzian Porwol^b, Oliver Tenberken^a, Horst Thiermann^a,
Franz Worek^a, Stefan Kubik^{*b}, Georg Reiter^a

^a *Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, Neuherbergstraße 11, D-80937 München, Germany*

^b *Fachbereich Chemie - Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße, D-67663 Kaiserslautern, Germany, Fax: +49-631-205-3921, Email: kubik@chemie.uni-kl.de*

CONTENT

3 ^A -Azido-3 ^A -deoxy- <i>allo</i> - β -cyclodextrin	S3
3 ^A ,3 ^B -Diazido-3 ^A ,3 ^B -dideoxy-bis(<i>altro</i>)- β -cyclodextrin	S3
General Procedure for the copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition	S3
2 ^A -(4-((3-((Hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)methyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazole-1-yl)-2 ^A -deoxy- <i>manno</i> - β -cyclodextrin bromide (3a)	S4
3 ^A -(4-((3-((Hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)methyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazole-1-yl)-3 ^A -deoxy- <i>allo</i> - β -cyclodextrin bromide (3b)	S4
3 ^A -(4-((3-((Hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)methyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazole-1-yl)-3 ^A -deoxy- <i>altro</i> - β -cyclodextrin bromide (3c)	S4
6 ^A ,6 ^D -Bis(4-(1-(3-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)-methyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)-6 ^A ,6 ^D -dideoxy- β -cyclodextrin dibromide (4a)	S5
3 ^A ,3 ^B -Bis(4-(1-(3-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)-methyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)-3 ^A ,3 ^B -dideoxy-bis(<i>altro</i>)- β -cyclodextrin dibromide (4b)	S5

6-(4-((Hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)-6-deoxy-1- <i>O</i> -methyl- α -D-glucopyranose iodide (5a).	S5
6-(4-(1-(Hydroxyimino)ethyl)pyridinium-1-yl)-6-deoxy-1- <i>O</i> -methyl- α -D-glucopyranose iodide (5b).	S6
Flowchart showing the protocol of the qualitative enzymatic assay	S7
Flowchart showing the protocol of the quantitative GC-MS assay	S7
Flowchart showing the protocol of the quantitative enzymatic assay	S7
Flowchart showing the protocol of the repeated incubation of cyclodextrin with OPs	S8
References	S9

3^A-Azido-3^A-deoxy-*allo*- β -cyclodextrin. Mono-3^A-(naphthalene-2-sulfonyl)- β -cyclodextrin (Fujita et al., 1986) (189 mg, 0.14 mmol) was dissolved in water (17 ml). Sodium azide (96 mg, 1.47 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 24 h. After removal of the solvent the residue was purified by reversed phase column chromatography. For this, it was subjected to a column conditioned with water. The methanol content of the eluent was gradually increased to 30% until pure product eluted. After removal of the solvent the product was washed with acetone and dried. Yield: 109 mg, (67 %); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 3.29-3.39 (m, 13 H), 3.45-3.47 (m, 1 H), 3.55-3.66 (m, 28 H), 4.47-4.54 (m, 6 H), 4.59 (t, 1H, J (H,H) = 5.4 Hz), 4.83 (m, 6 H), 4.88 (m, 1 H), 5.64-5.79 (m, 12 H), 5.88 (m, 1 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 59.9, 60.0, 66.8, 71.7-73.1, 77.4, 80.5-81.6, 100.3, 101.6, 101.9; ESI-MS, m/z (%) 1182.2 (100%, M+Na⁺); IR (KBr) cm⁻¹; 2115 (s, azide).

3^A,3^B-Diazido-3^A,3^B-dideoxy-bis(*altro*)- β -cyclodextrin. 2^A,3^A:2^B,3^B-di-*manno*-epoxide- β -cyclodextrin (Teranishi 2000) (375 mg, 0.34 mmol) was dissolved in water (26 mL). Sodium azide (160 mg, 2.46 mmol) and trimethylamine hydrochloride (233 mg, 2.44 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 7 d. After removal of the solvent the residue was purified by reversed phase column chromatography. For this, it was subjected to a column conditioned with water. The methanol content of the eluent was gradually increased to 30% until pure product eluted. After removal of the solvent the product was washed with acetone and dried. Yield: 304 mg, (75 %); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ 3.52-3.64 (m, 10 H), 3.73-3.96 (m, 26 H), 4.00-4.07 (m, 3 H), 4.10-4.19 (m, 3 H), 4.86 (d, 2 H, J (H,H) = 4.5 Hz), 4.99-5.02 (m, 3 H), 5.07 (d, 1 H, J (H,H) = 3.8 Hz), 5.11 (d, 1 H, J (H,H) = 4.0 Hz); ¹³C NMR (D₂O, 101 MHz) δ 59.9-60.4, 60.7, 61.3, 69.2, 69.4, 71.2-73.0, 75.5, 76.2, 80.1, 80.4-80.7, 100.7, 101.2-101.6, 102.4, 103.0; ESI-MS, m/z (%) 1207.3 (100%, M+Na⁺); IR (KBr) cm⁻¹, 2111 (s, azide); elemental analysis calcd (%) for C₄₂H₆₈N₆O₃₃·3 H₂O: C, 40.71; H, 6.02 ; N, 6.78; found: C, 40.72; H, 5.70; N, 6.83.

General Procedure for the copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. The corresponding β -cyclodextrin monoazide or diazide (0.30 mmol) was dissolved in ethanol/water, 1:1 (v/v) (10 mL) under an atmosphere of nitrogen. Copper(II)sulfate pentahydrate (3.75 mg, 15.0 μ mol), sodium ascorbate (11.9 mg, 60.0 μ mol), TBTA (7.96 mg, 15.0 μ mol), and 3-((hydroxyimino)methyl)-1-(prop-2-ynyl)pyridinium bromide (Zengerle et al., 2011) (108 mg, 0.45 mmol per azide group) were added successively and the resulting mixture was stirred at 25 °C for 3 d. Afterward, it was poured

into acetone under stirring. The precipitate was filtered off and washed with acetone. Isolation of the product was achieved by preparative HPLC.

2^A-(4-((3-((Hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazole-1-yl)-2^A-deoxy-manno-β-cyclodextrin bromide (3a). Prepared from 2^A-azido-2^A-deoxy-manno-β-cyclodextrin (Poon et al., 2006). Yield: 132 mg (31 %); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ 3.43-3.74 (m, 12 H), 3.79-4.01 (m, 26 H), 4.21 (m, 1 H), 4.37-4.41 (m, 1 H), 4.46 (m, 1 H), 4.79 (s, 1 H), 5.01-5.24 (m, 7 H), 5.96 (s, 2 H), 8.00 (t, 1H, *J*(H,H) = 7.1 Hz), 8.20 (s, 1 H), 8.54 (s, 1 H), 8.59 (d, 1H, *J*(H,H) = 8.2 Hz), 8.80 (d, 1H, *J*(H,H) = 6.0 Hz), 9.03 (s, 1 H); ¹³C NMR (D₂O, 101 MHz) δ 55.5, 59.5, 60.3-60.4, 62.4, 68.5, 70.7-73.2, 76.3, 77.9, 79.4, 80.3-81.0, 100.2-103.2, 127.1, 128.3, 136.2, 139.3, 141.0, 141.5, 142.6, 144.0; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1304.0 (100%, M-Br⁻-O), 1320.0 (71 %, M-Br⁻); elemental analysis calcd (%) for C₅₁H₇₈BrN₅O₃₅·2 H₂O·1 C₃H₆O: C, 43.38; H, 5.93; N, 4.68; found: C, 43.56; H, 6.30; N, 4.35.

3^A-(4-((3-((Hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazole-1-yl)-3^A-deoxy-allo-β-cyclodextrin bromide (3b). Prepared from 3^A-azido-3^A-deoxy-allo-β-cyclodextrin. Yield: 128 mg (30 %); ¹H NMR (D₂O, 600 MHz) δ 3.22-3.24 (m, 1 H), 3.44 (t, 1 H, *J*(H,H) = 9.3 Hz), 3.54-3.66 (m, 11 H), 3.78-4.04 (m, 26 H), 4.20-4.22 (m, 1 H), 4.33 (t, 1 H, *J*(H,H) = 9.8 Hz), 4.70 (d, 1 H, *J*(H,H) = 3.7 Hz), 4.95 (t, 1 H, *J*(H,H) = 10.4 Hz), 5.02 (d, 1 H, *J*(H,H) = 3.8 Hz), 5.05-5.07 (m, 4 H), 5.21 (d, 1 H, *J*(H,H) = 3.5 Hz), 5.96 (s, 2 H), 8.00 (t, 1 H, *J*(H,H) = 7.2 Hz), 8.20 (s, 1 H), 8.39 (s, 1 H), 8.60 (d, 1 H, *J*(H,H) = 8.2 Hz), 8.81 (d, 1 H, *J*(H,H) = 5.9 Hz), 9.01 (s, 1 H); ¹³C NMR (D₂O, 151 MHz) δ 55.3, 60.2, 65.4, 70.2-73.0, 77.5, 80.8-81.3, 100.7-101.8, 127.9, 128.2, 136.0, 139.2, 141.0, 141.4, 142.6, 143.9; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1304.7 (100 %, M-Br⁻-O), 1320.7 (51 %, M-Br⁻); elemental analysis calcd (%) for C₅₁H₇₈BrN₅O₃₅·4 H₂O·1 C₃H₆O: C, 42.36; H, 6.06; N, 4.57; found: C, 42.49; H, 6.47; N, 4.70.

3^A-(4-((3-((Hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazole-1-yl)-3^A-deoxy-altro-β-cyclodextrin bromide (3c). Prepared from 3^A-azido-3^A-deoxy-altro-β-cyclodextrin (Yuan et al., 2003). Yield: 217 mg (52 %); ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ 3.43-3.74 (m, 12 H), 3.79-4.01 (m, 26 H), 4.21 (m, 1 H), 4.37-4.41 (m, 1 H), 4.46 (m, 1 H), 4.79 (s, 1 H), 5.00-5.04 (m, 3 H), 5.10-5.21 (m, 4 H), 5.96 (s, 2 H), 8.00 (t, 1H, *J*(H,H) = 7.0 Hz), 8.19 (s, 1 H), 8.54 (s, 1 H), 8.58 (d, 1H, *J*(H,H) = 8.2 Hz), 8.80 (d, 1H, *J*(H,H) = 5.7 Hz), 9.03 (s, 1 H); ¹³C NMR (D₂O, 101 MHz) δ 55.4, 59.4, 60.2-60.4, 62.3, 68.4, 70.6-71.9, 72.0-73.2, 76.2, 77.8, 79.4, 80.3-80.9, 100.2, 100.8, 101.4-

101.8, 103.1, 127.1, 128.3, 136.1, 139.2, 140.9, 141.5, 142.5, 144.0; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1304.8 (100 %, M-Br⁻-O), 1320.8 (15 %, M-Br⁻); elemental analysis calcd (%) for C₅₁H₇₈BrN₅O₃₅·0.5 H₂O·0.5 C₃H₆O: C, 43.82; H, 5.74 ; N, 4.87; found: C, 44.10; H, 6.09; N, 4.79.

6^A,6^D-Bis(4-(1-(3-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6^A,6^D-dideoxy-β-cyclodextrin dibromide (4a). Prepared from 6^A,6^D-diazido-6^A,6^D-dideoxy-β-cyclodextrin (Tabushi et al., 1984). Yield: 103 mg (21 %); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 2.80-2.83 (m, 2 H), 2.93-2.97 (m, 2 H), 3.27-3.38 (m, 16 H), 3.56-3.73 (m, 16 H), 3.95-3.96 (m, 2 H), 4.28-4.31 (m, 2 H), 4.54-4.65 (m, 5 H), 4.78-4.95 (m, 7 H), 5.03 (s, 2 H), 5.70-5.88 (m, 14 H), 6.01 (s, 4 H), 8.14-8.17 (m, 2 H), 8.35-8.37 (m, 4 H), 8.73 (t, 2 H, $J(\text{H,H}) = 7.08$), 9.10 (t, 2 H, $J(\text{H,H}) = 6.54$), 9.38 (d, 2 H, $J(\text{H,H}) = 7.68$), 12.25-12.26 (d, 2 H, $J(\text{H,H}) = 2.84$); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz) δ 50.7, 55.3, 59.3-60.1, 70.0-73.2, 81.5-83.3, 101.6-102.1, 126.7, 128.4, 133.6, 139.6, 142.3, 142.5, 143.4, 144.5; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1475.1 (63 %, M-Br⁻-Br-2O), 1491.2 (100 %, M-Br⁻-Br-O), 1506.0 (37 %, M-Br⁻-Br); elemental analysis calcd (%) for C₆₀H₈₆Br₂N₁₀O₃₅·1 H₂O: C 42.76, H 5.26, N 8.31; found C 42.60, H 5.48, N 8.16.

3^A,3^B-Bis(4-(1-(3-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3^A,3^B-dideoxy-bis(*altro*)-β-cyclodextrin dibromide (4b). Prepared from 3^A,3^B-diazido-3^A,3^B-dideoxy-bis(*altro*)-β-cyclodextrin. Yield: 95 mg (19 %); ¹H NMR (D₂O, 600 MHz) δ 3.40-3.98 (m, 35 H), 4.14-4.38 (m, 6 H), 4.74 (s, 1 H), 4.90 (s, 1 H), 5.04-5.16 (m, 6 H), 5.94-6.02 (m, 4 H), 7.93 (m, 1 H), 8.08 (m, 2 H), 8.22 (s, 1 H), 8.28 (s, 1 H), 8.46 (s, 2 H), 8.66 (m, 1 H), 8.79 (m, 1 H), 8.87 (m, 1 H), 9.00 (s, 1 H), 9.08 (s, 1 H); ¹³C NMR (D₂O, 151 MHz) δ 55.4, 59.4-60.3, 61.7, 61.9, 67.4, 68.6, 70.5, 71.5-72.7, 73.0, 75.2, 76.9, 79.8, 80.2, 80.6-80.8, 100.9-101.7, 102.8, 103.4, 126.2, 127.0, 128.2, 128.3, 135.9, 136.3, 138.9, 139.4, 140.6, 141.0, 141.2, 141.3, 142.5, 142.7, 143.6; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1475.9 (100 %, M-Br⁻-Br-2O), 1491.9 (79 %, M-Br⁻-Br-O), 1505.8 (19 %, M-Br⁻-Br); elemental analysis calcd (%) for C₆₀H₈₆Br₂N₁₀O₃₅·0.5 H₂O·1 C₃H₆O: C, 43.63; H, 5.41 ; N, 8.08; found: C, 43.94; H, 5.80; N, 7.91.

6-(4-((Hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)-6-deoxy-1-O-methyl-α-D-glucopyranose iodide (5a). 6-Iodo-6-deoxy-1-O-methyl-α-D-glucopyranose (Skaanderup et al., 2002) (200 mg, 658 μmol) and 4-formylpyridine oxime (Ginsburg and Wilson 1957) (400 mg, 3.28 mmol) were dissolved in DMF (5 mL) under an atmosphere of nitrogen and stirred at 80 °C for 8 d. The reaction mixture was evaporated to dryness and the residue was washed with diethyl ether. Afterward, the crude product

was extracted three times with hot acetone p.A. (7 ml each) and dried in vacuum. Yield: 182 mg (65 %); mp. 132-134 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.92 (s, 3 H), 2.94-3.01 (m, 1 H), 3.16-3.21 (m, 1 H), 3.38-3.43 (m, 1 H), 3.75-3.80 (m, 1 H), 4.51 (d, 1 H, *J*(H,H) = 3.60), 4.67-4.72 (m, 1 H), 4.92-4.96 (m, 2 H), 5.08 (d, 1 H, *J*(H,H) = 5.12), 5.57 (d, 1 H, *J*(H,H) = 5.68), 8.23 (d, 2 H, *J*(H,H) = 6.84), 8.43 (s, 1 H), 8.95 (d, 2 H, *J*(H,H) = 6.80), 12.88 (s, 1 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 54.5, 61.3, 70.0, 71.4, 71.5, 72.9, 100.0, 123.6, 145.2, 145.9, 148.8; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 283.0 (89 %, M-Γ-O), 299.0 (100 %, M-Γ); elemental analysis calcd (%) for C₁₃H₁₉IN₂O₆·0.5 H₂O·0.2 C₃H₆O: C 36.56, H 4.78, N 6.27; found C 36.75, H 4.93, N 6.28.

6-(4-(1-(Hydroxyimino)ethyl)pyridinium-1-yl)-6-deoxy-1-*O*-methyl- α -D-glucopyranose iodide (5b). This compound was synthesized analogously to **5a** by using 4-acetylpyridine oxime (Ginsburg and Wilson 1957) (447 mg, 3.28 mmol) instead of 4-formylpyridine oxime. Yield: 160 mg (55 %); mp. 221-223 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.24 (s, 3 H), 2.91 (s, 3 H), 2.92-3.00 (m, 1 H), 3.15-3.20 (m, 1 H), 3.37-3.43 (m, 1 H), 3.76-3.81 (m, 1 H), 4.51 (d, 1 H, *J*(H,H) = 3.56), 4.69-4.74 (m, 1 H), 4.91 (d, 1 H, *J*(H,H) = 6.29), 4.94-4.98 (m, 1 H), 5.07 (d, 1 H, *J*(H,H) = 5.18), 5.56 (d, 1 H, *J*(H,H) = 5.68), 8.31 (d, 2 H, *J*(H,H) = 6.76), 8.94 (d, 2 H, *J*(H,H) = 6.80), 12.73 (s, 1 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 10.8, 54.5, 61.0, 70.0, 71.4, 71.6, 72.9, 100.0, 122.9, 145.5, 150.5, 151.9; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 297.0 (35 %, M-Γ-O), 313.0 (100 %, M-Γ); elemental analysis calcd (%) for C₁₄H₂₁IN₂O₆·0.4 H₂O·0.3 C₃H₆O: C 38.50, H 5.12, N 6.03; found C 38.70, H 5.34, N 6.12.

Figure S1: Flowchart showing the protocol of the qualitative enzymatic assay (section 2.2).

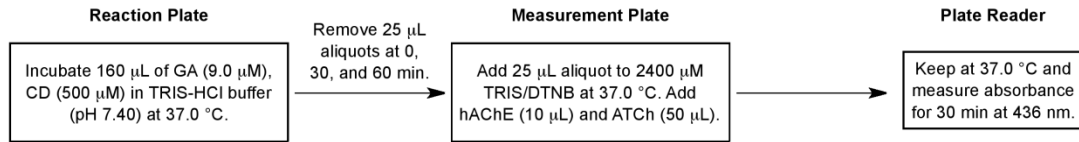


Figure S2: Flowchart showing the protocol of the quantitative GC-MS assay (section 2.3).

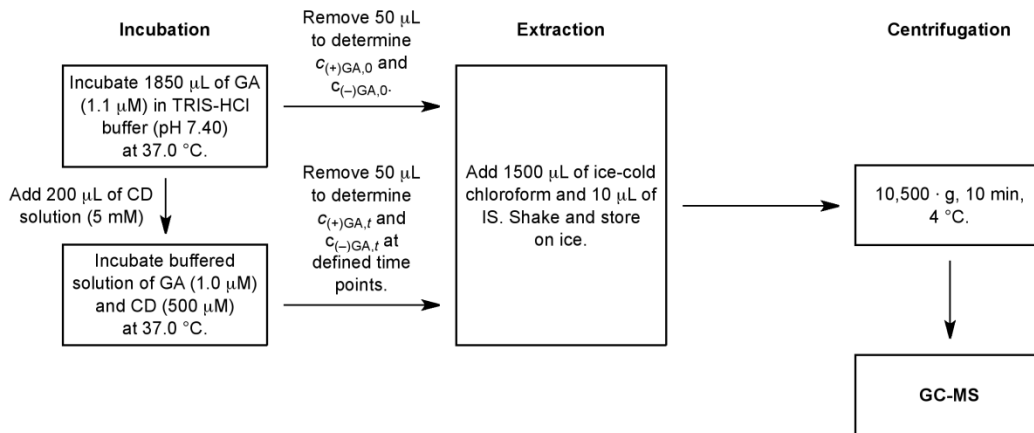


Figure S3: Flowchart showing the protocol of the quantitative enzymatic assay (section 2.4).

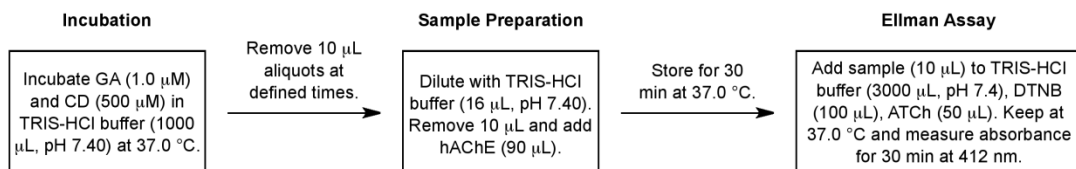
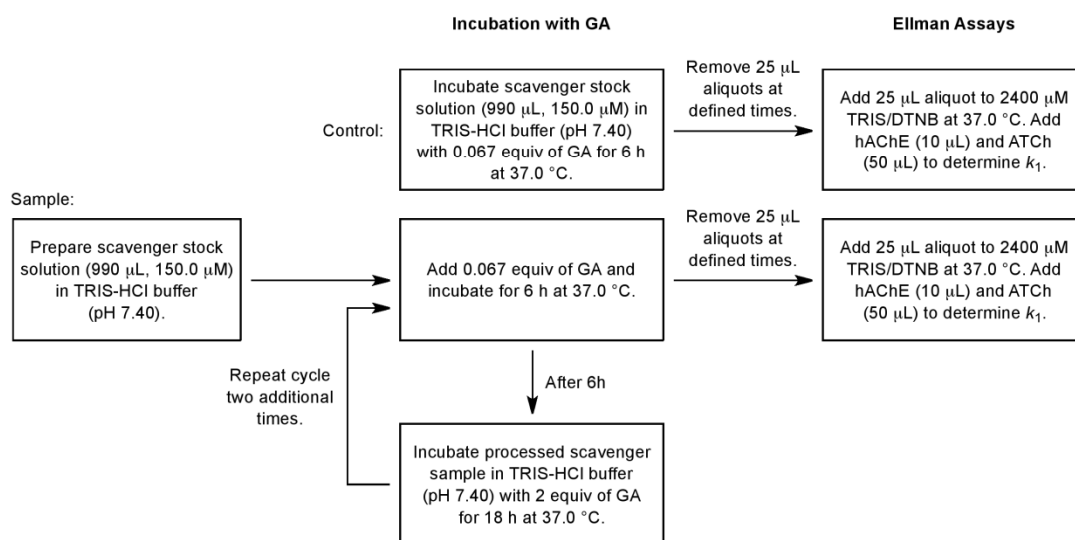


Figure S4: Flowchart showing the protocol of the repeated incubation of cyclodextrin with OPs (section 2.5).



References

- Fujita, K., Tahara, T., Imoto, T., Koga, T., 1986. Regiospecific sulfonation onto C-3 hydroxyls of β -cyclodextrin. Preparation and enzyme-based structural assignment of 3A,3C and 3A3D disulfonates. *J. Am. Chem. Soc.* 108, 2030-2034.
- Ginsburg, S., Wilson, I.B., 1957. Oximes of the pyridine series. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 481-485.
- Poon, Y.-F., Muderawan, I.W., Ng, S.-C., 2006. Synthesis and application of mono-2^A-azido-2^A-deoxyperphenylcarbamoylated β -cyclodextrin and mono-2^A-azido-2^A-deoxyperacetylated β -cyclodextrin as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1101, 185-197.
- Skaanderup, P.R., Poulsen, C.S., Hyldtoft, L., Jørgensen, M.R., Madsen, R., 2002. Regioselective conversion of primary alcohols into iodides in unprotected methyl furanosides and pyranosides. *Synthesis*, 1721-1727.
- Tabushi, I., Yamamura, K., Nabeshima, T., 1984. Characterization of regiospecific A,C-disulfonate and AD-disulfonate capping of β -cyclodextrin. Capping as an efficient production technique. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 5267-5270.
- Teranishi, K., 2000. Practicable regiospecific bifunctionalization on the secondary face of α - and β -cyclodextrins. *Chem. Commun.*, 1255-1256.
- Yuan, D.-Q., Tahara, T., Chen, W.-H., Okabe, Y., Yang, C., Yagi, Y., Nogami, Y., Fukudome, M., Fujita, K., 2003. Functionalization of cyclodextrins via reactions of 2,3-anhydrocyclodextrins. *J. Org. Chem.* 68, 9456-9466.
- Zengerle, M., Brandhuber, F., Schneider, C., Worek, F., Reiter, G., Kubik, S., 2011. Highly efficient cyclosarin degradation mediated by a β -cyclodextrin derivative containing an oxime-derived substituent. *Beilstein J. Org. Chem.* 7, 1543-1554.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Publikation wurde systematisch der Einfluss von Oximen, die Cyclodextrinreste enthalten, auf den Abbau von GA untersucht. Während Scavenger, die Oxime an Pyridinringen tragen, keine Wirkung auf den Abbau von GA zeigten, sind nahezu alle Scavenger, die Pyridiniumoxime und -ketoxime enthalten, in der Lage, GA abzubauen. Als potentester Scavenger stellte sich **β 19₁** heraus. Vergleicht man die Struktur von **β 19₁** mit der des aktivsten GF-Scavengers fällt auf, dass sich beide Verbindungen nur durch die Position der Oximatgruppe im Pyridiniumring unterscheiden. Während Verbindung **β 18₁**, die die Oximatgruppe in 3-Position des Pyridiniumrings trägt, gegenüber GF aktiver ist, wird GA durch Verbindung **β 19₁**, die die Oximatgruppe in 4-Position trägt, schneller abgebaut. Es ist hier also eine klare Struktur-Wirkungsbeziehung zu erkennen (Abb. 4.5).

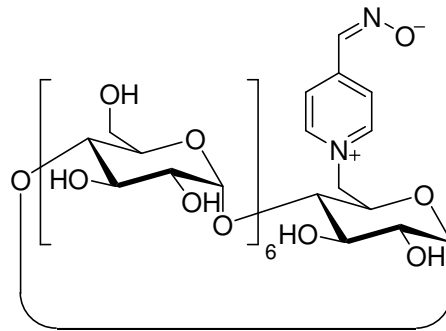
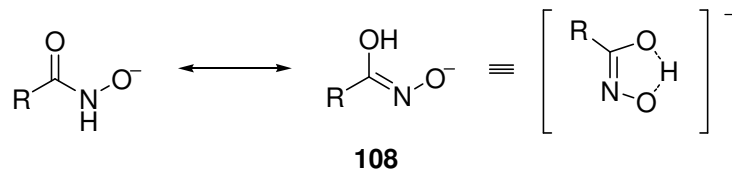


Abb. 4.5: Struktur von **β 19₁**.

Erstmals wurde in dieser Publikation auch ein Assay beschrieben, der Aufschluss gibt, ob die hier untersuchten Scavenger stöchiometrisch oder katalytisch wirken. Dabei stellte sich heraus, dass **β 19₁** in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden muss, um einen vollständigen Abbau von GA zu gewährleisten. Die Untersuchungen mittels des chiralen GC-MS-Assays zeigten Halbwertszeiten für den Abbau von GA durch **β 19₁** im Bereich von 10 min. Beide Enantiomere des GA wurden gleich schnell abgebaut. Der GA-Abbau in Gegenwart des strukturanalogen Glucosederivat **β 19₁** war gleich schnell. Diese Beobachtungen sind Indizien dafür, dass eine Bindung von GA in der Cyclodextrinkavität unwahrscheinlich ist: zum einen ist der GA-Abbau nicht enantioselektiv und zum anderen ist ein Glucosederivat ähnlich aktiv wie ein entsprechendes Cyclodextrinderivat. In der Tat stellt die Ethylgruppe in GA keinen guten Gast für β -Cyclodextrin dar.

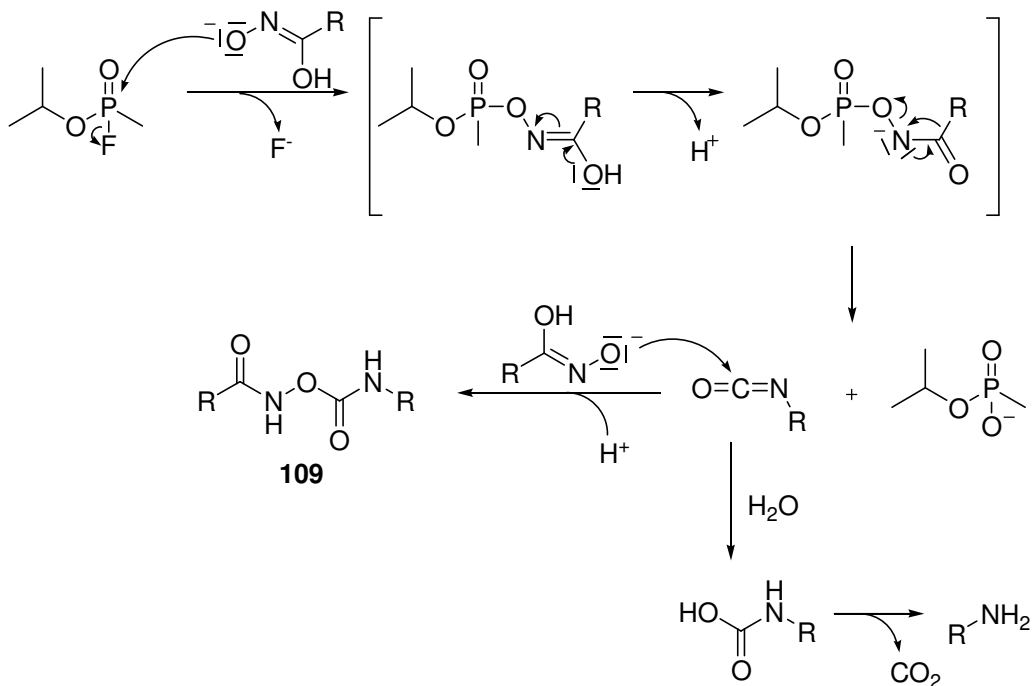
4.4 Abbau von NOPs durch Hydroxamsäuren

Eine beschleunigende Wirkung von Hydroxamsäuren auf den Abbau von NOPs wurde bereits beschrieben.^[169] Auf Grund des pK_s -Werts von Hydroxamsäuren nahe dem physiologischen pH-Wert, ist davon auszugehen, dass ein Großteil unter physiologischen Bedingungen in der deprotonierten Form, dem Hydroxamat, vorliegt. Das Hydroxamat kann in zwei unterschiedlichen Tautomeren existieren (Schema 4.6).^[170] Dabei sollte Tautomer **108** überwiegen, da dieses eine cyclische, durch eine Wasserstoffbrücke stabilisierte Konformation annehmen kann.



Schema 4.6

Nach Literaturvorstellungen greift Tautomer **108** am Phosphoratom eines NOPs nucleophil unter Abspaltung einer Abgangsgruppe an. Dabei wird die Reaktion durch Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxygruppe von **108** und dem P=O-Sauerstoffatom des NOP begünstigt, da dadurch die Elektronendichte am Phosphoratom herabgesetzt und der Angriff des Hydroxamat-Oxoanions erleichtert wird. Im Gegensatz zu Oximen, die mit NOPs stabile phosphonylierte Produkte bilden können, sind phosphonylierte Hydroxamsäuren als vergleichsweise instabil beschrieben, weswegen sie unter leicht basischen Bedingungen schnell wieder gespalten werden.^[171] Durch Lossen-Umlagerung wird nach Deprotonierung der Hydroxygruppe der Hydroxamsäure die N-O-Bindung der Hydroxamsäure gespalten, wobei das hydroxylierte NOP entsteht.^[171] Das zurückbleibende Fragment der Hydroxamsäure lagert sich unter Bildung eines Isocyanats um. Dieses reagiert unter den wässrigen Bedingungen zunächst zu einer Carbaminsäure, die dann unter Decarboxylierung ein Amin liefert. Alternativ kann überschüssiges Hydroxamat an das Isocyanat unter Bildung des Additionsproduktes **109** addiert werden (Schema 4.7 am Beispiel von Sarin).^{[172][173]}



Schema 4.7

4.4.1 Abbau von GA durch Scavenger mit Hydroxamsäuregruppen

Die Wirkung einiger der in dieser Arbeit hergestellten Hydroxamsäurederivate auf den OP-Abbau wurde in einer Publikation in Chemical Communications beschrieben. Diese Publikation enthält auch Untersuchungen zum Abbaumechanismus. In diesem Zusammenhang wurde zudem der Einfluss von methylierten und dimethylierten Hydroxamsäuren auf den GA-Abbau untersucht.

Florian Brandhuber war bei dieser Publikation für die Durchführung des quantitativen und qualitativen Enzymassays verantwortlich. Meine Aufgabe bestand in der Entwicklung und Synthese der Scavenger. Luzian Porwol hat im Rahmen seiner Diplomarbeit einige Verbindungen synthetisiert, die in dieser Publikation angesprochen werden. Anne Bierwisch hat NMR- und MS-Studien zur Aufklärung des Abbaumechanismus durchgeführt. Frau Koller betreut am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr das NMR-Gerät und war an der Durchführung der NMR-spektroskopischen Messungen beteiligt. Herr Reiter hat den chiralen Aktivitätsassay entwickelt und war an den Messungen beteiligt. Die Aufgabe von Herrn Worek bestand in der Koordination und wissenschaftlichen Betreuung der Arbeiten am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr. Herr Kubik war als Projektleiter für die Koordination und wissenschaftliche Betreuung an der Technischen Universität Kaiserslautern verantwortlich.

Publikation

Tabun scavengers based on hydroxamic acid containing cyclodextrins

F. Brandhuber, M. Zengerle, L. Porwol. A. Bierwisch, M. Koller, G. Reiter, F. Worek, S. Kubik, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3425-3427.

Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

Tabun scavengers based on hydroxamic acid containing cyclodextrins†

Cite this: *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 3425

Received 19th February 2013,
Accepted 6th March 2013

DOI: 10.1039/c3cc41290c

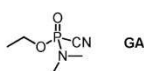
www.rsc.org/chemcomm

Florian Brandhuber,^a Michael Zengerle,^b Luzian Porwol,^b Anne Bierwisch,^a Marianne Koller,^a Georg Reiter,^a Franz Worek^a and Stefan Kubik^{*b}

Arrangement of several hydroxamic acid-derived substituents along the cavity of a cyclodextrin ring leads to compounds that detoxify tabun in TRIS-HCl buffer at physiological pH and 37.0 °C with half-times as low as 3 min.

Tabun (ethyl dimethylphosphoramidocyanidate, **GA**) is a highly toxic organophosphate developed in 1936 and manufactured although never used as a chemical warfare agent during World War II. The toxic effects of **GA** are mainly related to the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), the enzyme hydrolysing the neurotransmitter acetylcholine, by covalent modification of a serine residue in the protein's active site.¹ The mode of action of **GA** is thus closely related to that of other organophosphorus-derived nerve agents such as sarin, soman, or VX.²

Poisonings with organophosph(on)ates (OP) are typically treated by administration of atropine and certain oximes.³ Atropine antagonises the action of acetylcholine at muscarinic receptors while the oximes reactivate inhibited AChE by cleaving the ester on the serine hydroxyl group. Because phosphonates formed with, for example, sarin or VX are more easily cleaved by oximes than the phosphoramidate formed by **GA**, therapeutic effects of oximes are smaller in the case of **GA** poisonings.²



An alternative strategy to treat OP poisonings comprises degradation of the nerve agent prior to its reaction with AChE. In this context, scavengers on the basis of hydrolytically active enzymes have been developed⁴ as well as those based on low molecular weight compounds.⁵ Particular interesting lead structures for the

development of low molecular weight scavengers are cyclodextrins because of their non-toxicity and well-known ability to mediate the hydrolysis of esters including those of phosphoric acid.^{6–8} Indeed, β -cyclodextrin derivatives with oxime-derived substituents along the cavity have been shown to cause rapid detoxification of cyclosarin (within seconds under the conditions of the assay).⁹ The activity is believed to benefit from inclusion of the cyclohexyl residue of the OP into the cyclodextrin cavity, which brings the cyclosarin phosphorus atom in close proximity to the appended nucleophilic group.

The effects of substituted cyclodextrin derivatives on **GA** degradation are usually smaller. A β -cyclodextrin containing one 3-carboxyl-4-iodosobenzoyloxy residue in the 2-position of a glucose subunit detoxifies **GA** in TRIS-HCl buffer (pH 7.40) at 37 °C with a half-time of 8.4 min, for example.⁸ Under similar conditions, a substituted β -cyclodextrin derivative containing an oxime group along the narrow opening has been shown by us to degrade **GA** with a half-time of 10.3 min.¹⁰ With a *ca.* six-fold acceleration over the rate of spontaneous **GA** degradation the activity of this compound is far too low to render its use as a scavenger for the treatment of **GA** poisonings a realistic prospect.

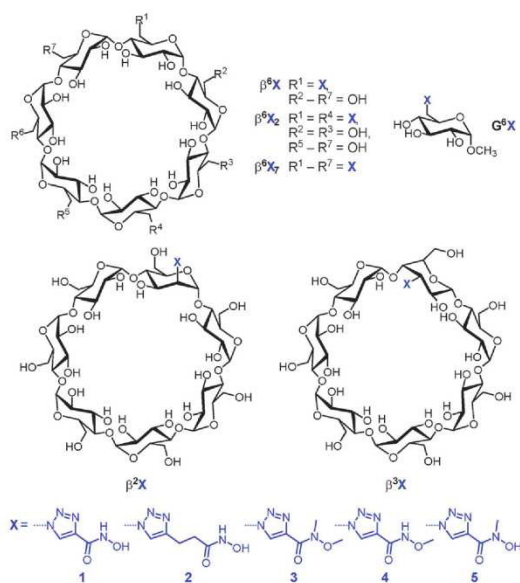
Here we show that hydroxamic acids detoxify **GA** more efficiently than oximes. Although their ability to degrade OPs is known for some time,¹¹ hydroxamic acids have, to the best of our knowledge, not been used as nucleophilic groups in cyclodextrin-derived OP scavengers so far. According to our results these groups can lead to scavengers that detoxify **GA** at pH 7.40 and 37.0 °C with a half-time of *ca.* 3.0 min when appropriately arranged along the β -cyclodextrin cavity, which is a substantial improvement over previous systems.

While screening for cyclodextrin-based OP scavengers we came across β -cyclodextrin derivative $\beta^6\mathbf{1}$, which exhibited a stronger effect on **GA** degradation than the previously prepared oximes.¹⁰ With this new lead structure in hand we performed structural variations by arranging the hydroxamic acid residue on the secondary side of the β -cyclodextrin ring ($\beta^2\mathbf{1}$, $\beta^3\mathbf{1}$),[†] increasing the number of substituents ($\beta^6\mathbf{1}_2$, $\beta^6\mathbf{1}_7$), varying the cyclodextrin diameter ($\alpha^6\mathbf{1}_6$, $\gamma^6\mathbf{1}_8$, see ESI[†] for structures), changing the structure of the hydroxamic acid ($\beta^6\mathbf{2}$), or introducing methyl groups on one or both heteroatoms of the -NHOH group ($\beta^6\mathbf{3}$, $\beta^6\mathbf{4}$, $\beta^6\mathbf{5}$, $\beta^6\mathbf{5}_2$, $\beta^6\mathbf{5}_7$). In addition, glucose derivatives $\mathbf{G}^6\mathbf{1}$ and $\mathbf{G}^6\mathbf{5}$ have also been synthesised to elucidate

^a Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, Neuherbergstraße 11, D-80937 München, Germany

^b Fachbereich Chemie – Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße, D-67663 Kaiserslautern, Germany.
E-mail: kubik@chemie.uni-kl.de; Fax: +49-631-205-3921

[†] Electronic supplementary information (ESI) available: Synthetic procedures and experimental details and results of the activity and NMR assays. See DOI: 10.1039/c3cc41290c



the effect of the cyclodextrin subunit on the degradation rate. All compounds were prepared from known azides and respective terminal alkynes by using the copper(I)-catalysed Huisgen cycloaddition and were isolated in analytically pure form (see ESI†).

The initial test to assess the effect on GA degradation involved incubation of the OP with an excess of a potential scavenger in TRIS-HCl buffer (pH 7.40) at 37.0 °C and estimation after 0, 30, and 60 min to what extent aliquots of these incubated samples inhibit AChE.^{9,10,12} The inhibitory activity was related to the activity of a GA solution incubated in the absence of the test compounds. The resulting parameter Δk_1 correlates with scavenger activity: higher values for Δk_1 indicate higher activity. The results obtained are summarised in Fig. 1.

Fig. 1 shows that native β -cyclodextrin does not detoxify GA within the time frame of the assay. In contrast, all derivatives containing hydroxamic acid **1** are active, almost completely degrading the OP within 30 min. The position of the substituent on the cyclodextrin ring has obviously no large effect on degradation efficiency: compounds $\beta^6\mathbf{1}$, $\beta^2\mathbf{1}$, and $\beta^3\mathbf{1}$ are all similarly active.

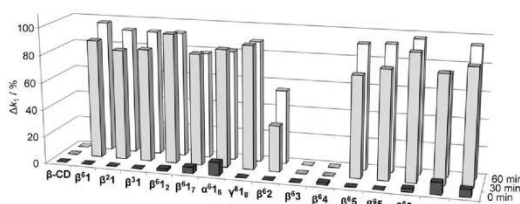


Fig. 1 Bar chart indicating the ability of the investigated hydroxamic acids to mediate GA degradation. Large columns indicate high activity. For reference the results obtained for native β -cyclodextrin (β -CD) are also shown. All results are means of $n = 3$ experiments. Standard deviation of a series of measurements with the same batch of AChE is $< 10\%$. Because the results can vary more strongly if different enzyme preparations are used we assume an overall error of 20%.

Not surprisingly, increasing the number of substituents on the β -cyclodextrin ring to 2 in $\beta^6\mathbf{1}_2$ and 7 in $\beta^6\mathbf{1}_7$, also yields active scavengers as does appending hydroxamic acid **1** to α - and γ -cyclodextrin as in $\alpha^6\mathbf{1}_6$ and $\gamma^6\mathbf{1}_8$. Compound $\beta^6\mathbf{2}$ decomposes GA only slowly indicating that the direct attachment of the hydroxamic acid group to the triazole moiety is crucial for activity. Methylation of the nitrogen and the oxygen atom of the $-\text{NHOH}$ group ($\beta^6\mathbf{3}$) or of only the oxygen atom ($\beta^6\mathbf{4}$) yields completely inactive compounds clearly demonstrating that the OH group of the hydroxamic acid is involved in the degradation mechanism. Derivatives with a methyl group on the hydroxamic acid nitrogen atom ($\beta^6\mathbf{5}$, $\beta^6\mathbf{5}_2$, $\beta^6\mathbf{5}_7$) exhibit activity, however. Finally, it is important to point out that the glucose derivatives $\mathbf{G}^6\mathbf{1}$ and $\mathbf{G}^6\mathbf{5}$ are also rather active, suggesting that the cyclodextrin ring is not essential for GA degradation.

These results provided qualitative information about the activities of the whole set of investigated compounds showing that many of them possess promising properties. Exact rates of GA degradation were subsequently determined for compounds that exhibited restoration of more than 75% of AChE activity after 30 min of incubation in the qualitative assay. Quantitative measurements involved incubation of GA (1.0 μM in aqueous TRIS-HCl buffer at pH 7.40 and 37.0 °C) with a hydroxamic acid (500 μM) and determination of the inhibitory activity of this solution on AChE at defined intervals. After referencing the results to a control experiment, in which GA was incubated in the absence of the scavenger, pseudo first order rate constants k_{obs} were calculated from the resulting decay curves.¹² Rate constants and half times thus obtained are shown in Table 1.

Table 1 shows that all hydroxamic acids accelerate GA degradation significantly beyond the rate of spontaneous hydrolysis. With a half time of 8.6 min $\beta^6\mathbf{1}$ is almost 2 min more active than our best oxime-containing β -cyclodextrin.¹⁰ Moving the hydroxamic acid to the secondary face of the ring causes a reduction in efficiency. Since there are no indications that the activity of $\beta^6\mathbf{1}$ is positively influenced by specific interactions between the cyclodextrin ring and the GA molecule because glucose derivative $\mathbf{G}^6\mathbf{1}$ is practically as active as $\beta^6\mathbf{1}$, we attribute the lower activities of $\beta^2\mathbf{1}$ and $\beta^3\mathbf{1}$ to a more difficult accessibility of the hydroxamic acid group in these compounds.

Compound $\beta^6\mathbf{1}_2$ is more active than the monosubstituted analogue, consistent with the fact that the number of nucleophilic centres in solution increases by replacing $\beta^6\mathbf{1}$ with an

Table 1 Kinetic constants k_{obs} and half-times $t_{1/2}$ of GA degradation mediated by selected cyclodextrin and glucose derivatives^a

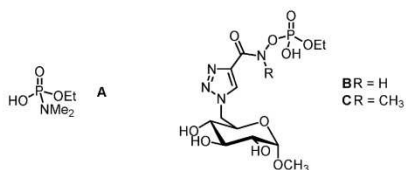
	$k_{\text{obs}} \times 10^2/\text{min}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{min}$
Spontaneous hydrolysis	1.15 ± 0.04	60.3 ± 0.2
$\beta^6\mathbf{1}$	8.04 ± 0.11	8.6 ± 0.1
$\beta^2\mathbf{1}$	6.28 ± 0.14	11.0 ± 0.3
$\beta^3\mathbf{1}$	6.62 ± 0.30	10.5 ± 0.5
$\beta^6\mathbf{1}_2$	13.55 ± 0.33	5.1 ± 0.1
$\beta^6\mathbf{1}_7$	22.76 ± 1.08	3.0 ± 0.1
$\alpha^6\mathbf{1}_6$	17.88 ± 0.34	3.9 ± 0.1
$\gamma^6\mathbf{1}_8$	16.05 ± 1.06	4.3 ± 0.3
$\beta^6\mathbf{5}$	5.63 ± 0.04	12.3 ± 0.1
$\beta^6\mathbf{5}_7$	9.06 ± 0.29	7.6 ± 0.3
$\mathbf{G}^6\mathbf{1}$	8.03 ± 0.13	8.6 ± 0.1
$\mathbf{G}^6\mathbf{5}$	8.10 ± 0.25	8.6 ± 0.3

^a In aqueous TRIS-HCl buffer at pH 7.40 and 37.0 °C, $c(\text{GA}) = 1.0 \mu\text{M}$, $c(\text{scavenger}) = 500 \mu\text{M}$.

equimolar amount of $\beta^6\mathbf{1}_2$. Raising the number of substituents on the ring even further causes an additional improvement in activity although the extent to which the activity of $\beta^6\mathbf{1}_7$ increases does not correlate linearly with the number of substituents. Since an approximate seven-fold increase in reaction rate was observed when the concentration of the glucose derivative $\mathbf{G}^6\mathbf{1}$ was increased from 500 μM to 3500 μM in the assay (see ESI†) it seems that not all of the seven substituents in $\beta^6\mathbf{1}_7$ are able to participate in GA degradation. Interestingly, the α - and γ -cyclodextrin derivatives $\alpha^6\mathbf{1}_6$ and $\gamma^6\mathbf{1}_8$ are somewhat less active than $\beta^6\mathbf{1}_7$ although the number of nucleophilic centres is even higher in the case of $\gamma^6\mathbf{1}_8$. The substituents are therefore presumably better arranged for reaction with GA in $\beta^6\mathbf{1}_7$ than in the larger or smaller cyclodextrin analogues. While the *N*-methylated glucose derivative $\mathbf{G}^6\mathbf{5}$ is as active as $\mathbf{G}^6\mathbf{1}$, the corresponding cyclodextrin derivatives $\beta^6\mathbf{5}$ and $\beta^6\mathbf{5}_7$ are less active than the non-methylated analogues.

GA degradation mediated by $\beta^6\mathbf{1}_7$ was additionally followed by using a GC-MS assay, which provided information about the enantioselectivity of the reaction.¹³ This experiment yielded further evidence that interactions between the cyclodextrin ring and GA play no large role in the mode of action of $\beta^6\mathbf{1}_7$ because the two enantiomers of GA decompose with practically the same rate as observed for oxime-containing cyclodextrins.¹⁰ The half time of 2.0 ± 0.1 min obtained in the GC-MS assay for the $\beta^6\mathbf{1}_7$ -mediated GA degradation is in reasonable agreement with the result of the enzymatic assay.

Repeated treatment of $\beta^6\mathbf{1}$ or $\beta^6\mathbf{5}$ with an excess of GA revealed that both hydroxamic acids lose activity after the first round of reaction.¹⁰ To obtain information about the nature of the products formed we followed GA degradation in TRIS-HCl buffer in the absence and presence of $\mathbf{G}^6\mathbf{1}$ and $\mathbf{G}^6\mathbf{5}$ using ³¹P NMR spectroscopy and mass spectrometry. These measurements showed that spontaneous hydrolysis of GA in TRIS-HCl buffer practically exclusively yields hydroxytabun A. When 2 equiv. of $\mathbf{G}^6\mathbf{1}$ are present the OP not only disappears significantly more rapidly, no unreacted GA could be detected in the first NMR spectrum recorded ca. 30 min after sample preparation, but also the outcome of the reaction is different. Under these conditions, formation of a single product was observed, which represents phosphate diester B according to mass spectrometry lacking the CN and the NMe₂ group of GA. This product is expected to be relatively resistant towards further hydrolysis because of its anionic nature at physiological pH. Thus, reaction between $\mathbf{G}^6\mathbf{1}$ and GA results in irreversible covalent modification of the hydroxamic acid explaining why one scavenger molecule can induce degradation of only a single molecule of GA.



The course of the reaction between $\mathbf{G}^6\mathbf{5}$ and GA is somewhat more complex as it involves several transitional species (see ESI†). Although not all aspects of the underlying transformations have been fully elucidated yet our results indicate that diester C with a

structure analogous to B is most likely the stable end product in this reaction.

In conclusion, we have shown that appending hydroxamic acid-derived substituents to cyclodextrin or glucose units affords potent scavengers for GA. Cyclodextrins with one hydroxamic acid residue do not possess higher activity than corresponding glucose derivatives, presumably because the cyclodextrin ring does not cooperatively contribute to the mode of action. Cyclodextrins represent, however, valuable scaffolds allowing introduction of several hydroxamic acid units. This strategy allows improvement of degradation efficiency while keeping the scavenger concentration constant. The results also indicate that our hydroxamic acids are irreversibly modified when reacting with GA with the course of the reaction depending on the actual nature of the acid. Work to elucidate the underlying mechanisms is ongoing to obtain information on how to improve the activity of these promising scavengers even further.

This research was supported by a contract of the German Armed Forces (E/UR3G/9G127/9A803). The generous funding is gratefully acknowledged. We also thank Wacker Chemie AG, Burghausen, Germany, for a gift of unsubstituted cyclodextrins.

Notes and references

† Note that the substituent is located in a mannose unit in $\beta^2\mathbf{1}$ and in an altrose unit in $\beta^3\mathbf{1}$. The presence of subunits in these compounds differing from glucose is due to the synthetic approach used for preparation.

- K. Tuovinen, *Toxicology*, 2004, **196**, 31–39; T. C. Marrs, *Pharmacol. Ther.*, 1993, **58**, 51–66; T. C. Marrs, R. L. Maynard and F. R. Sidell, *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*, John Wiley & Sons, Chichester, 2007.
- F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz and P. Eyer, *Biochem. Pharmacol.*, 2004, **68**, 2237–2248.
- J. A. Vale, P. Rice and T. C. Marrs, in *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*, ed. T. C. Marrs, R. L. Maynard and F. R. Sidell, John Wiley & Sons, Chichester, 2007, pp. 249–260.
- D. E. Lenz, D. Yeung, J. R. Smith, R. E. Sweeney, L. A. Lumley and D. M. Cerasoli, *Toxicology*, 2007, **233**, 31–39; P. Masson, F. Nachon, C. A. Broomfield, D. E. Lenz, L. Verdier, L. M. Schopfer and O. Lockridge, *Chem.-Biol. Interact.*, 2008, **175**, 273–280.
- H. Morales-Rojas and R. A. Moss, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 2497–2522; B. M. Smith, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 470–478.
- L. Marinescu and M. Bols, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2009, **21**, 309–323; R. Breslow and S. D. Dong, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1997–2011.
- N. Masurier, F. Estour, M. T. Froment, B. Lefèvre, J.-C. Debouzy, B. Brasme, P. Masson and O. Lafont, *Eur. J. Med. Chem.*, 2005, **40**, 615–623; S. Müller, M. Koller, R. Le Provost, O. Lafont, F. Estour, T. Wille, H. Thiermann, F. Worek and G. Reiter, *Toxicol. Lett.*, 2011, **200**, 53–58; R. Le Provost, T. Wille, L. Louise, N. Masurier, S. Müller, G. Reiter, P.-Y. Renard, O. Lafont, F. Worek and F. Estour, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 3026–3032.
- T. Wille, O. Tenberken, G. Reiter, S. Müller, R. Le Provost, O. Lafont, F. Estour, H. Thiermann and F. Worek, *Toxicology*, 2009, **265**, 96–100.
- M. Zengerle, F. Brandhuber, C. Schneider, F. Worek, G. Reiter and S. Kubik, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2011, **7**, 1543–1554.
- F. Brandhuber, M. Zengerle, L. Porwol, O. Tenberken, H. Thiermann, F. Worek, S. Kubik and G. Reiter, *Toxicology*, 2012, **302**, 163–171.
- B. E. Hackley Jr, R. Plapinger, M. Stolberg and T. Wagner-Jauregg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 3651–3653; R. Swidler and G. M. Steinberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 3594–3598; L. Louise-Leriche, E. Păunescu, G. Saint-André, R. Baati, A. Romieu, A. Wagner and P.-Y. Renard, *Chem.-Eur. J.*, 2010, **16**, 3510–3523.
- T. Wille, H. Thiermann and F. Worek, *Toxicol. In Vitro*, 2010, **24**, 1026–1031.
- O. Tenberken, J. Mikler, I. Hill, K. Weatherby, H. Thiermann, F. Worek and G. Reiter, *Toxicol. Lett.*, 2010, **198**, 177–181; O. Tenberken, F. Worek, H. Thiermann and G. Reiter, *J. Chromatogr., B*, 2010, **878**, 1290–1296.

Chem. Commun.

Tabun scavengers based on hydroxamic acid containing cyclodextrins

Florian Brandhuber,^a Michael Zengerle,^b Luzian Porwol,^b Anne Bierwisch,^a Marianne Koller,^a

Georg Reiter,^a Franz Worek,^a Stefan Kubik*^b

^a *Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, Neuherbergstraße 11, D-80937*

München, Germany

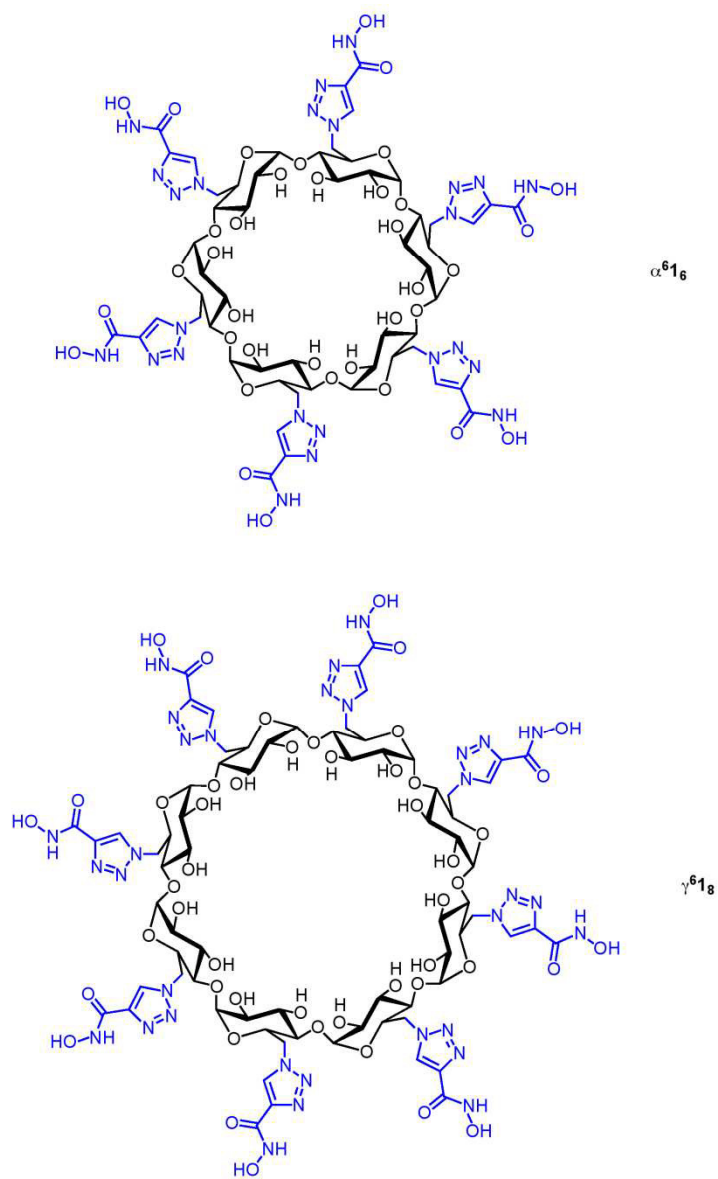
^b *Fachbereich Chemie - Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße, D-67663 Kaiserslautern, Germany, Fax: +49-631-205-3921, Email:*

kubik@chemie.uni-kl.de

CONTENT

1. Structures.....	S2
2. Syntheses.....	S3
3. Enzymatic Assays.....	S10
4. GC-MS Assay.....	S20
5. NMR Assay.....	S23
6. References.....	S33

1. Structures

Figure S1: Structures of α - and γ -cyclodextrin derivatives α^61_6 and γ^61_8 .

2. Syntheses

General details. Products were characterized as follows: melting points, Müller SPM-X 300; NMR, Bruker Avance 600, Bruker DPX 400; MALDI-TOF-MS, Bruker Ultraflex TOF/TOF; ESI-MS, Bruker Esquire 3000; elemental analysis, Elementar vario Micro cube. All chemicals, unless other stated, are commercially available and used without further purification. For the preparative HPLC the following conditions were used: HPLC, Dionex UltiMate 3000; column, Thermo Fisher, BetaBasic-18, 250 × 21.2 mm, 5 µm particle size; flow, 12 mL/min; eluent, aqueous: 0.025 % aqueous ammonia, organic: acetonitrile; the following gradient was used for the isolation of the products: 0-6 min, 0 % organic; 6-22 min, linear increase to 15 % organic; 22-25 min, linear increase to 50 % organic; 25-30 min, 50 % organic; 30-37 min, linear decrease to 0 % organic; 37-45 min, 0 % organic.

General procedure for the syntheses of the hydroxamic acids. The respective carboxylic acid (350 mg) and the (substituted) hydroxylamine (1.1 equiv) were dissolved in dichloromethane (10 ml). A solution of DCC (1.1 equiv) in dichloromethane (10 ml) was added dropwise to the reaction mixture at 0 °C. The solution was allowed to warm to room temperature, and stirring was continued for 3 h. Afterwards, the precipitate was filtered off and the filtrate was evaporated to dryness. Purification of the products was achieved chromatographically on SiO₂ by using hexane/ethyl acetate mixtures.

***N*-Hydroxypent-4-ynamide.** Prepared from pentynoic acid and O-THP-protected hydroxylamine.¹ For the chromatographic purification hexane/ethyl acetate, 1:1 (v/v) was used. Yield 475 mg (89 %); R_f = 0.18 (hexane/ethyl acetate, 1:1 (v/v)); m.p. 97-98 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.59-1.80 (m, 8 H), 1.81 (s, 1 H), 2.35 (s, 2 H), 2.54-2.56 (m, 2 H), 4.96 (m, 1 H), 8.51 (s, 1 H); ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.9, 18.7, 25.1, 28.1, 29.8, 32.6, 62.7, 69.9, 102.8, 168.7; elemental analysis calcd (%) for C₁₀H₁₅NO₃: C 60.90, H 7.67, N 7.10; found C 60.90, H 7.43, N 7.16.

For deprotection the product was dissolved in methanol. After addition of *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (20 mg) the reaction mixture was stirred for 18 h at 25 °C. After removal of the solvent, the residue was purified chromatographically on silica by using hexane/ethyl acetate, 1:3 (v/v) as eluent. Yield 188 mg (69 %); R_f = 0.30 (hexane/ethyl acetate, 1:3 (v/v)); m.p. 96-97 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.57 (s, 1 H), 2.42 (t, 2 H, *J*(H,H) = 6.9 Hz), 2.55-2.59 (m, 2 H), 7.35 (s, 1 H), 8.32 (s, 1 H); ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.1, 31.3, 71.5, 83.5, 167.2;

elemental analysis calcd (%) for C₅H₇NO₂: C 53.09, H 6.24, N 12.38; found C 53.18, H 6.53, N 12.35.

***N*-Methoxypropiolamide.** Prepared from propiolic acid, methoxyammoniumchloride and *N*-ethyl-diisopropylamine (1.1 equiv). For the chromatographic purification hexane/ethyl acetate, 1:1 (v/v) was used. The compound could not be obtained analytically pure. Yield 402 mg (46 %); R_f = 0.43 (hexane/ethyl acetate, 1:1 (v/v)); m.p. 75-76 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 3.60 (s, 3 H), 4.29 (s, 1 H), 11.87 (s, 1 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 63.4, 75.6, 78.2, 149.0; ESI-MS (negative mode), *m/z* (%) 97.9 (100 %, M-H⁺).

***N*-(Benzyloxy)-*N*-methylpropiolamide.** Prepared from propiolic acid and *N*-methyl-*O*-benzylhydroxylamine.² For the chromatographic purification hexane/ethyl acetate, 4:1 (v/v) was used. The product was obtained as an oil. Yield 766 mg (81 %); R_f = 0.15 (hexane/ethyl acetate, 4:1 (v/v)); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 3.17-3.19 (m, 4 H), 4.95 (s, 2 H), 7.37-7.44 (m, 5 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 33.9, 75.5, 77.6, 79.2, 128.7, 129.1, 129.5, 134.1, 153.8; ESI-MS (positive mode), *m/z* (%) 211.8 (100 %, M+Na⁺); elemental analysis calcd (%) for C₁₁H₁₁NO₂: C 69.83, H 5.86, N 7.40; found C 69.44, H 5.86, N 7.47.

General procedure for the copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. The respective azide (300 mg) was dissolved in an appropriate solvent mixture (10 ml) under an atmosphere of nitrogen. Copper(II)sulfate pentahydrate (0.01 equiv per azide group), sodium ascorbate (0.04 equiv per azide group), TBTA (0.01 equiv per azide group), and the alkyne (1.20 equiv per azide group) were added successively and the resulting mixture was stirred at 25 °C for 1 to 3 days. After conversion was complete, the reaction mixture was poured into acetone. The precipitate was filtered off and washed with acetone. Separation and purification of the product was achieved by preparative HPLC.

6-(4-(Hydroxycarbonyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy-β-cyclodextrin (β⁶1). Prepared from mono-6-azido-6-deoxy-β-cyclodextrin³ and *N*-hydroxypropiolamide⁴ in ethanol/water, 1:1 (v/v). The reaction went to completion after 18 h. Yield: 147 mg (46 %); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.83-2.86 (m, 1 H), 3.06-3.09 (m, 1 H), 3.33-3.45 (s, 16 H, beneath H₂O signal), 3.56-3.77 (m, 22 H), 4.03-4.07 (m, 1 H), 4.51-4.63 (m, 6 H), 4.77-5.03 (m, 8 H), 5.75 (s, br, 14 H), 8.41 (s, 1 H), 9.06 (s, br, 1 H), 11.19 (s, br, 1 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 50.6, 58.7-60.2, 69.8-73.2, 80.8-83.4, 101.2-102.2, 126.2, 141.7, 157.9; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1251.5 (59 %, M-O+Na⁺),

1267.6 (100 %, M+Na⁺); elemental analysis calcd (%) for C₄₅H₇₂N₄O₃₆·6 H₂O·C₃H₆O: C 40.85, H 6.43, N 3.97; found C 40.66, H 6.69, N 4.22.

2-(4-(Hydroxycarbamoyl)-1*H*-1,2,3-triazole-1-yl)-2-deoxy-*manno*-β-cyclodextrin (β²1).

Prepared from 2-azido-2-deoxy-*manno*-β-cyclodextrin⁵ and *N*-hydroxypropylamide⁴ in ethanol/water, 1:1 (v/v). The reaction went to completion after 3 d. Yield: 135 mg (39 %): ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ 3.42-3.45 (m, 1 H), 3.51-3.73 (m, 11 H), 3.82-4.02 (m, 26 H), 4.24 (m, 1 H), 4.41-4.46 (m, 2 H), 4.79 (s, 1 H), 5.00-5.04 (m, 3 H), 5.09-5.13 (m, 3 H), 5.18-5.22 (m, 1 H), 8.62 (s, 1 H); ¹³C NMR (D₂O, 101 MHz) δ 59.5-60.4, 62.3, 68.4, 70.9-73.2, 76.3, 77.6, 79.6-81.0, 100.4-101.7, 103.2, 127.5, 140.1, 159.4; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1251.6 (100%, M-O+Na⁺), 1267.6 (9%, M+Na⁺); elemental analysis calcd (%) for C₄₅H₇₂N₄O₃₆·4 H₂O·C₃H₆O: C, 41.92; H, 6.30; N, 4.07 found C, 41.67; H, 6.04; N, 3.92.

3-(4-(Hydroxycarbamoyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-3-deoxy-*altro*-β-cyclodextrin (β³1). Prepared from 3-azido-3-deoxy-*altro*-β-cyclodextrin⁶ and *N*-hydroxypropylamide⁴ in ethanol/water, 1:1 (v/v). The reaction went to completion after 3 d. Yield: 180 mg, (56 %): ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ 3.44-3.48 (m, 1 H), 3.53-3.75 (m, 11 H), 3.81-4.04 (m, 26 H), 4.27 (m, 1 H), 4.44-4.48 (m, 2 H), 4.79 (s, 1H), 5.02-5.06 (m, 3 H), 5.11-5.15 (m, 3 H), 5.22-5.25 (m, 1 H), 8.68 (s, 1 H); ¹³C NMR (D₂O, 101 MHz) δ 59.5, 60.3-60.4, 62.3, 68.4, 70.9-73.2, 76.3, 77.6, 79.6-81.0, 100.4-101.8, 103.2, 127.8, 139.8, 159.7; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1251.6 (100%, M-O+Na⁺), 1267.6 (8%, M+Na⁺); elemental analysis calcd (%) for C₄₅H₇₂N₄O₃₆·4 H₂O·C₃H₆O: C, 41.92; H, 6.30; N, 4.07 found C, 41.65; H, 6.25; N, 3.97.

Bis-6^A,6^D-(4-(hydroxycarbamoyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6^A,6^D-dideoxy-β-cyclodextrin (β⁶1₂).

Prepared from 6^A,6^D-diazido-6^A,6^D-dideoxy-β-cyclodextrin⁷ and *N*-hydroxypropylamide⁴ in ethanol/water, 1:1 (v/v). The reaction went to completion after 3 d. Yield 64.5 mg (19 %); ¹H NMR (D₂O, 600 MHz) δ 2.85-2.92 (m, 2 H), 3.11-3.16 (m, 2 H), 3.45-3.76 (m, 19 H), 3.85-4.09 (m, 15 H), 4.27-4.40 (m, 2 H), 4.96-5.24 (m, 7 H), 5.23 (d, 2 H, *J*(H,H) = 3.5 Hz), 8.45-8.47 (2 × s, 2 H); ¹³C NMR (D₂O, 151 MHz) δ 51.4-51.6, 59.0-60.6, 69.8-73.0, 80.1-82.6, 100.7-102.0, 127.8-128.0, 139.9-140.0, 159.3; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1345.7 (38 %, M-2O+Na⁺), 1361.7 (100 %, M-O+Na⁺), 1377.7 (97 %, M+Na⁺), 1393.7 (35 %, M+K⁺); elemental analysis calcd (%) for C₄₈H₇₄N₈O₃₇·8 H₂O·C₃H₆O: C 39.33, H 6.21, N 7.20; found C 39.57, H 6.49, N 7.17.

Heptakis-6-(4-(hydroxycarbamoyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6-heptadesoxy-β-cyclodextrin (β⁶1₇).

Prepared from heptakis-6-azido-6-heptadesoxy- β -cyclodextrin⁸ and *N*-hydroxypropiolamide⁴ in DMSO/water, 4:1 (v/v). The reaction went to completion after 3 d. Purification of the product did not require HPLC, but was achieved by recrystallization from ethanol/aqueous ammonia. Yield 293 mg (67 %); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 3.23-3.70 (m, 21 H), 4.10 (s, 7 H), 4.54 (s, 14 H), 5.10 (s, 7 H), 5.88 (s, 14 H), 8.39 (s, 7 H), 9.00 (s, 7 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 49.6, 69.1-69.4, 71.6-71.9, 72.5-72.7, 82.1-82.4, 101.3-102.0, 127.8, 141.2, 157.7; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1874.4 (11 %, M-2O+H⁺), 1890.4 (46 %, M-O+H⁺), 1896.4 (46 %, M-2O+Na⁺), 1906.4 (59 %, M+H⁺), 1912.4 (46 %, M-O+Na⁺), 1928.5 (100 %, M+Na⁺); elemental analysis calcd (%) for C₆₃H₈₄N₂₈O₄₂·7 H₂O·2 C₂H₆O: C 37.89, H 5.22, N 18.47; found C 37.81, H 5.20, N 18.52.

Hexakis-6-(4-(hydroxycarbonyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6-hexadesoxy- α -cyclodextrin (α^6 1₆).
Prepared from hexakis-6-azido-6-hexadesoxy- α -cyclodextrin⁹ and *N*-hydroxypropiolamide⁴ in DMSO/water, 4:1 (v/v). The reaction went to completion after 4 d. Purification of the product did not require HPLC, but was achieved by recrystallization from ethanol/aqueous ammonia. Yield 328 mg (75 %); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 3.18-3.23 (m, 12 H), 3.82-3.86 (m, 6 H), 4.23-4.25 (m, 6 H), 4.56-4.65 (m, 12 H), 5.07 (s, 6 H), 5.49-5.59 (m, 12 H), 8.39 (s, 6 H), 9.08 (s, 6 H), 11.10 (s, 6 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 49.8, 69.4, 71.2, 72.5, 82.7, 101.5, 127.6, 141.2, 157.7; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1601.8 (81 %, M-2O+H⁺), 1617.8 (100 %, M-O+H⁺), 1623.8 (22 %, M-2O+Na⁺), 1633.8 (41 %, M+H⁺), 1639.8 (35 %, M-2O+K⁺), 1655.8 (37 %, M+Na⁺), 1671.9 (32 %, M+K⁺); elemental analysis calcd (%) for C₅₄H₇₂N₂₄O₃₆·7 H₂O·0.5 C₂H₆O: C 37.06, H 5.03, N 18.86; found C 37.19, H 5.09, N 18.72.

Octakis-6-(4-(hydroxycarbonyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6-octadesoxy- γ -cyclodextrin (γ^6 1₈).
Prepared from octakis-6-azido-6-octadesoxy- γ -cyclodextrin⁹ and *N*-hydroxypropiolamide⁴ in DMSO/water, 4:1 (v/v). The reaction went to completion after 4 d. Purification of the product did not require HPLC, but was achieved by recrystallization from ethanol/aqueous ammonia. Yield 293 mg (67 %); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 3.19-3.24 (m, 16 H), 3.65-3.70 (m, 8 H), 4.10-4.12 (m, 8 H), 4.44-4.55 (m, 16 H), 5.15 (s, 8 H), 5.91 (m, 16 H), 8.40 (s, 8 H), 9.18 (s, 8 H), 11.00 (s, 8 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 49.6, 69.2, 72.0, 72.4, 81.8, 101.5, 127.7, 141.1, 157.7; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 2167.7 (100 %, M-2O+Na⁺), 2183.7 (100 %, M-O+Na⁺), 2200.0 (42 %, M+Na⁺); elemental analysis calcd (%) for C₇₂H₉₆N₃₂O₄₈·5 H₂O·C₃H₆O: C 38.73, H 4.85, N 19.27; found C 38.89, H 4.86, N 18.99.

6-(4-(2-(Hydroxycarbamoyl)-ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (β^62).

Prepared from 6-azido-6-deoxy- β -cyclodextrin³ and *N*-hydroxypent-4-ynamide in ethanol/water, 1:1 (v/v). The reaction went to completion after 18 h. Yield 90.0 mg (27 %); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.31 (t, 2 H, *J*(H,H) = 7.7 Hz), 2.82 (t, 2 H, *J*(H,H) = 7.5 Hz), 3.31-3.38 (m, 21 H), 3.55-3.68 (m, 21 H), 4.48-4.56 (m, 6 H), 4.83 (s, 7 H), 5.65-5.88 (m, 14 H), 7.76 (s, 1 H), 8.74 (s, 1 H), 10.45 (s, 1 H); ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.2, 31.7, 50.4, 58.8, 70.0-73.2, 80.8-83.5, 101.2-102.2, 122.8, 145.6, 168.3; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1273.5 (2 %, M+H⁺), 1280.6 (61 %, M-O+Na⁺), 1295.7 (100 %, M+Na⁺), 1311.7 (20 %, M+K⁺); elemental analysis calcd (%) for C₄₇H₇₆N₄O₃₆·3 H₂O: C 42.53, H 6.23, N 4.22; found C 42.47, H 6.32, N 4.44.

6-(4-(*N*-Methyl-methoxycarbamoyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (β^63).

Prepared from 6-azido-6-deoxy- β -cyclodextrin³ and *N*-methoxy-*N*-methylpropiolamide¹⁰ in ethanol/water, 1:1 (v/v). The reaction went to completion after 18 h. Yield 78 mg (24 %); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.83-2.87 (m, 1 H), 3.04-3.06 (m, 1 H), 3.24-3.42 (m, 15 H), 3.49-3.82 (m, 29 H), 4.08-4.13 (m, 1 H), 4.29-4.32 (m, 1 H), 4.49-4.67 (m, 6 H), 4.75-5.03 (m, 7 H), 5.64-5.91 (m, 14 H), 8.54 (s, 1 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 32.7, 50.6, 58.8-60.3, 61.3, 69.8-73.3, 80.6-83.6, 101.2-102.3, 129.0, 139.8, 160.4; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1265.8 (14 %, M-OMe+H⁺), 1295.8 (100 %, M+Na⁺), 1311.8 (23 %, M+K⁺); elemental analysis calcd (%) for C₄₇H₇₆N₄O₃₆·H₂O·0.5 C₃H₆O: C 44.13, H 6.18, N 4.24; found C 44.09, H 5.98, N 4.05.

6-(4-(Methoxycarbamoyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (β^64). Prepared from 6-azido-6-deoxy- β -cyclodextrin³ and *N*-methoxypropiolamide in ethanol/water, 1:1 (v/v). The reaction went to completion after 18 h. Yield 74 mg (23 %); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.80 (d, 1 H, *J*(H,H) = 10.6 Hz), 3.04 (d, 1 H, *J*(H,H) = 11.2 Hz), 3.30-3.41 (m, 12 H), 3.55-3.67 (m, 29 H), 4.07 (t, 1 H, *J*(H,H) = 9.8 Hz), 4.38 (s, 1 H), 4.50-4.65 (m, 6 H), 4.73-5.02 (m, 7 H), 5.62-5.95 (m, 14 H), 8.56 (s, 1 H), 11.91 (s, 1 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 50.7, 58.7-60.4, 63.3, 69.9-73.3, 80.7-83.5, 101.1-102.3, 127.2, 141.1, 157.5; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1251.5 (42 %, M-OMe+H⁺), 1267.4 (5 %, M-Me+H⁺), 1281.5 (100 %, M+Na⁺), 1297.5 (15 %, M+K⁺); elemental analysis calcd (%) for C₄₆H₇₄N₄O₃₆·H₂O: C 43.26, H 6.00, N 4.39; found C 43.02, H 5.99, N 4.17.

6-(4-(*N*-Methyl-hydroxycarbamoyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (β^65).

Prepared from 6-azido-6-deoxy- β -cyclodextrin³ and *N*-(benzyloxy)-*N*-methylpropiolamide in ethanol/water, 1:1 (v/v). The reaction went to completion after 18 h. The crude product was

dissolved in methanol/water, 1:2 (v/v) (15 mL). Palladium on charcoal (40 mg) was added and the reaction mixture was stirred for 18 h at 25 °C under an atmosphere of hydrogen. After filtration through Celite purification was achieved by HPLC as described above. Yield 105 mg (32 %); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.87-2.89 (m, 1 H), 3.07-3.10 (m, 1 H), 3.30-3.38 (m, 15 H), 3.55-3.66 (m, 26 H), 3.76-3.79 (m, 1 H), 4.05-4.09 (m, 1 H), 4.50-4.68 (m, 6 H), 4.75-5.04 (m, 7 H), 5.66-5.93 (m, 14 H), 8.49 (s, 1 H), 10.09 (s, 1 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 36.5, 50.4, 58.9-60.3, 69.8-73.3, 80.8-83.5, 101.2-102.3, 128.7, 139.9, 160.4; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1259.6 (1 %, M+H⁺), 1265.7 (15 %, M-O+H⁺), 1281.7 (100 %, M+Na⁺), 1297.7 (11 %, M+K⁺); elemental analysis calcd (%) for C₄₆H₇₄N₄O₃₆·2 H₂O: C 42.66, H 6.07, N 4.33; found C 42.70, H 6.15, N 4.26.

Bis-6^A,6^D-(4-(*N*-methylhydroxycarbamoyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6^A,6^D-dideoxy-β-cyclodextrin (β⁶5₂). Prepared from 6^A,6^D-diazido-6^A,6^D-dideoxy-β-cyclodextrin⁷ and *N*-(benzyloxy)-*N*-methylpropiolamide in ethanol/water, 1:1 (v/v). The reaction went to completion after 2 d. The crude product was dissolved in methanol/water, 1:2 (v/v) (15 mL). Palladium on charcoal (40 mg) was added and the reaction mixture was stirred for 18 h at 25 °C under an atmosphere of hydrogen. After filtration through Celite purification was achieved by HPLC as described above. Yield 57.3 mg (16 %); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 2.98-3.39 (m, 20 H), 3.54-3.76 (m, 24 H), 4.02-4.07 (m, 2 H), 4.49 (s, 2 H), 4.50-4.68 (m, 5 H), 4.70-5.05 (m, 7 H), 5.70-5.93 (m, 14 H), 8.46 (s, 2 H), 10.22 (s, 2 H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz) δ 36.4, 50.2, 59.1-60.3, 69.7-73.3, 80.9-83.3, 101.4-102.3, 129.0, 139.7, 160.3; MALDI-TOF MS, *m/z* (%) 1373.7 (14 %, M-O-Me+Na⁺), 1389.8 (100%, M-O+Na⁺), 1405.8 (79 %, M+Na⁺); elemental analysis calcd (%) for C₅₀H₇₈N₈O₃₇·3 H₂O·C₃H₆O: C 42.57, H 6.07, N 7.49; found C 42.41, H 5.99, N 7.20.

Heptakis-6-(4-(*N*-Methylhydroxycarbamoyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6-heptadesoxy-β-cyclodextrin (β⁶5₇). Prepared from heptakis-6-azido-6-heptadesoxy-β-cyclodextrin⁸ and *N*-(benzyloxy)-*N*-methylpropiolamide in DMSO/water, 4:1 (v/v). The reaction went to completion after 4 d. The crude product was dissolved in methanol/water, 1:2 (v/v) (20 mL). Palladium on charcoal (40 mg) was added and the reaction mixture was stirred for 3 d at 25 °C under an atmosphere of hydrogen. After filtration through Celite the product was precipitated by pouring the filtrate into acetone. After drying it turned out to be analytically pure. Yield 223 mg (49 %); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 3.17-3.26 (m, 35 H), 3.69-3.74 (m, 7 H), 4.11-4.13 (m, 7 H), 4.42-4.53 (m, 14 H), 5.01 (m, 7 H), 5.90-6.02 (m, 14 H), 8.34 (s, 7 H), 10.29 (s, 7 H); ¹³C NMR (DMSO-

d_6 , 101 MHz) δ 36.3, 49.5, 69.5, 71.7, 72.4, 82.4, 101.6, 129.4, 139.5, 159.9; MALDI-TOF MS, m/z (%) 1994.0 (28 %, M–O–Me+Na⁺), 2010.1 (96 %, M–O+Na⁺), 2026.1 (100 %, M+Na⁺); elemental analysis calcd (%) for C₇₀H₉₈N₂₈O₄₂·5 H₂O·C₃H₆O: C 41.31, H 5.47, N 17.75; found C 41.54, H 5.48, N 17.56.

6-(4-(Hydroxycarbamoyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranose

(**G⁶¹**). Prepared from 6-azido-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranose¹¹ and *N*-

hydroxypropiolamide⁴ in ethanol/water, 1:1 (v/v). The reaction went to completion after 18 h.

Yield: 182 mg (44 %); ¹H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 2.95-3.02 (m, 4 H), 3.18-3.19 (m, 1 H), 3.37-3.41 (m, 1 H), 3.69-3.73 (m, 1 H), 4.43-4.50 (m, 2 H), 4.73-4.77 (m, 1 H), 4.85 (s, 1 H), 4.98 (s, 1 H), 5.41 (s, 1 H), 8.42 (s, 1 H), 9.24 (br, 1 H), 10.95 (s, 1 H); ¹³C NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ 51.1, 54.2, 70.2, 71.6, 71.7, 73.1, 99.8, 127.1, 141.0, 157.7; MALDI-TOF MS, m/z (%) 289.0 (5 %, M–O+H⁺), 305.0 (39 %, M+H⁺), 311.0 (40 %, M–O+Na⁺), 327.0 (M+Na⁺); elemental analysis calcd (%) for C₁₀H₁₆N₄O₇: C 39.48, H 5.30, N 18.41; found C 39.15, H 5.33, N 18.21.

6-(4-(*N*-Methylhydroxycarbamoyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-

glucopyranose (G⁶⁵). Prepared from 6-azido-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranose¹¹ and *N*-

(benzyloxy)-*N*-methylpropiolamide in ethanol/water, 1:1 (v/v). The reaction went to completion after 18 h. Afterwards, the solvent was evaporated and the residue was dissolved in methanol/water, 1:2 (v/v) (15 mL). Palladium on charcoal (40 mg) was added and the reaction mixture was stirred for 18 h at 25 °C under an atmosphere of hydrogen. After filtration through Celite purification was achieved chromatographically on silica by using methanol/dichloromethane, 1:5 as eluent. Yield 137 mg (47 %); R_f = 0.17 (methanol/ dichloromethane 1:5 (v/v)); ¹H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 2.96-3.02 (m, 4 H), 3.17 (s, 1 H), 3.20 (s, 3 H), 3.38-3.42 (m, 1 H), 3.70-3.73 (m, 1 H), 4.46-4.50 (m, 2 H), 4.74-4.76 (m, 1 H), 4.85 (d, 1 H, J (H,H) = 6.3 Hz), 4.98 (d, 1 H, J (H,H) = 4.6 Hz), 5.40 (d, 1 H, J (H,H) = 5.6 Hz), 8.40 (s, 1 H), 10.30 (s, 1 H); ¹³C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz) δ 36.4, 50.9, 54.3, 70.2, 71.7, 71.7, 73.1, 99.8, 128.8, 139.4, 160.3; MALDI-TOF MS, m/z (%) 303.0 (9 %, M–O+H⁺), 319.0 (31 %, M+H⁺), 325.0 (25 %, M–O+Na⁺), 341.0 (100 %, M+Na⁺); elemental analysis calcd (%) for C₁₁H₁₈N₄O₇·0.5 H₂O: C 40.37, H 5.85, N 17.12; found C 40.10, H 5.67, N 17.00.

3. Enzymatic Assays

Materials. Acetylthiocholine iodide (ATCh), 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), and tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Disodium hydrogenphosphate dihydrate, potassium dihydrogenphosphate, and hydrochloric acid were purchased from Roth (Karlsruhe, Germany). Chloroform (SupraSolve) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany), ammonia (6.0) from Linde (Munich, Germany), and helium (6.0) from Air Liquide Germany (Munich, Germany). Ethyl dimethylphosphoramido-cyanidate (tabun; GA; >98% by ^1H NMR and ^{31}P NMR) and the internal standard (IS) propyl dimethylphosphoramidocyanidate (>97% by ^1H NMR and ^{31}P NMR) were made available by the German Ministry of Defence (all experiments with GA were performed at the Bundeswehr Institute for Pharmacology and Toxicology in Munich). Hemoglobin-free human erythrocyte ghosts served as human AChE (hAChE) source and were prepared according to Dodge et al.¹² with minor modifications.¹³ AChE activity was adjusted to 4000 U/L by dilution with sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.40). Aliquots of ghosts were stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Prior to use, ghosts were homogenized with a Sonoplus HD 2070 ultrasonic homogenator (Bandelin electronic, Berlin, Germany) twice for 5 s with a 20 s interval to achieve a homogeneous matrix.

Qualitative Enzymatic Assay. This assay was performed by using a Tecan Freedom Evo liquid handling system (Männedorf, Switzerland) analogously to the previously reported procedure.¹⁴ Specifically, solutions of cyclodextrin (40 μL , 2 mM, 0.1 M TRIS-HCl buffer) and GA (40 μL , 36 μM , 0.1 M TRIS-HCl buffer) were added to TRIS-HCl buffer (80 μL , 0.1 M, pH 7.40) and incubated at $37.0\text{ }^\circ\text{C}$. Immediately after mixing, a sample (25 μL) was transferred to a 24-well microplate filled with pre-heated buffer (2.40 mL, 0.1 M TRIS-HCl, pH 7.40 and 0.3 mM DTNB at $37.0\text{ }^\circ\text{C}$) and hAChE (10 μL). After the addition of ATCh (50 μL , 49.7 mM) the microplate was transferred to a photometer and maintained at $37.0\text{ }^\circ\text{C}$. AChE activity was determined by a modified Ellman assay¹⁵⁻¹⁷ by following the change in absorption at 436 nm for 30 min to determine the rate of the formation of the 2-nitro-5-thiobenzoate dianion (Ellman assay). Further aliquots of the incubation mixture were taken after 30 min and 60 min and treated analogously.

First order inhibition rate constants k_1 were determined by non-linear regression analysis of the obtained curves by using Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).¹⁸ Rate constants k_1^{ref} were determined by performing the assay in the absence of cyclodextrin. Finally, an

independent experiment performed in the absence of both cyclodextrin and organophosphate furnished the rate constant k_1^{native} . Relating k_1 to k_1^{ref} and k_1^{native} according to $(k_1^{\text{ref}} - k_1)/(k_1^{\text{ref}} - k_1^{\text{native}}) \cdot 100\%$ yielded Δk_1 , a term describing the activity of the cyclodextrin.¹⁹ If the extent of enzyme inhibition is the same in the absence and the presence of the cyclodextrin ($k_1^{\text{ref}} = k_1$) the cyclodextrin is inactive and $\Delta k_1 = 0\%$. If, however, the organophosphate disappears faster in the presence of the cyclodextrin than during the background reaction, k_1 becomes smaller with respect to k_1^{ref} until it approaches the value of k_1^{native} . As a consequence, Δk_1 increases up to 100% for full enzymatic activity ($k_1 = k_1^{\text{native}}$). All results are means of $n = 3$ experiments. Standard deviation of a series of identical measurements with the same batch of AChE is <10%. Because the results can vary more strongly if different enzyme preparations are used we assume an overall error of 20%. For the flowchart of this assay, see Figure S2.

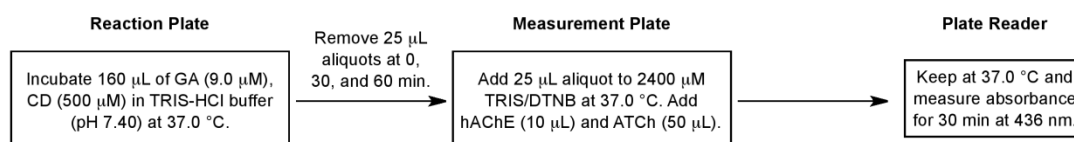


Figure S2: Flowchart showing the protocol of the qualitative enzymatic assay.

Quantitative Enzymatic Assay. The quantitative enzymatic assay was performed as described before.²⁰ In brief, GA (1 µM) was incubated with a cyclodextrin (500 µM) in TRIS-HCl buffer (0.1 M, pH 7.40) at 37.0 °C. Samples (10 µL) were taken at defined times, diluted with TRIS-HCl buffer (16 µL), and 10 µL of the diluted solutions were incubated with a nine-fold excess of hemoglobin-free erythrocyte ghosts for 30 min at 37.0 °C. An aliquot was taken and residual AChE activity was measured photometrically (Cary 50 Bio, Varian GmbH, Darmstadt, Germany) by using a modified Ellman assay.^{16,17} Activities thus obtained were referenced to a control and data are given as % of control. Processing of experimental data for the determination of detoxification rate was performed by non-linear regression analysis using curve-fitting routines implemented in GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Results shown are means of $n = 2$ experiments. Figure S3 shows a flowchart of this assay.

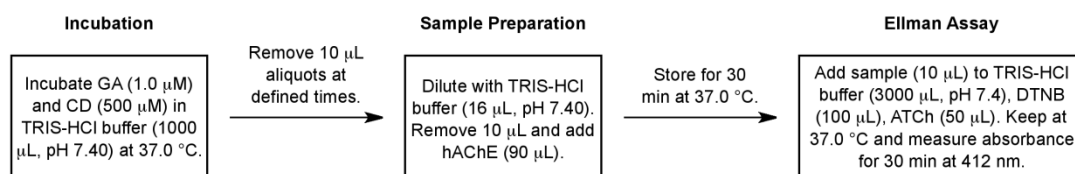
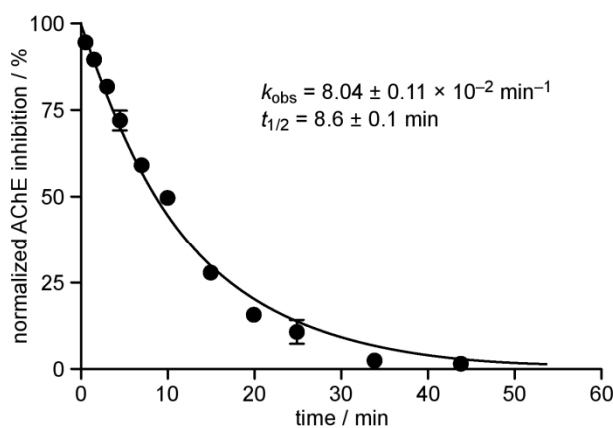
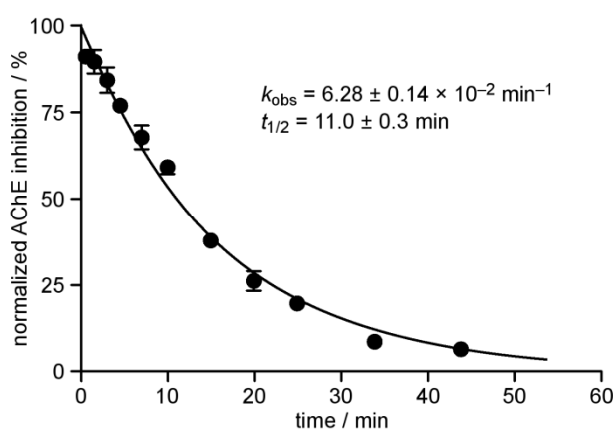
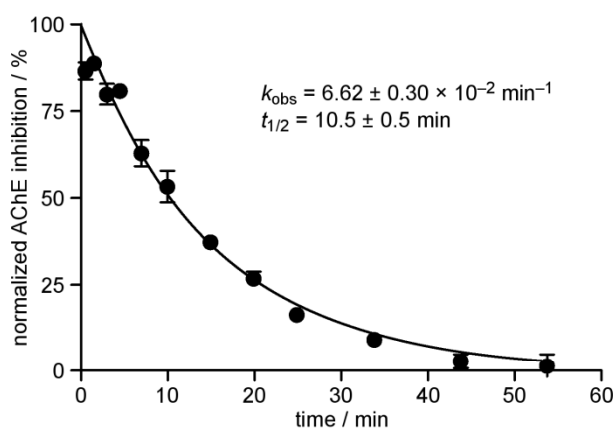
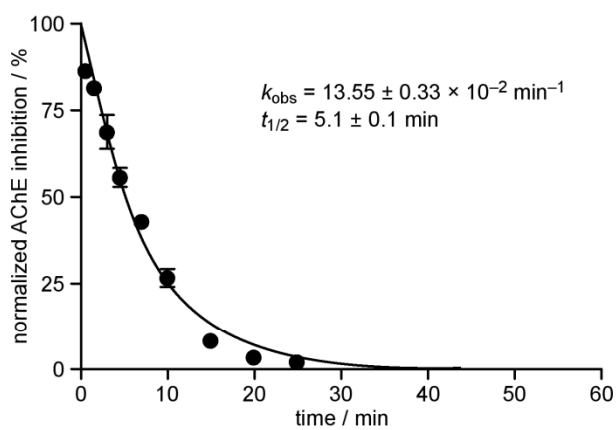
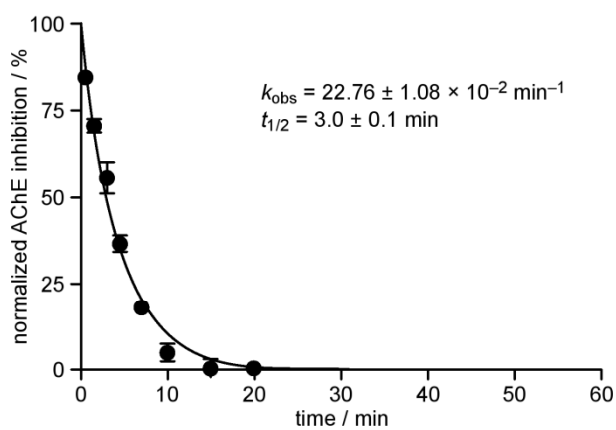
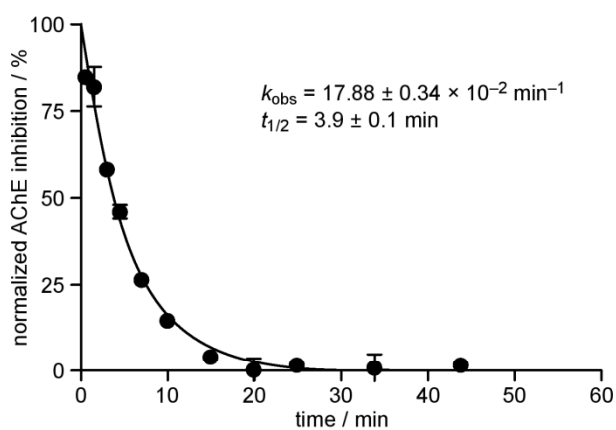
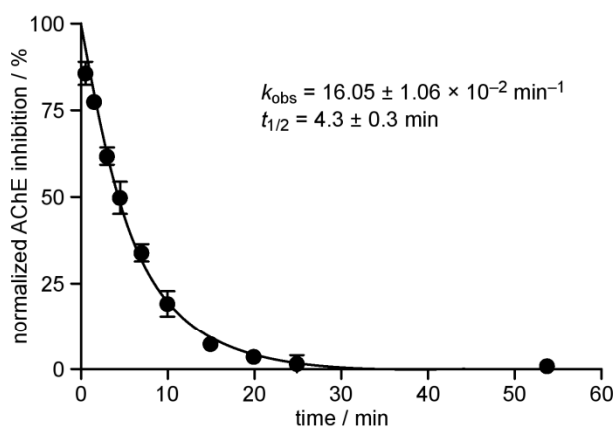
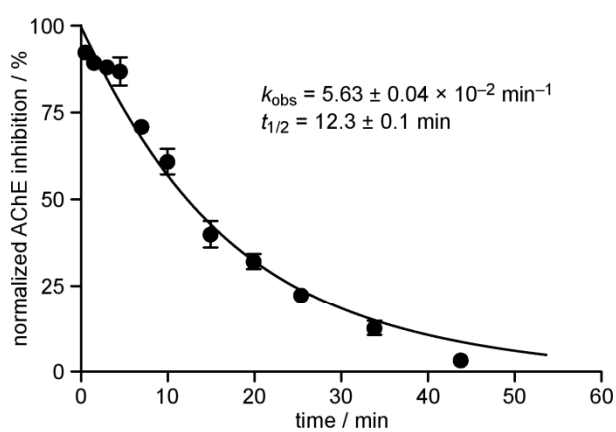


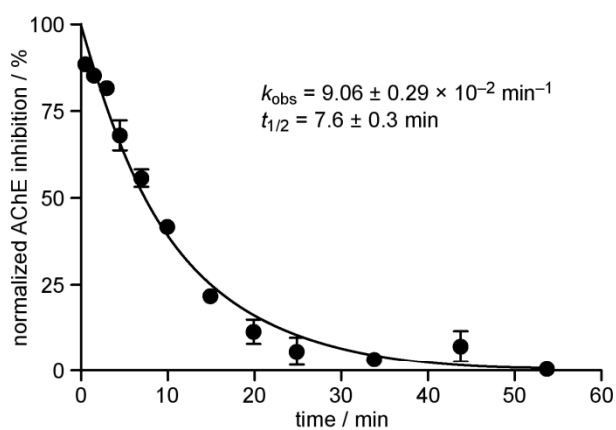
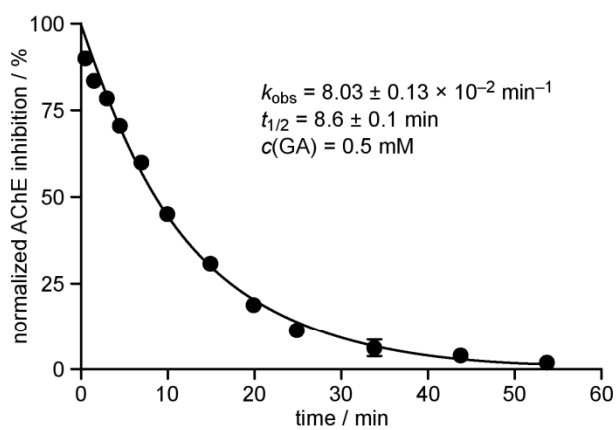
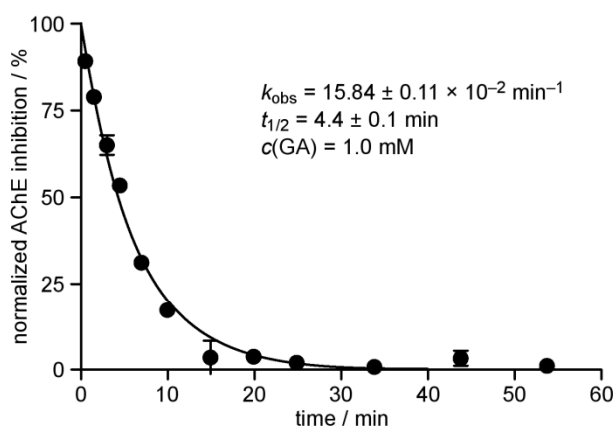
Figure S3: Flowchart showing the protocol of the quantitative enzymatic assay.

Figure S4 -Figure S16 show the time-dependent decrease of GA concentration (initial concentration 1 μM) mediated by the different hydroxamic acids (0.5 mM) at pH 7.40 and 37.0 $^{\circ}\text{C}$ monitored using the quantitative enzymatic assay (means of $n = 2$). The data points show the time-dependent decrease of AChE inhibition resulting from the detoxification of racemic GA, which correlates with GA concentration. The obtained values were referenced to a control activity. The lines show the curve fits of the measurements to a first-order rate reaction ($R^2 \geq 0.98$).

Figure S4: Hydroxamic acid β^61 .Figure S5: Hydroxamic acid β^21 .

Figure S6: Hydroxamic acid β^3_1 .Figure S7: Hydroxamic acid β^6_{12} .Figure S8: Hydroxamic acid β^6_{17} .

Figure S9: Hydroxamic acid α^6_16 .Figure S10: Hydroxamic acid γ^6_18 .Figure S11: Hydroxamic acid β^6_5 .

Figure S12: Hydroxamic acid β^57 .Figure S13: Hydroxamic acid G^61 (scavenger concentration 0.5 mM).Figure S14: Hydroxamic acid G^61 (scavenger concentration 1.0 mM).

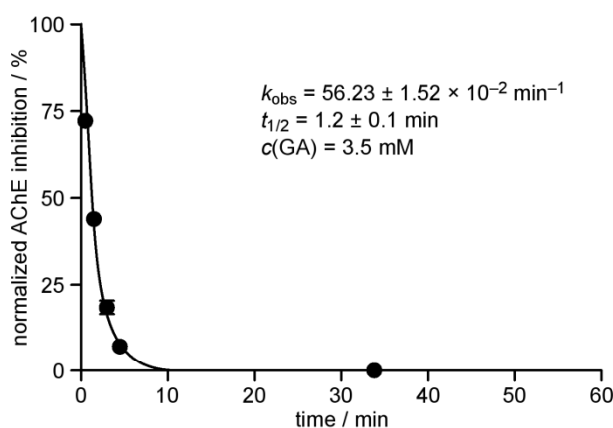


Figure S15: Hydroxamic acid **G⁶¹** (scavenger concentration 3.5 mM).

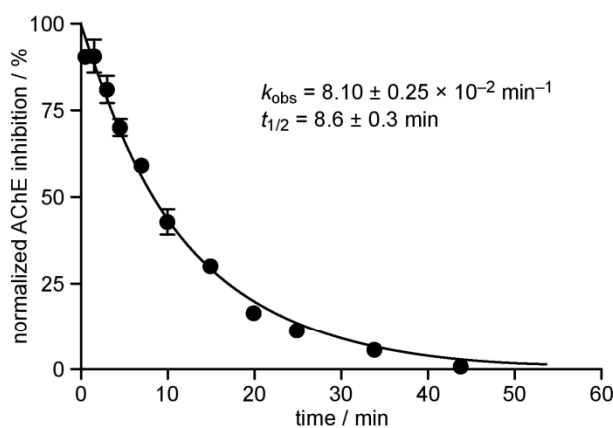


Figure S16: Hydroxamic acid **G⁶⁵**.

Repeated Incubation of Cyclodextrins with Tabun. This assay has been described previously.²¹ A stock solution of a hydroxamic acid was prepared in TRIS-HCl buffer (0.1 M, pH 7.40) and divided into a processing aliquot (990 μ L) and a control aliquot (298 μ L). The resulting solutions were stored at 37.0 $^{\circ}$ C. A solution of GA in acetonitrile (10.0 μ L, 1.00 mM) was added to the processing aliquot to obtain an overall volume of 1000 μ L and final concentrations of 10.0 μ M GA and 150.0 μ M scavenger (Figure S17). Aliquots (25 μ L) were removed at defined times and first order inhibition rate constants k_1 were determined by using the qualitative enzymatic assay (see above). Degradation of GA was complete after 6 h. Afterwards, a solution of GA in acetonitrile (34.0 μ L, 6.17 mM) was added to 699 μ L of the remaining sample solution to obtain concentrations of 143 μ M hydroxamic acid and 286 μ M GA. This solution was incubated at 37.0 $^{\circ}$ C overnight. On the next day the Ellman Assay was performed again. A control sample without cyclodextrin, which allows assessing spontaneous GA hydrolysis, was analogously processed on the first day. For

comparison, k_1 was also determined on the second day of the control aliquot. Prior to this measurement, 18 μL of TRIS-HCl buffer was added to the control aliquot to take the dilution of the processed sample resulting from the GA addition into account. The results obtained for compounds β^61 and β^65 are shown in, respectively, Figure S18 and Figure S19.

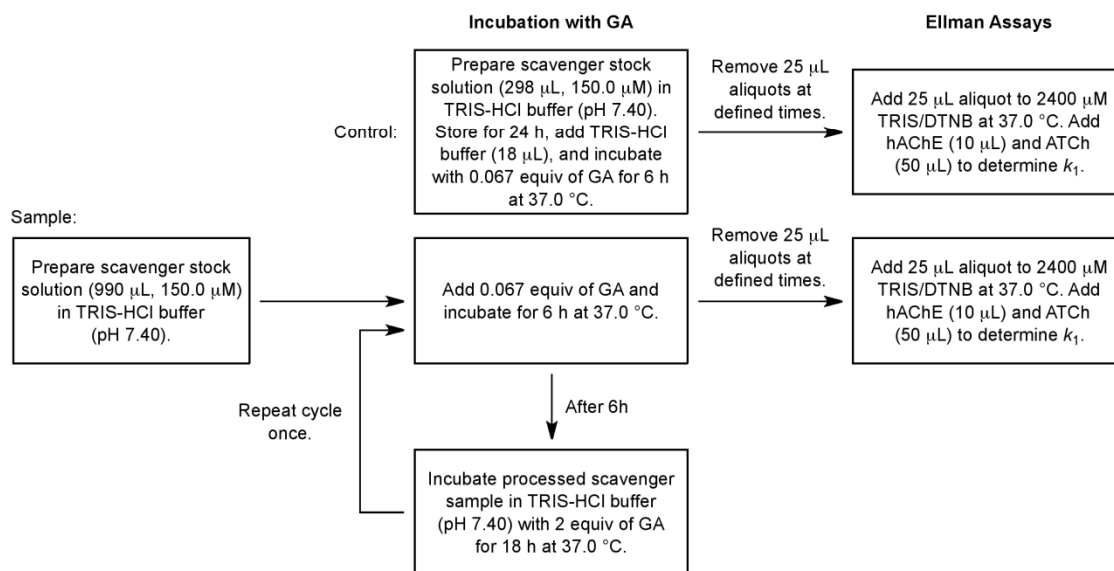
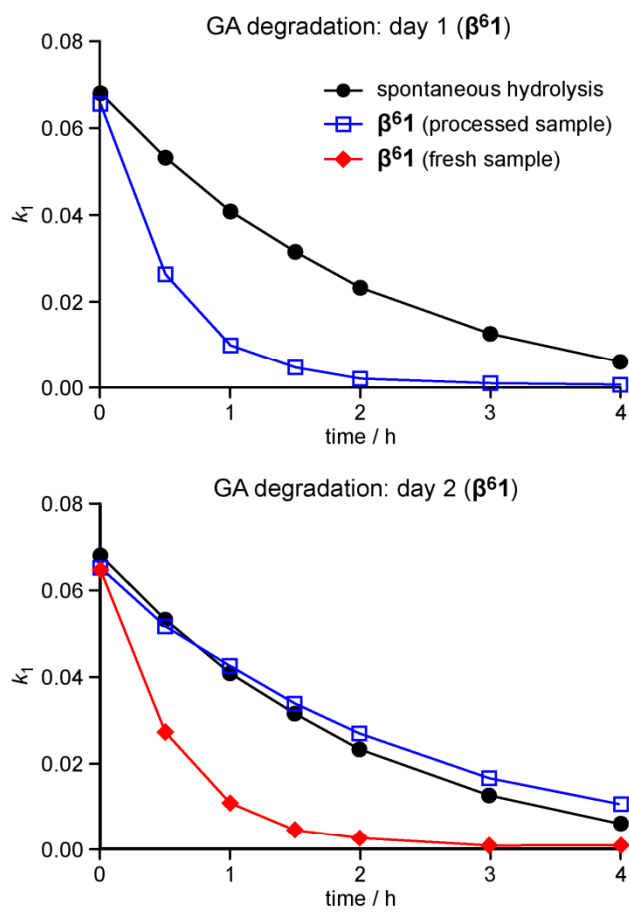
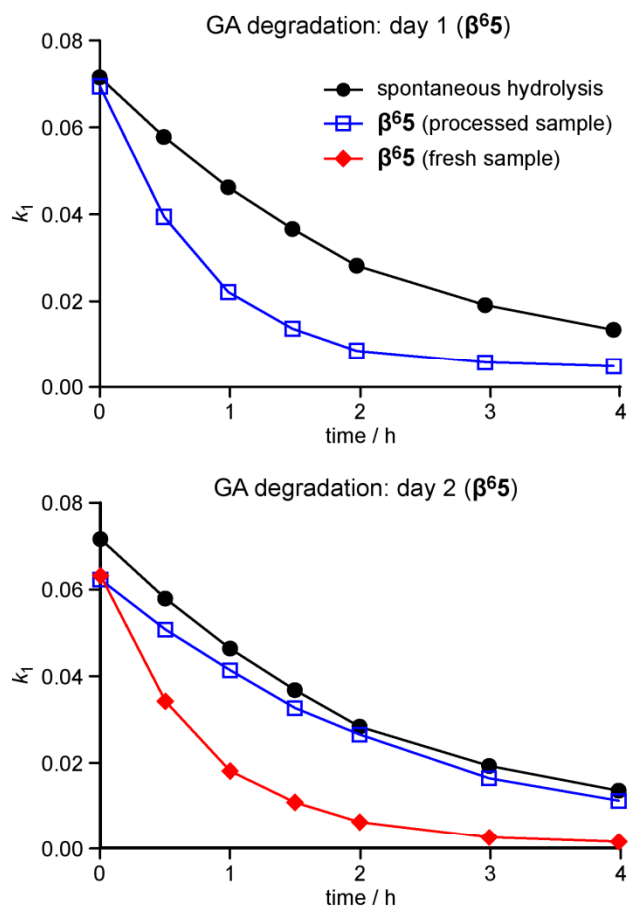


Figure S17: Flowchart showing the protocol of the repeated incubation of cyclodextrin with GA.

Figure S18: Hydroxamic acid β^61 .

Figure S19: Hydroxamic acid β^6_5 .

4. GC-MS Assay

Quantitative GC-MS Assay. This assay²¹ was performed in a stirred 2.0 mL cryo vial (Wheaton Science Products, Millville, NJ, USA) immersed in a temperature-controlled water bath (37.0 °C). GA (final concentration 1.1 μM) was added to buffer (1.85 mL, TRIS-HCl 0.1 M, pH 7.40, 37.0 °C) and an aliquot of the resulting solution (50 μL) was immediately removed to determine the initial concentration of GA enantiomers, $c_{(+)-GA,0}$ and $c_{(-)-GA,0}$. After adding a cyclodextrin solution pre-heated to 37.0 °C (200 μL, final concentration 500 μM) aliquots (50 μL) were taken at defined times and transferred into a tube containing ice-cold chloroform (1.50 mL). A solution of propyl dimethylphosphoramidocyanidate as internal standard (IS) in 2-propanol (100 ng/mL, 10 μL) was added immediately, the tube was shaken vigorously and placed on ice. Each sample was centrifuged ($10,500 \times g$, 5 min, 4.0 °C) for 10 min, the organic layer removed, and transferred to a GC vial for analysis. The flowchart of this assay is depicted in Figure S20.

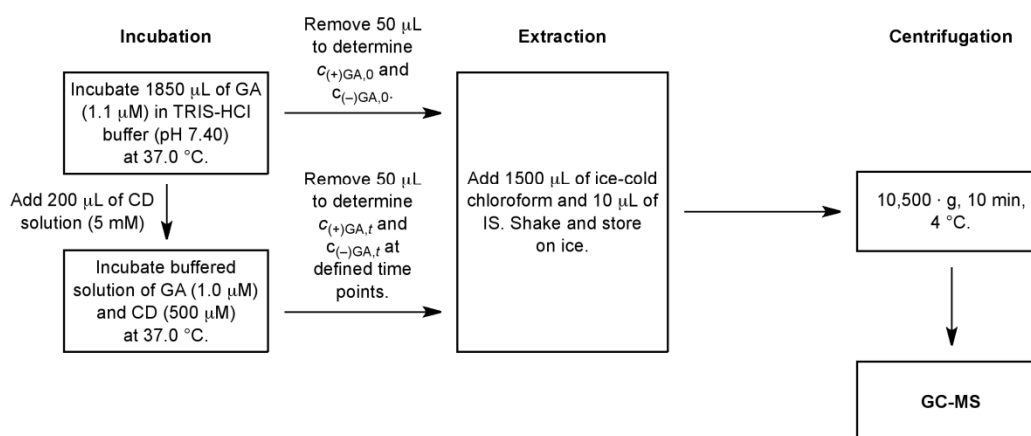


Figure S20: Flowchart showing the protocol of the quantitative GC-MS assay.

Quantification of GA enantiomers was performed by PCI-MS as described before²² by using a 7890A gas chromatographic system coupled to a 5975C mass spectrometer detector with positive chemical ionization (PCI) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), large volume injection (LVI) and a CIS 4plus cold injection system (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany).

Chromatographic separation was performed on a Supelco BetaDexTM 225 GC column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm film thickness, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany). Helium carrier gas was set at a constant flow of 1.3 mL/min. A solvent vent stop-flow injection mode was used. An aliquot of 40 μL was injected into an unpacked deactivated baffled siltek liner within 2.0 min at a

pre-column pressure of 0 bar (Table S1). The injector initial temperature was 50 °C. The final temperature of 200 °C was reached at a rate of 12 °C/s and was kept constant for 2.00 min. The initial time and vent time were set at 2.10 and 2.08 min, respectively. The vent flow rate was set at 10 mL/min, the purge flow rate at 50 mL/min with a purge time of 4.08 min. The column temperature program started at 50 °C which was held for 4.40 min. Then the temperature was raised to 170 °C with a rate of 12 °C/min and was maintained for 5.00 min. The following conditions were used for mass spectrometric analysis: positive chemical ionization with ammonia 6.0 as reactant gas with a flow rate of 2.0 mL/min, transfer line temperature 230 °C, ion source temperature 210 °C, solvent delay 12.00 min. The target ions $[M+NH_4]^+$ were detected in the selected ion monitoring (SIM) mode (dwell time 125 ms each) at m/z 180 for the GA isomers and at m/z 194 for the IS isomers. The limit of quantification was estimated to be 5 pg/mL per enantiomer.

Table S1: GC-MS Parameters for PCI Analysis of GA.

Injection Program		MS parameters	
Injection volume	40 μ L	Detected masses	m/z 180, m/z 194
Injection speed	20.0 μ L/min	Dwell time	125 ms
Initial temperature	50.0 °C	Solvent delay	12.00 min
End temperature	200 °C, hold for 2.00 min		
Initial time	2.10 min		
Vent time	2.08 min		
Vent flow rate	10.0 mL/min		
Purge flow rate	50.0 mL/min		
Purge time	4.08 min		

The experimental results were normalized to the initial concentration of GA in the absence of cyclodextrin, $c_{(+)-GA,0}$ and $c_{(-)-GA,0}$ by taking the difference in the initial GA concentration (1.1 μ M versus 1.0 μ M) into account. The kinetic constants k_{obs} were determined by non-linear regression analysis of the resulting decay curves (using GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, USA) on the basis of the following equation: $c_{(+)-GA,t} = c_{(+)-GA,0^*} \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t)$, in which $c_{(+)-GA,t}$ denotes the concentration of (+)-GA at time t and $c_{(+)-GA,0^*}$ the concentration of (+)-GA immediately after cyclodextrin addition. Analogous equations were used for (-)-GA. Spontaneous rate of GA hydrolysis of was determined independently.

Figure S21 shows the time-dependent decrease of GA concentration (initial concentration 1 μ M) mediated by β^6I_7 (0.5 mM) at pH 7.40 and 37.0 °C monitored using the quantitative GC-MS assay (means of $n = 2$). The data points show the concentrations of (+)-GA and (-)-GA normalized to the

initial concentrations of both enantiomers, $c_{(+)\text{-GA},0}$ and $c_{(-)\text{-GA},0}$. (+)-GA is shown as blue squares and (-)-GA as red diamonds. The lines in show the curve fits of the measurements to a first-order rate reaction ($R^2 \geq 0.98$).

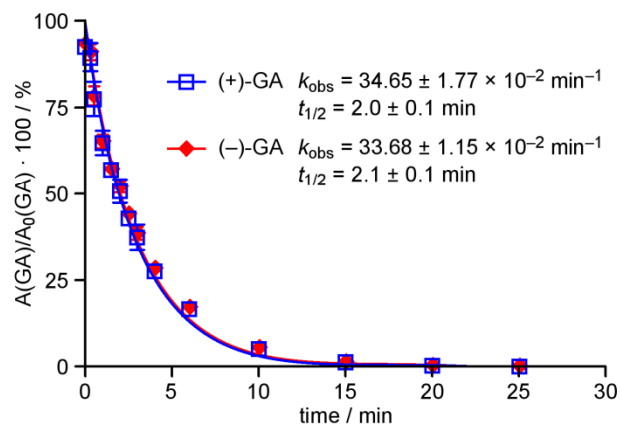


Figure S21: Result of the quantitative GC-MS assay.

5. NMR Assay

Spontaneous GA hydrolysis. GA (> 98% by ^1H NMR and ^{31}P NMR; 1 μL , final conc. 10.9 mM) was dissolved in an NMR tube in a mixture of D_2O (60 μL) and TRIS-HCl buffer (540 μL , pH 7.40). 48 Proton-decoupled ^{31}P NMR spectra were recorded from this sample at 310 K by using 512 scans per spectrum. 187 Dummy scans between each spectrum were used to set the interval between each recorded spectrum to 1801 s.

Three signals were visible in these spectra at 12.5, 11.4, and at -7.6 ppm (Figure S22). These signals were integrated within the ppm ranges -7.365 to -7.794 for **A**, 11.537 to 11.322 for **B**, 12.583 to 12.503 for **C**. The sum of the integrals for **B** and **C** at the end of the measurement were set to 100 %, and the relative ratios of the three compounds in each measurement were calculated accordingly. Figure S23 shows the development of the three signals with time.

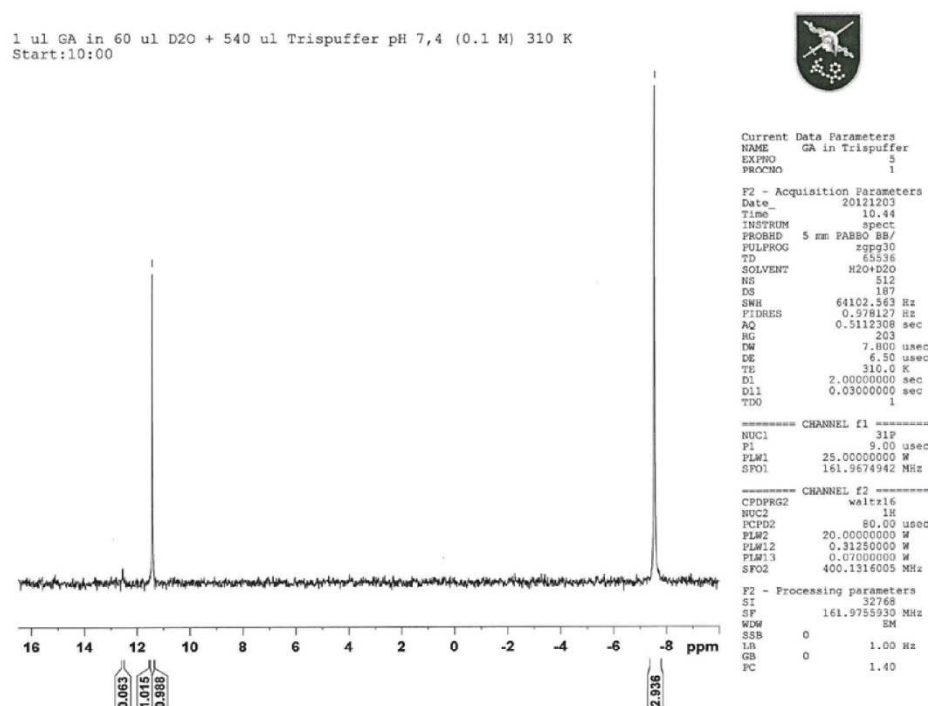


Figure S22: Representative ^{31}P NMR spectrum of GA (10.9 mM) after incubation in TRIS-HCl buffer (pH 7.40)/ D_2O 9:1 (v/v) for 30 min at 37 $^\circ\text{C}$.

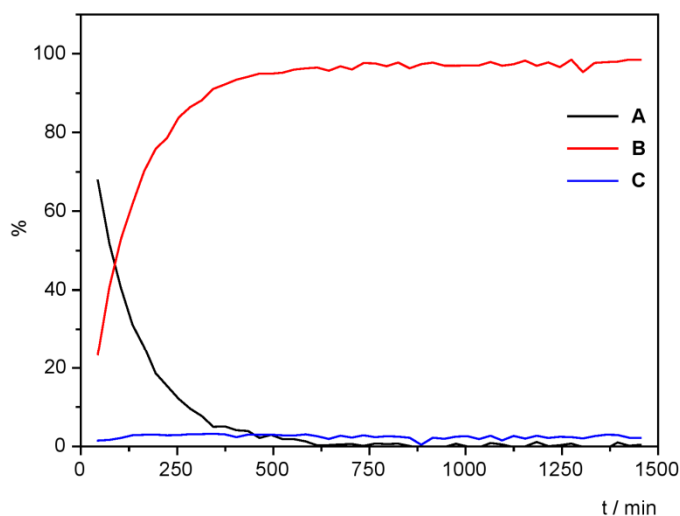
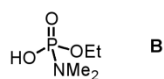


Figure S23: Spontaneous GA degradation during the NMR assay.

The signal at -7.6 ppm represents the peak of GA (**A**), which disappears progressively due to hydrolytic decomposition. ESI mass spectrometric analysis of the incubation solution revealed that GA hydrolysis mainly proceeds via cleavage of the CN group under the chosen conditions (Figure S24). Thus, the major product formed is ethyl dimethylphosphoramidate **B** (Chart S1), as confirmed by the ^{31}P NMR spectrum of an authentic sample of this compound (Figure S25). Other GA metabolites detected in the mass spectrum derive from cleavage of the dimethylamino group of GA or from cleavage of the CN and the ethoxy group. The small peak observed at 12.5 ppm in the ^{31}P NMR spectrum in Figure S22 is tentatively assigned to one of these compounds. Mass spectrometry provided no evidence for the formation of adducts between TRIS and GA.

Chart S1



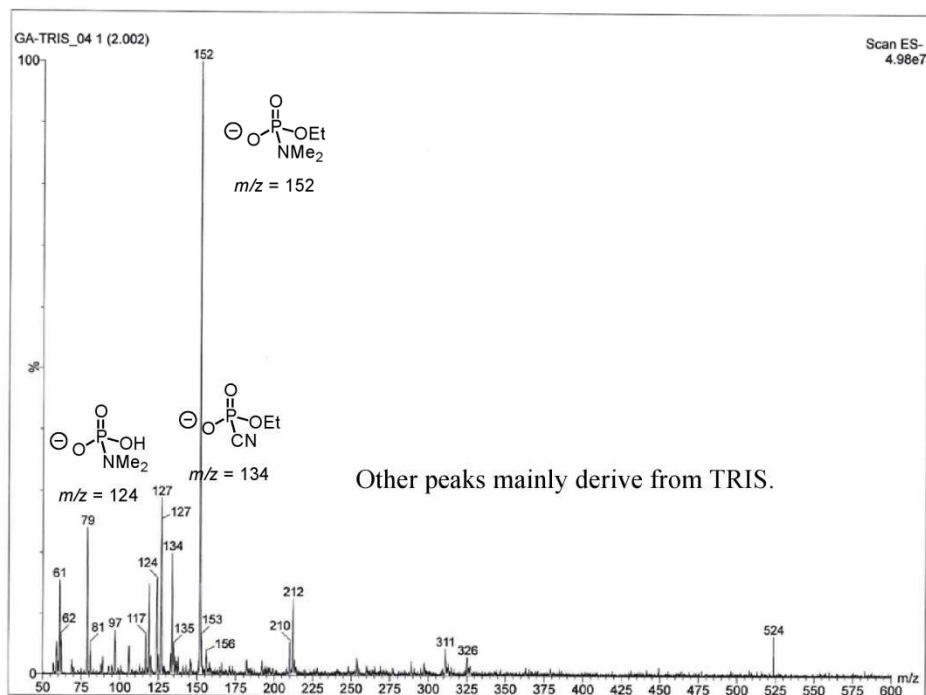
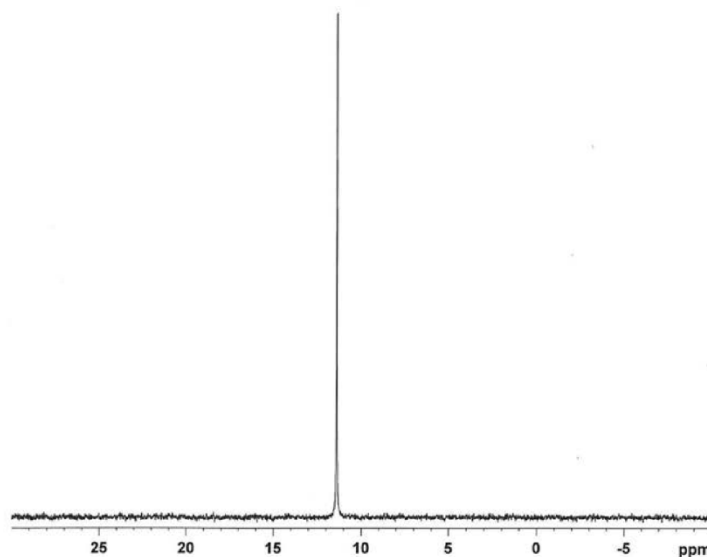



Figure S24: ESI-MS spectrum (negative mode) of the solution resulting after incubating GA in TRIS-HCl buffer (pH 7.40)/D₂O 9:1 (v/v) for 17.5 h at 37 °C.

Hydroxy-GA (Na-Salz) in 600 μ l D₂O



```

Current Data Parameters
NAME Hydroxy-GA in D2O
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20121024
Time 15.18
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 128
DS 4
SWH 64102.563 Hz
FIDRES 0.978127 Hz
AQ 0.5112308 sec
RG 2050
DW 7.800 usec
DE 6.50 usec
TE 303.0 K
D1 2.0000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 31P
P1 9.00 usec
PLW1 25.0000000 W
SF01 161.9674942 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PLW2 20.0000000 W
PLW12 0.31250000 W
PLW13 0.07000000 W
SF02 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 161.9755930 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

```

Figure S25: ³¹P NMR spectrum of **B** in D₂O.

GA degradation in the presence of G⁶1. G⁶1 (4.0 mg, C₁₀H₁₆N₄O₇, M.W. = 304.26 g mol⁻¹, final conc. 21.9 mM) was dissolved in a mixture of D₂O (60 μ L) and TRIS-HCl buffer (540 μ L, pH 7.40). GA (> 98% by ¹H NMR and ³¹P NMR; 1 μ L, final conc. 10.9 mM) was added and the mixture shaken to ensure complete dissolution. Afterward, the ³¹P NMR spectra were recorded as described above.

The first NMR spectrum recorded after 33 min showed only two signals, one at 11.4 ppm and one at 2.3 ppm (Figure S26). The absence of a signal at -7.6 ppm is a clear indication that G⁶1 induces rapid degradation of GA. The signal at 11.4 ppm represents compound **B**, the major product of spontaneous GA degradation in TRIS-HCl buffer. In the presence of G⁶1, **B** is only the minor species (2-3 %), however, formed presumably by spontaneous hydrolysis, whereas the signal at 2.3 ppm represents the major product. A mass spectrometric analysis of the incubation mixture (Figure S27) indicated that this product most likely represents compound **D** (

Chart S2), resulting from condensation of **G⁶1** and GA with loss of the CN and the NMe₂ group.

The relative ratio of **B** and **D** did not change over the course of the measurement.

We assume that formation of **D** comprises initial phosphorylation of the hydroxamic acid OH group of **G⁶1** by GA, presumably involving loss of the CN group. The intermediate then hydrolyzes rapidly by losing the NMe₂ group, a reaction that could be mediated intramolecularly by the neighboring hydroxamic acid group.

No peaks could be detected in the mass spectra indicating that reaction between GA and **G⁶1** would involve Lossen-rearrangement as observed when aryl hydroxamic acids react with organophosph(on)ates, in particular sarin.²³ **G⁶1** thus behaves like *N*-hydroxy carbamates, which also do not undergo Lossen-rearrangement after phosphorylation.²⁴

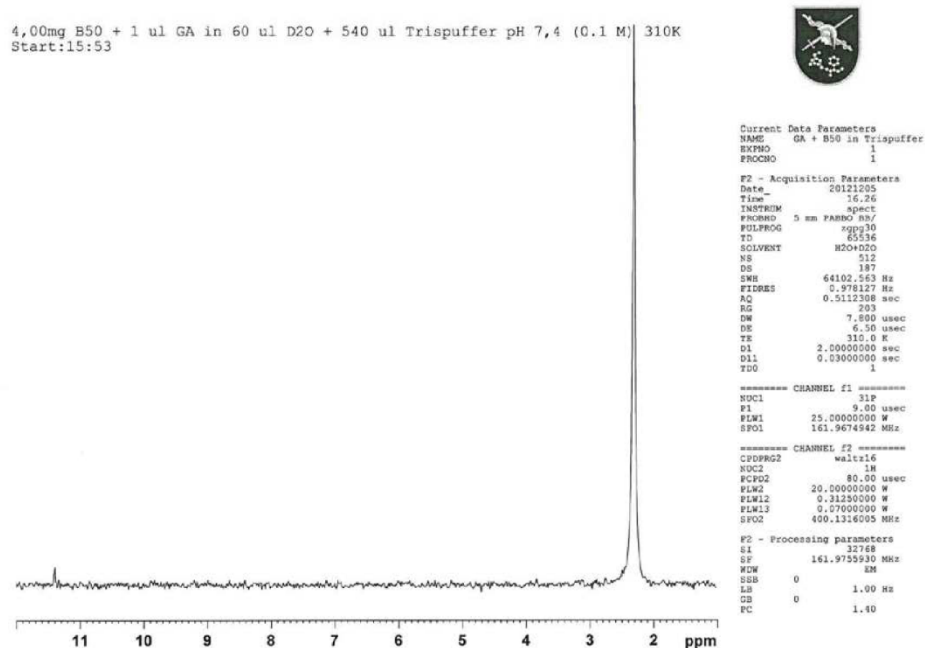


Figure S26: Representative ³¹P NMR spectrum of GA (10.9 mM) after incubation in TRIS-HCl buffer (pH 7.40)/D₂O 9:1 (v/v) for 30 min at 37 °C in the presence of 2 equiv of **G⁶1**.

Chart S2

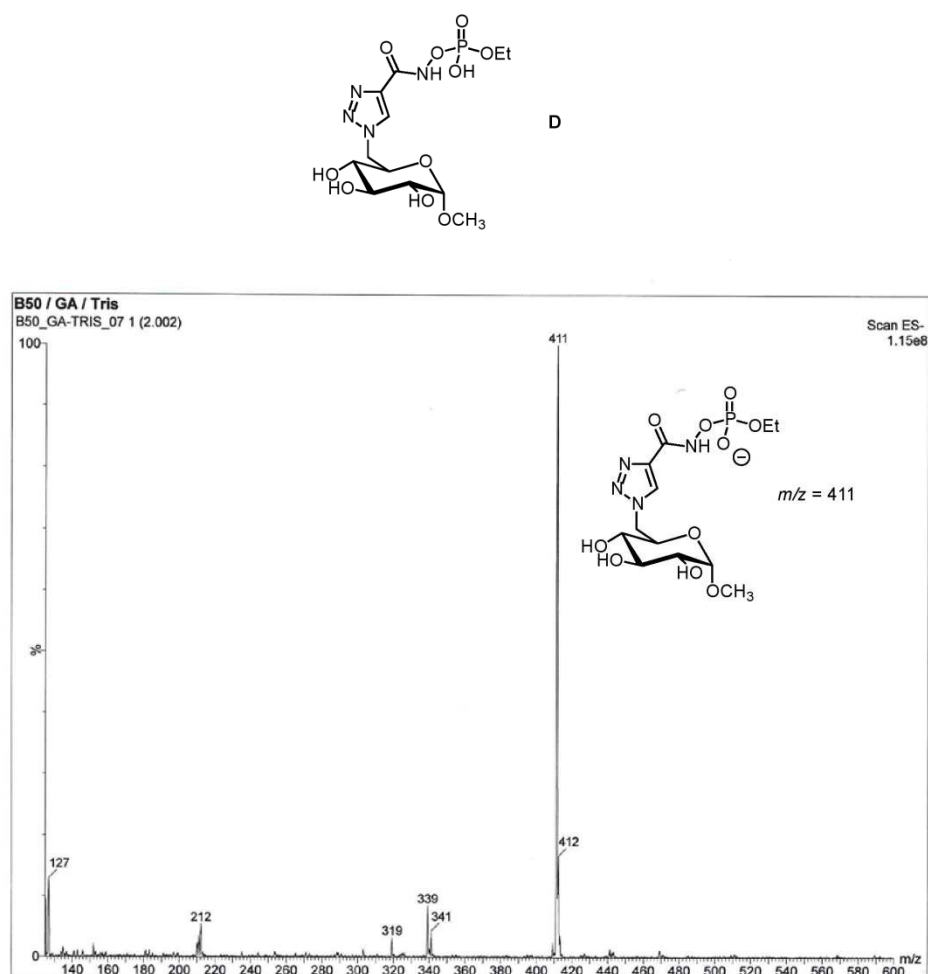


Figure S27: ESI-MS spectrum (negative mode) of the solution resulting after incubating GA with 2 equiv of **G⁶¹** in TRIS-HCl buffer (pH 7.40)/D₂O 9:1 (v/v) for 30 min at 37 °C.

GA degradation in the presence of **G⁶⁵.** **G⁶⁵** (4.3 mg, C₁₁H₁₈N₄O₇·0.5 H₂O, M.W. = 327.79 g mol⁻¹, final conc. 21.9 mM) was dissolved in a mixture of D₂O (60 μL) and TRIS-HCl buffer (540 μL, pH 7.40). GA (> 98% by ¹H NMR and ³¹P NMR; 1 μL, final conc. 10.9 mM) was added and the mixture shaken to ensure complete dissolution. Afterward, the ³¹P NMR spectra were recorded as described above.

Also in this case, there was no signal for GA visible even in the first spectrum recorded 33 min after preparing the sample, consistent with the rapid degradation of GA mediated by **G⁶⁵**. The mode of

action of the *N*-methylated derivative **G**⁶**5** turned out to be more complex than that of **G**⁶**1**, however. In the first ³¹P NMR spectrum three main signals are visible, two very close ones with resonances at 13.7 and 13.8 ppm (**E**) and one at 15.3 ppm (**F**) (Figure S28), in addition to a minor signal at 11.4 ppm representing compound **B**.

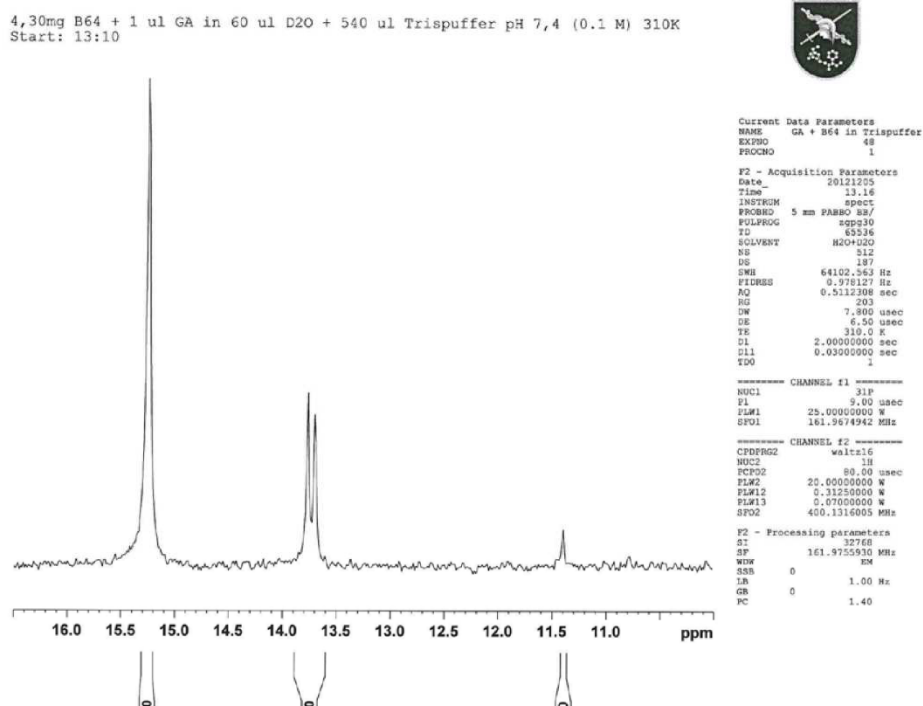


Figure S28: Representative ³¹P NMR spectrum of GA (10.9 mM) after incubation in TRIS-HCl buffer (pH 7.40)/D₂O 9:1 (v/v) for 24 h at 37 °C in the presence of 2 equiv of **G**⁶**5**.

The signals at 13.7 and 13.8 ppm became progressively smaller with time disappearing completely within 7 d. Compound **F** that gave rise to the signal at 15.3 ppm presumably only represents an transitional species as its signal grew during the first 2 d of the measurement and then slowly decreased again. A new signal appeared after 2 d at 0.7 ppm, which progressively increased and became the dominant signal in the final measurement (Figure S29) indicating that it could belong to the end product of the reaction (**G**). Additional signals appeared in the ³¹P NMR spectra after prolonged reaction times at 10.8 and 2.9 ppm.

4. Diskussion

GA + B-64 in 540 Tris + 60 D2O
 Startzeit: 09:34
 nach 14 d
 31P CPD

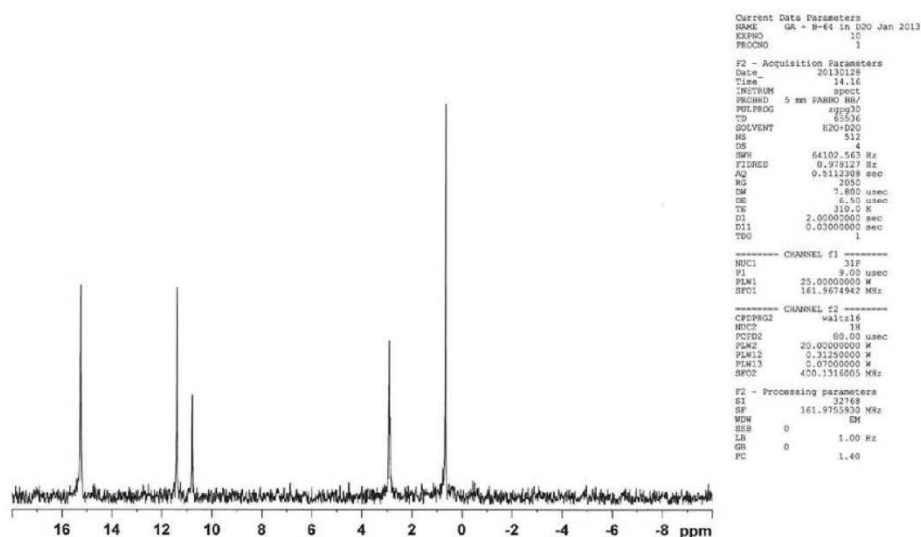
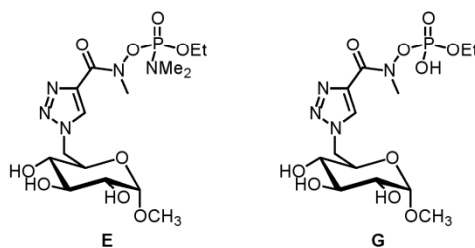


Figure S29: ^{31}P NMR spectrum of GA (10.9 mM) after incubation in TRIS-HCl buffer (pH 7.40)/D₂O 9:1 (v/v) for 14 d at 37 °C in the presence of 2 equiv of **G⁶⁵**.

Mass spectrometric analysis of the incubation solution (Figure S30) provided strong evidence that the first step in the reaction between **G⁶⁵** and GA affords phosphoramidate **E** (Chart S3). The fact that reaction between enantiopure **G⁶⁵** and racemic GA leads to diastereomeric products explains why two signals with similar resonance frequencies were observed in the ^{31}P NMR for this compound.

Chart S3



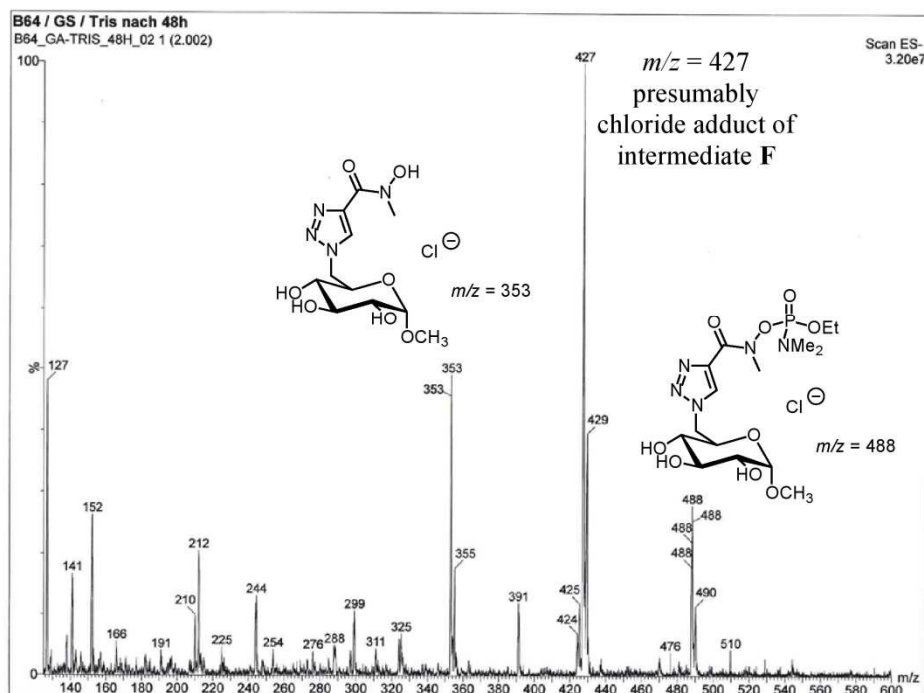


Figure S30: ESI-MS spectrum (negative mode) of the solution resulting after incubating GA with 2 equiv of **G⁶⁵** in TRIS-HCl buffer (pH 7.40)/D₂O 9:1 (v/v) for 2 d at 37 °C.

In the mass spectra at the end of the reaction a prominent signal was observed at $m/z = 425$ (Figure S31). It therefore seems likely that the reaction eventually leads to **G**, which corresponds to the final product observed in the reaction between **G⁶¹** and GA. The complete reaction path leading to **G** including the nature of intermediate **F** has not been fully elucidated yet and is the object of ongoing investigations.

4. Diskussion

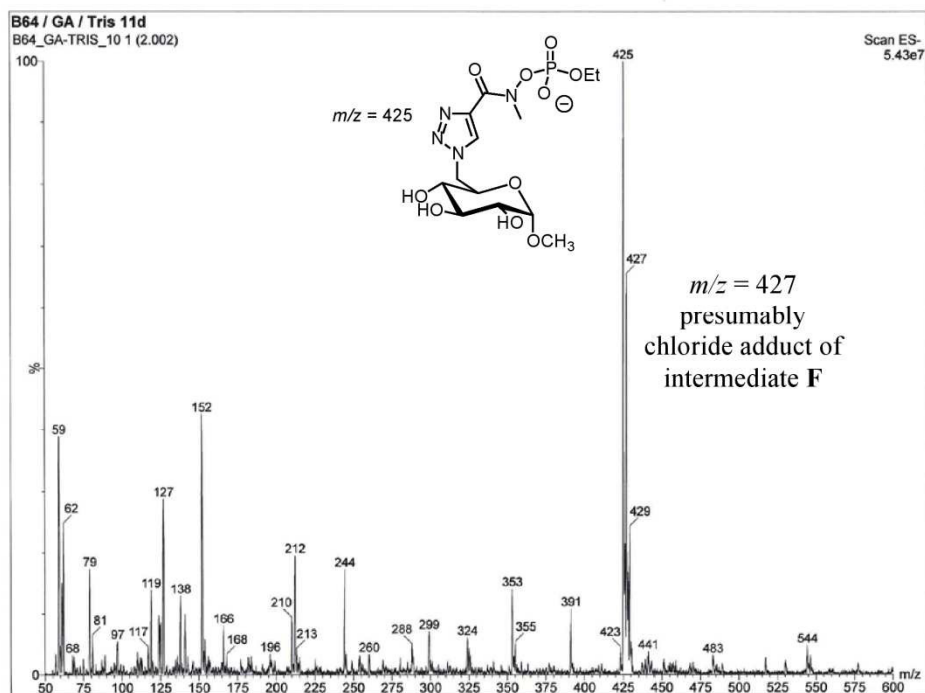


Figure S31: ESI-MS spectrum (negative mode) of the solution resulting after incubating GA with 2 equiv of **G⁶⁵** in TRIS-HCl buffer (pH 7.40)/D₂O 9:1 (v/v) for 11 d at 37 °C.

6. References

- 1 N. I. Martin, J. J. Woodward, and M. A. Marletta, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 4035-4038.
- 2 A. V. Gudmundsdottir, C. E. Paul, and M. Nitz, *Carbohydr. Res.*, 2009, **344**, 278-284.
- 3 K. Hamasaki, H. Ikeda, A. Nakamura, A. Ueno, F. Toda, I. Suzuki, and T. Osa, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 5035-5040.
- 4 T. Suzuki, Y. Ota, Y. Kasuya, M. Mutsuga, Y. Kawamura, H. Tsumoto, H. Nakagawa, M. G. Finn, and N. Miyata, *Angew. Chem.*, 2010, **122**, 6969-6972; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 6817-6820.
- 5 K. Kano, S. Chimoto, M. Tamaki, Y. Itoh, and H. Kitagishi, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 453-461.
- 6 D. Yuan, T. Tahara, W. Chen, Y. Okabe, C. Yang, Y. Yagi, F. Nogami, M. Fukudome, and K. Fujita, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 9456-9466.
- 7 M. E. Davis, H. Gonzalez, and S. Hwang (California Institute of Technology, Pasadena, Calif., US), DE69935526T2, 1999. I. Tabushi, K. Yamamura, and T. Nabeshima, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 5267-5270.
- 8 P. Ashton, R. Königer, and J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 903-908.
- 9 N. Mourtzis, K. Eliadou, C. Aggelidou, V. Sophianopoulou, I. M. Mavridis, and K. Yannakopoulou, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 125-131.
- 10 J. Einhorn, C. Einhorn, and J.-L. Luche, *Synth. Commun.*, 1990, **20**, 1105-1112.
- 11 B. R. Griffith, C. Krepel, X. Fu, S. Blanchard, A. Ahmed, C. E. Edmiston, and J. S. Thorson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8150-8155.
- 12 J. T. Dodge, C. Mitchell, and D. J. Hanahan, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, **100**, 119-130.
- 13 F. Worek, G. Reiter, P. Eyer, and L. Szinicz, *Arch. Toxicol.*, 2002, **76**, 523-529.
- 14 T. Wille, H. Thiermann, and F. Worek, *Toxicol. In Vitro*, 2010, **24**, 1026-1031.
- 15 G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.*, 1961, **7**, 88-95.
- 16 P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf, and E. Reiner, *Anal. Biochem.*, 2003, **312**, 224-227.
- 17 F. Worek, U. Mast, D. Kiderlen, C. Diepold, and P. Eyer, *Clin. Chim. Acta*, 1999, **288**, 73-90.
- 18 N. Aurbek, H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer, and F. Worek, *Toxicology*, 2006, **224**, 91-99.
- 19 M. Zengerle, F. Brandhuber, C. Schneider, F. Worek, G. Reiter, and S. Kubik, *Beilstein J.*

- Org. Chem.*, 2011, **7**, 1543-1554.
- 20 T. Wille, O. Tenberken, G. Reiter, S. Müller, R. Le Provost, O. Lafont, F. Estour, H. Thiermann, and F. Worek, *Toxicology*, 2009, **265**, 96-100.
- 21 F. Brandhuber, M. Zengerle, L. Porwol, O. Tenberken, H. Thiermann, F. Worek, S. Kubik and G. Reiter, *Toxicology*, 2012, **302**, 163-171.
- 22 O. Tenberken, F. Worek, H. Thiermann, and G. Reiter, *J. Chromatogr. B*, 2010, **878**, 1290-1296.
- 23 B. E. Hackley Jr., R. Plapinger, M. Stolberg, and T. Wagner-Jauregg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 3651-3653. R. Swidler and G. M. Steinberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 3594-3598. M. A. Stolber and W. A. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 2618-2620. R. Swidler, R. E. Plapinger, and G. M. Steinberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, **81**, 3271-3274. M. Silva, R. S. Mello, M. A. Farrukh, J. Venturini, C. A. Bunton, H. M. S. Milagre, M. N. Eberlin, H. D. Fiedler, and F. Nome, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 8254-8260. E. S. Orth, P. L. F. da Silva, R. S. Mello, C. A. Bunton, H. M. S. Milagre, M. N. Eberlin, H. D. Fiedler, and F. Nome, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 5011-5016.
- 24 G. M. Steinberger, J. Bolger, *J. Org. Chem.*, 1956, **21**, 660-662.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Publikation konnte gezeigt werden, dass Cyclodextrine, die eine oder mehrere Hydroxamsäuregruppen tragen, als Scavenger für den Abbau von Tabun geeignet sind. Im Vergleich mit den in der Publikation in Toxicology beschriebenen Oximderivaten ist die Wirksamkeit von Hydroxamsäuren auf den Tabunabbau deutlich ausgeprägter. Wie im Falle der Oximscavenger zeigte auch hier der Cyclodextrinring keinen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit von Tabun: Für ein β -Cyclodextrin mit einer Hydroxamsäuregruppe wurde dieselbe Halbwertszeit beobachtet wie für das strukturanaloge Glucosederivat. Da außerdem der GA-Abbau nicht enantioselektiv verläuft, ist auch in diesem Fall davon auszugehen, dass keine Bindung des GA in die Kavität des β -Cyclodextrins stattfindet. Auch wenn die gemessenen Halbwertszeiten für den Abbau von Tabun niedrig sind, wurden analoge Beschleunigungsraten wie beim Abbau von GF mit **β 18₁** nicht erreicht. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass während des Abbaus kein Scavenger-NOP-Komplex ausgebildet wird.

Die Methylierung der Heteroatome der Hydroxamsäuregruppe hatte unterschiedliche Effekte. Während die Methylierung des Sauerstoffatoms bzw. des Sauerstoff- und Stickstoffatoms zu einem kompletten Verlust der Wirkung auf den GA-Abbau führten, hatte die Methylierung am Stickstoffatom der Hydroxamsäure keinen signifikanten Einfluss auf die Wirksamkeit. Vergleicht man die Halbwertszeiten des GA-Abbaus in Gegenwart von Derivaten der freien Hydroxamsäure **28** und des *N*-methylierten Analogons **29**, kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Um einen genaueren Einblick in den Abbaumechanismus zu bekommen, wurden NMR- und ESI-MS-Studien der Reaktionen von GA mit den beiden Glucosederivaten **G28₁** und **G29₁** durchgeführt (Abb. 4.6).

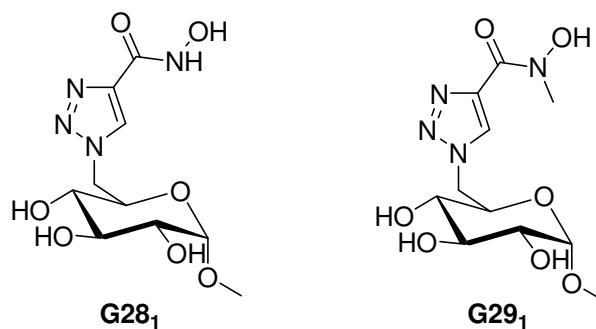
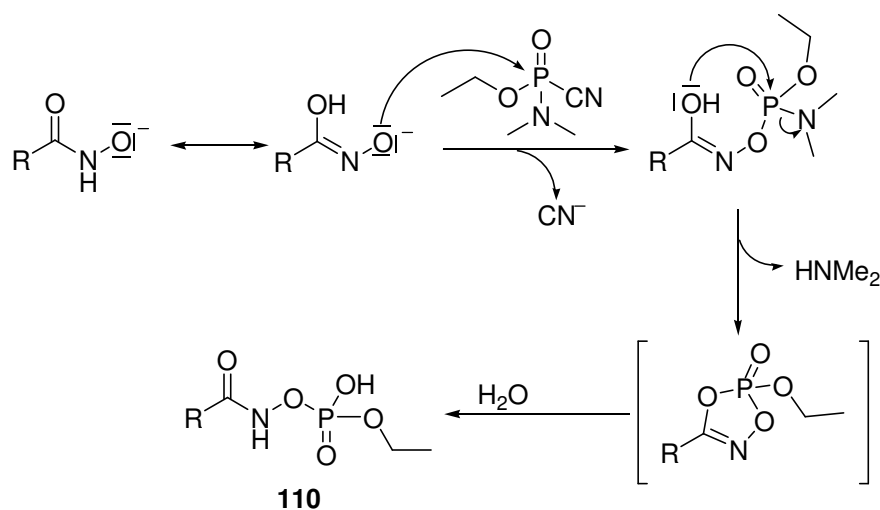


Abb. 4.6: Glucosederivate **G28₁** und **G29₁**, die zur Untersuchung des Abbaumechanismus verwendet wurden.

Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Verbindungen GA auf unterschiedliche Weise abbauen. Verbindung **G28₁** reagiert mit GA unter Abspaltung eines Cyanidanions zur phosphorylierten Hydroxamsäure. Diese spaltet dann nach Ausbildung eines postulierten 5-gliedrigen Zwischenprodukts und anschließender Hydrolyse Dimethylamin ab, sodass der Phosphorsäureester **110** als Hauptprodukt gebildet wird (Schema 4.8). Diese Interpretation steht im Einklang mit den aufgenommenen NMR- und ESI-MS-Spektren. Im Gegensatz zur Literatur, die für den durch Benzolhydroxamsäure vermittelten Abbau von Sarin eine Lossen-Umlagerung formuliert, konnten im Rahmen dieser Untersuchungen keine Hinweise in den

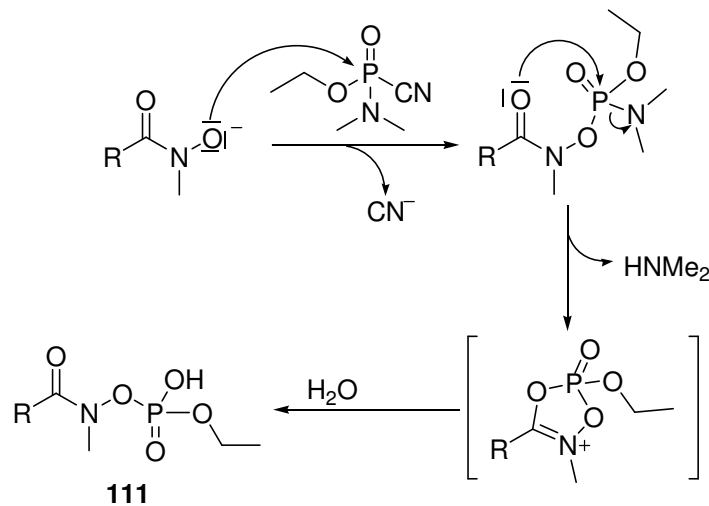
Massenspektren oder NMR-Spektren auf Zerfallsprodukte, die durch Lossen-Abbau entstehen, gefunden werden.^[171]



Schema 4.8

Der Abbau von Tabun in Gegenwart von **G29₁** ist komplexer und noch nicht komplett aufgeklärt. Diese Verbindung wurde in die Untersuchungen einbezogen, da auf Grund der *N*-Methylierung ein zur Hydroxamsäure **G28₁** analoger Abbauweg ausgeschlossen ist. Der erste Schritt der Reaktion ist auch in diesem Fall der nucleophile Angriff des *N*-Methylhydroxamats am Phosphoratom des Tabuns unter Abspaltung eines Cyanidanions. Signale für dieses Produkt wurden eindeutig in den Massenspektren gefunden. Analog zu dem in Schema 4.8 gezeigten Mechanismus könnte nun die Abspaltung einer Dimethylaminygruppe unter Ausbildung eines fünfgliedrigen cyclischen Zwischenprodukts erfolgen, für das ebenfalls in den Massenspektren Hinweise gefunden wurden. Von dieser Verbindung ist zu erwarten, dass sie mit Wasser zum Endprodukt **111** abreagiert (Schema 4.9). Dieses Produkt ist laut Massenspektrometrie tatsächlich das stabile Endprodukt der Reaktion.

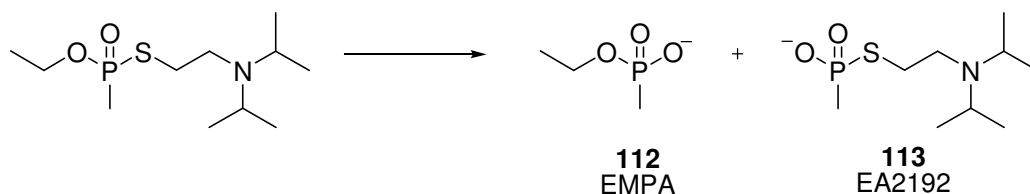
In den ³¹P-NMR-Spektren wurde allerdings die Bildung eines Intermediats beobachtet, das bisher nicht strukturell zugeordnet werden konnte. Außerdem gibt es in den Massenspektren Hinweise auf Produkte, die aus der Reaktion von einem der auftretenden Intermediate mit TRIS, dem bei der Untersuchung anwesenden Puffer, entstehen. Aus diesem Grund werden derzeit weitere Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Verhältnisse der Reaktionspartner und der Puffer variiert werden, um die noch offenen Fragen zum Reaktionsmechanismus zu klären. Die vorliegenden Ergebnisse über den Abbaumechanismus der untersuchten Hydroxamsäure erklären jedoch, warum die Scavenger nicht katalytisch wirksam sind, sondern stöchiometrische Mengen für die vollständige Entgiftung von GA notwendig sind: bei der Reaktion mit GA wird die Hydroxamsäuregruppe irreversibel modifiziert weshalb jede Hydroxamsäure nur ein Molekül GA zersetzen kann.



Schema 4.9

4.4.2 Abbau von VX durch Scavenger mit Hydroxamsäuren

Von den untersuchten NOPs ist VX auf Grund seiner hohen Toxizität und Persistenz dasjenige, für das die Entwicklung effizienter Scavenger von besonderem Interesse ist. VX ist auch das stabilste NOP. Daher sind für dessen Abbau üblicherweise harsche Reaktionsbedingungen notwendig, die für eine Entgiftung *in vivo* nicht geeignet sind. Die Halbwertszeit der VX-Hydrolyse beträgt beispielsweise selbst in 0.1 M Natriumhydroxidlösung 31 Minuten.^[174] Bei dieser Reaktion wird zu einem Großteil die P-S-Bindung gespalten, wobei EMPA (**112**) gebildet wird (Schema 4.10). Jedoch entsteht zu einem Anteil von 13 % unter Spaltung der P-O-Bindung auch Verbindung **113**. Diese Verbindung weist ebenfalls eine hohe neurale Toxizität auf, weswegen es wichtig ist, dass VX-Scavenger ausschließlich die P-S-Bindung dieses NOP spalten.^[175]



Schema 4.10

Das in der Seitenkette des VX befindliche tertiäre Amin ist für den Abbau durch Cyclodextrin-scavenger eher ungünstig. Diese Diisopropylammingruppe liegt unter physiologischem pH-Wert weitestgehend in protonierter Form vor (pK_s -Wert für *N,N*-Diisopropylethylammonium = 10.5).^[176] und stellt somit keinen guten Gast für ein Cyclodextrin dar.

Während des Aktivitätsscreenings wurden nur wenige Verbindungen identifiziert, die VX entgiften können. Bei allen aktiven Verbindungen handelte es sich um Hydroxamsäuren. Die erste Verbindung, für die eine gewisse, wenn auch geringe Aktivität gefunden wurde, war **β28₁**. Aus diesem Grund wurden weitere Hydroxamsäurederivate hergestellt, um eine Aussage über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen machen zu können. Wie erwartet, zeigten die

zweifach und siebenfach substituierten Derivate **$\beta 28_2$** und **$\beta 28_7$** , eine höhere Aktivität. Das zweifach substituierte Derivat ist etwa doppelt so aktiv wie das monosubstituierte. Dieser kontinuierliche Anstieg setzt sich bei den vollständig substituierten α -, β -, oder γ -Cyclodextrinderivaten jedoch nicht fort. Diese sind zwar nochmals aktiver als das 2-fach substituierte Derivat **$\beta 28_2$** , jedoch bleibt die Aktivität von **$\alpha 28_6$** , **$\beta 28_7$** und **$\gamma 28_8$** unter der auf Basis von **$\beta 28_1$** für sechs-, sieben- oder achtfachsubstituierte Derivate erwarteten Aktivität zurück. Bei Einführung einer Ethylengruppe zwischen Triazolring und Hydroxamsäuregruppe, wie in Verbindung **$\beta 32_1$** , geht die Wirksamkeit auf den VX-Abbau verloren. Auch bei Carbamat **$\beta 27_1$** , bei dem die Carbamatgruppe ebenfalls nicht mehr mit dem aromatischen Triazolring konjugiert ist, tritt ein Verlust der Wirksamkeit auf. Da also scheinbar die direkte Anbindung der Hydroxamsäure an ein aromatisches System von Vorteil ist, wurden weitere aromatische Hydroxamsäuren untersucht. Diese enthielten entweder Benzol- oder unterschiedlich substituierte Pyridineinheiten. Auch diese Verbindungen zeigten schwache Aktivität, jedoch hob sich keine dieser Verbindungen innerhalb des Fehlers von **$\beta 28_1$** ab. Der Scavenger **$\beta 34_1$** , der Pyrrol als aromatische Einheit trägt, wurde gewählt, da dieser Heterozyklus auf Grund der NH-Gruppe potentiell Wasserstoffbrücken zu der P=O-Gruppe eines NOPs ausbilden kann, wodurch ein nucleophiler Angriff auf das NOP Phosphoratom erleichtert werden könnte. Das Aktivitätsscreening zeigte allerdings, dass **$\beta 34_1$** keinen beschleunigenden Einfluss auf den Abbau von VX besitzt, möglicherweise weil die Hydroxamsäure in **$\beta 34_1$** auf Grund des elektronenreichen Pyrrols zu wenig acide ist (Abb. 4.7).

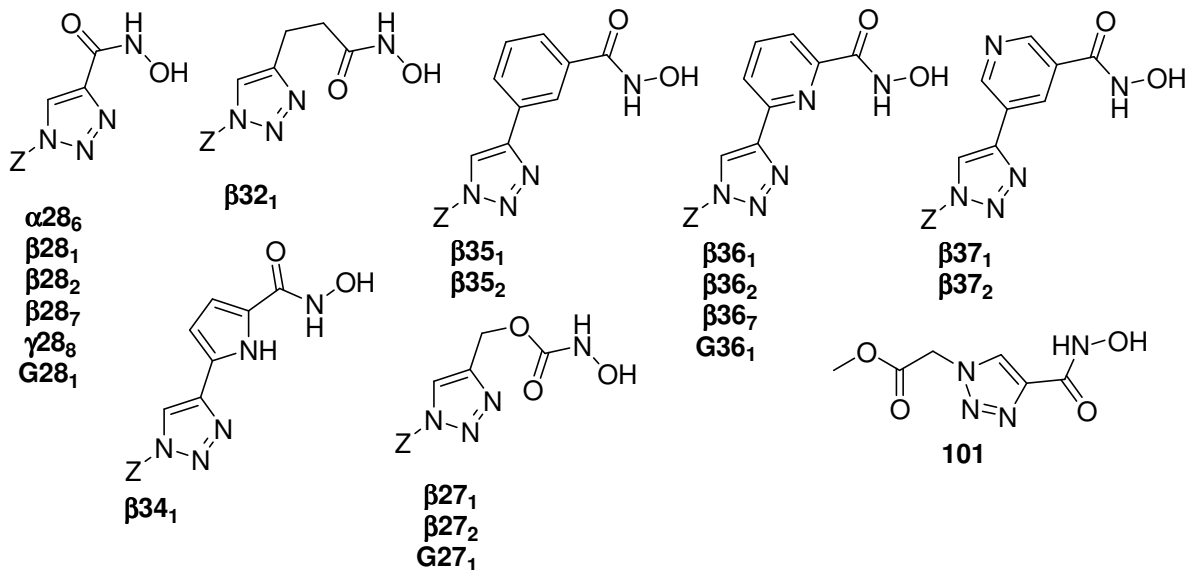


Abb. 4.7: Hydroxamsäuren, deren Wirkung auf den VX-Abbau untersucht wurde.

Die Kinetiken des VX-Abbaus in Gegenwart der Verbindungen **$\beta 28_1$** , **$\beta 28_2$** und **$\beta 28_7$** wurden mittels des chiralen GC-MS Assays genauer untersucht. Dabei ergab sich, dass der Abbau nicht enantioselektiv ist. Daraus lässt sich wiederum schließen, dass der Cyclodextrinring den VX-Abbau nicht begünstigt. Hierfür spricht auch, dass sowohl das Glucosederivat **$G 28_1$** als auch Verbindung **101**, die keinen Zuckerrest trägt, im Aktivitätsscreening innerhalb des Fehlers dieselbe Aktivität wie das Cyclodextrinderivat **$\beta 28_1$** zeigten.

Die für die einzelnen Hydroxamsäuren beobachteten Halbwertszeiten des VX-Abbaus zeigen gewisse Trends. Bei Verdopplung der Anzahl an funktionellen Gruppen geht die Halbwertszeit von 2000 min auf 440 min zurück (Tab. 4.1). Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass in diesem Fall kooperative Effekte wirksam sind, da eine Verdopplung der Anzahl der Hydroxamsäuregruppen zu einer stärkeren Reaktionsbeschleunigung führt, als man auf Basis des einfach substituierten Derivats für **β28₂** erwarten würde. Geht man zu Derivat **β28₇** über, bei dem alle primären OH-Gruppen durch Hydroxamsäuregruppen ersetzt sind, ist ein weiterer Abfall der Halbwertszeit auf 170 min zu erkennen (Tab. 4.1). Dieser Rückgang ist allerdings nicht so deutlich wie beim Übergang von **β28₁** auf **β28₂**. Vorstellbar wäre, dass sich durch die räumliche Nähe nicht mehr alle funktionellen Gruppen entlang des Cyclodextrinhohlraums im gleichen Umfang an der Reaktion mit VX beteiligen können

	$t_{1/2}$ / min	
	(-)-VX	(+)-VX
β28₁	2000	2000
β28₂	440	440
β28₇	170	170

Tab. 4.1: Halbwertszeiten des VX-Abbaus.

Auch wenn mit einer höheren Aktivität mehrfach substituierter Derivate im Vergleich zu den monosubstituierten Analoga zu rechnen war, sind diese Untersuchungen deshalb von Bedeutung, da sie Wege zur Entwicklung von Scavengern aufzeigen, die bei gleicher Konzentration deutlich aktiver sind. Diesbezüglich ist die Multifunktionalität von Cyclodextrinen ein klarer Vorteil, auch wenn beim GA- und VX-Abbau die Wechselwirkung des NOPs mit dem Cyclodextrinring wohl keine Rolle zu spielen scheint.

Zum Abbaumechanismus von VX in Gegenwart von **β28₇** wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr ³¹P-NMR-spektroskopische Messungen durchgeführt. Dazu wurde die Produktbildung bei Inkubation von VX in An- und Abwesenheit von **β28₇** NMR-spektroskopisch verfolgt. Die erhaltenen Spektren sind in Abb. 4.8 abgebildet. Man erkennt, dass bei der Spontanhydrolyse von VX unter den verwendeten Reaktionsbedingungen nach 10 h noch VX in erheblichen Mengen nachweisbar ist. Daneben werden Peaks beobachtet, die den Verbindungen **112** und **113** zugeordnet wurden. Das heißt in Wasser kommt es zur Bildung beider Metabolite von VX in einem Verhältnis von ca. 1:4 zu Gunsten des nicht toxischen Metaboliten **112**. Natives β-Cyclodextrin besitzt keinen nachweisbaren Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit oder Produktverteilung. In Gegenwart von **β28₇** wird VX innerhalb von 10 h fast vollständig abgebaut. Dabei ist bislang ungeklärt, ob das Signal bei ca. 61 ppm einem Reaktionsprodukt aus **β28₇** und VX zuzuordnen ist, oder unzersetztem VX, dessen Absorption – möglicherweise durch Gegenwart des Cyclodextrins – beeinflusst ist. Dass der Shift eine Komplexbildung des VX im Cyclodextrinhohlraum anzeigt, ist zumindest auf Basis der kinetischen Untersuchungen und der fehlenden Enantioselektivität des VX-Abbaus zweifelhaft.

Weiterhin ist in Spektrum iii in Abb. 4.8 zu erkennen, dass als weiteres Produkt ausschließlich Verbindung **112** beobachtet wird. Dies zeigt, dass **β 28₇** nur die Spaltung der P-S-Bindung von VX induziert und der unerwünschte Metabolit EA2192 (**113**) nicht auftritt. Weiterhin werden im Spektrum, anders als beim hydroxamsäurevermittelten Tabunabbau, nicht (oder nur in untergeordnetem Maße) phosphonylierte Cyclodextrinderivate beobachtet. Als Hauptprodukt entsteht ein Hydrolyseprodukt von VX. Dies könnte dafür sprechen, dass phosphonylierte Intermediate schnell hydrolysiert werden und **β 28₇** als katalytischer Scavenger wirksam sein könnte. Alternativ ist denkbar, dass ein phosphonyliertes Intermediat schnell in einer Lossen-Umlagerung zerfällt, wie dies beispielsweise für Sarin beschrieben ist.^[172] Genauere Aussagen zum Abbaumechanismus von VX in Gegenwart von **β 28₇** können derzeit nicht gemacht werden, da massenspektrometrische Untersuchungen bislang noch fehlen.

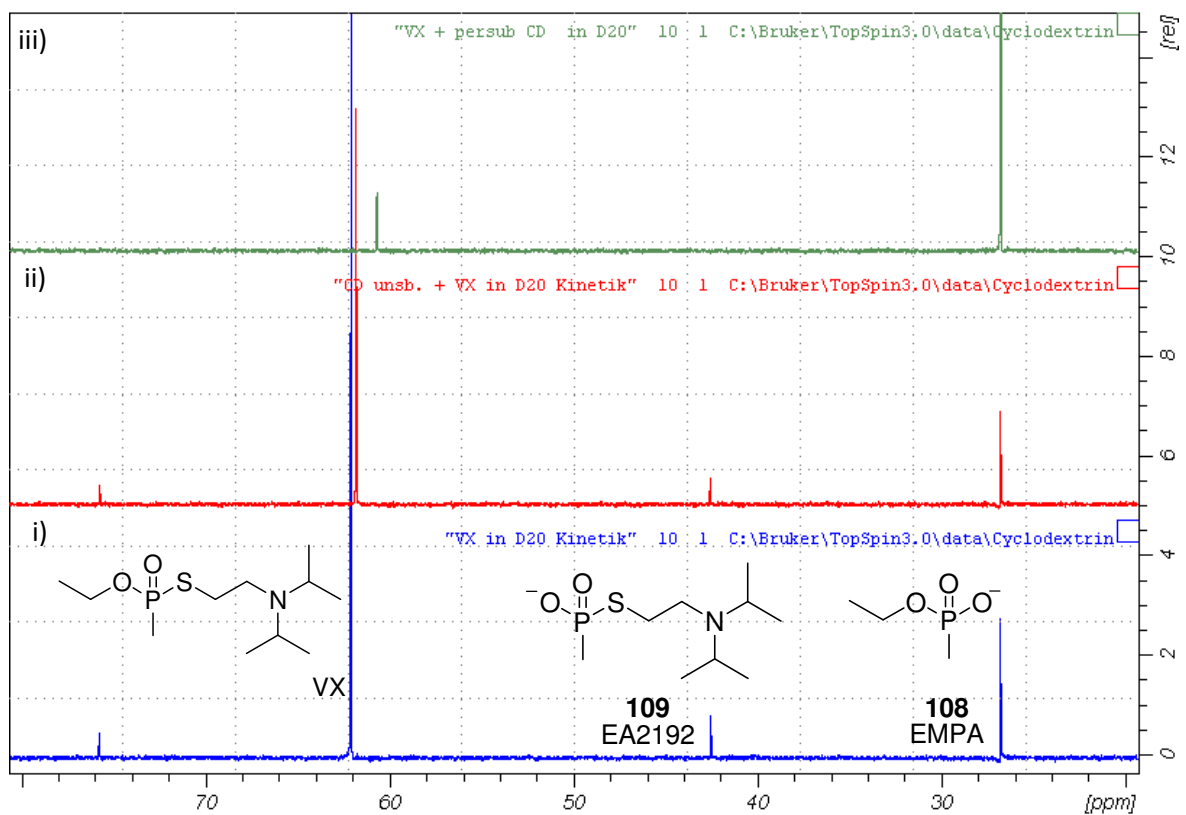


Abb. 3.12: i) ³¹P-NMR Spektrum von VX in D₂O, ii) ³¹P-NMR Spektrum einer Reaktionslösung, bei der VX in Gegenwart von β -CDx 10 h lang bei 37 °C inkubiert wurde. iii) ³¹P-NMR Spektrum von einer Reaktionslösung, bei der an Stelle von β -CDx **β 28₇** verwendet wurde.

Damit wurden im Rahmen dieser Arbeit mit den von **28** abgeleiteten Hydroxamsäuren erste Leitstrukturen gefunden, die auch die Entgiftung des sehr persistenten VX induzieren können. Weiterhin zeigen die Untersuchungen, dass dabei nur die P-S-Bindung gespalten wird, was für eine Anwendung solcher Verbindungen als VX-Scavenger aussichtsreiche Perspektiven eröffnet. Die Halbwertszeiten des VX-Abbaus sind von diesen Verbindungen für eine Behandlung von VX-Vergiftungen noch zu lang, jedoch liefern die Arbeiten einen wichtigen Ausgangspunkt für eine weitere Optimierung dieser Scavenger.

Es soll am Ende erwähnt werden, dass alle Hydroxamsäurederivate, die auf die Wirksamkeit gegenüber GA und VX getestet wurden im Aktivitätsassay auf ihre Wirkung auf die Entgiftung von GF untersucht wurden. In diese Zusammenhang konnte für alle Cyclodextrin- und Glucosederivate, die eine oder mehrere Hydroxamsäuregruppen tragen, ebenfalls ein beschleunigender Effekt auf den GF-Abbau nachgewiesen werden. Alle Verbindungen bleiben jedoch hinter der Aktivität von Scavenger **β 18₁** zurück.

5. Zusammenfassung

NOPs stellen mit ihrer hohen Toxizität gegenüber lebenden Organismen eine große Bedrohung dar. Ziel dieser Arbeit war es, molekulare Scavenger zu entwickeln, die neurotoxische Organophosph(on)ate deaktivieren, bevor die typischen Vergiftungserscheinungen auftreten.

Hohe Beschleunigungen des NOP-Abbaus sollten erreicht werden, indem NOP-Moleküle zunächst an ein Rezeptormolekül gebunden werden, in dem eine zusätzlich vorhandene funktionelle Gruppe dann durch nucleophilen Angriff auf das NOP-Phosphoratom die NOP-Zersetzung induziert. Als Rezeptormoleküle wurden auf Grund ihrer toxikologischen Unbedenklichkeit Cyclodextrinderivate verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 69 verschiedene, potentielle NOP-Scavenger dargestellt und analysenrein erhalten. Neben α -, β - und γ -Cyclodextrinderivaten wurden auch Glucosederivate oder eine Verbindung ohne Zuckerrest synthetisiert, die als Referenzverbindungen dazu dienten, den Einfluss des Cyclodextrinrings auf den NOP-Abbau zu untersuchen. Allen Zuckerderivaten war gemeinsam, dass die Substituenten sich in C⁶-Position der Glucoseeinheiten befanden. Als nucleophile Gruppen wurden N- und O-Nucleophile sowie α -Effekt-Nucleophile, wie Oxime oder Hydroxamsäuren, berücksichtigt.

Die synthetisierten Verbindungen wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München bezüglich ihrer Scavengeraktivität getestet. Dabei wurde in einem ersten Schritt zunächst geprüft, ob eine beschleunigende Wirkung auf den Abbau der vier repräsentativen NOPs Cyclosarin (GF), Tabun (GA), VX und Paraoxon-Ethyl (PXE) vorhanden war. Aktive Verbindungen wurden dann weiter charakterisiert, indem beispielsweise kinetische Daten zum NOP-Abbau ermittelt wurden, die Enantioselektivität des Abbaus untersucht wurde oder mittels NMR- und ESI-MS-Untersuchungen die Abbaumechanismen aufgeklärt wurden.

Hierbei zeigte sich, dass keine der dargestellten Verbindungen den Abbau von PXE in nennenswertem Umfang beschleunigt. Außerdem waren normale O- und N-Nucleophile im Wesentlichen inaktiv. Erhöhte Aktivität wurde für Oxime und insbesondere Hydroxamsäuren gefunden. Die Ergebnisse werden im Folgenden kurz für die einzelnen NOPs zusammengefasst.

Cyclosarin

Mit **β 18₁** konnte ein Scavenger identifiziert werden, der GF innerhalb von wenigen Minuten unter den Bedingungen des verwendeten Assays entgiftet. Dabei wird das toxischere (–)-Enantiomer von GF bis zu 23-mal schneller abgebaut als das (+)-Enantiomer. Dieses Ergebnis ist ein klarer Hinweis auf die Beteiligung des Cyclodextrinrings am GF-Abbau, die sehr wahrscheinlich auf die Inklusion des Cyclohexylrests von GF in die Cyclodextrinkavität zurückzuführen ist. Das entsprechende Glucosederivat **G18₁** ist im Einklang mit dieser

Interpretation deutlich weniger aktiv. Erste Tierversuche zeigten, dass die Scavengeraktivität auch *in vivo* erhalten bleibt (Abb. 5.1).

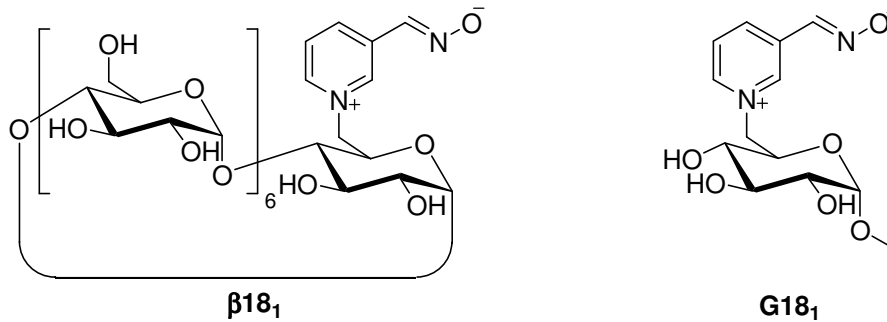


Abb. 5.1: GF-Scavenger

Tabun

Als wirksame Tabunscavenger erwiesen sich Oximate und vor allem Hydroxamate. Dabei entgiftete das Cyclodextrinderivat **$\beta 19_1$** GA mit einer Halbwertszeit von 10.4 min. Interessanterweise unterscheidet sich **$\beta 19_1$** von **$\beta 18_1$** nur durch die Position der Oximatgruppe im Pyridiniumring. Während **$\beta 18_1$** der aktivere GF-Scavenger ist, ist **$\beta 19_1$** aktiver beim GA-Abbau. Dies kann als Struktur-Wirkungs-Beziehung gewertet werden. Die Tatsache, dass der GA-Abbau nicht enantioselektiv ist und dass das Glucosederivat **G19₁** nur etwas weniger aktiv ist als das entsprechende β -Cyclodextrinderivat **$\beta 19_1$** sind Hinweise darauf, dass der Cyclodextrinring keinen oder nur einen geringen Einfluss auf den GA-Abbau hat. Dies steht im Einklang damit, dass das GA-Molekül keine geeigneten Substituenten enthält, die für eine effiziente Wechselwirkung mit β -Cyclodextrin bekannt wären. Schließlich zeigten die Untersuchungen, dass es sich bei **$\beta 19_1$** um einen stöchiometrischen Scavenger handelt: Bei der Reaktion mit GA geht die Scavengeraktivität verloren, vermutlich weil es zu einer irreversiblen Modifizierung von **$\beta 19_1$** kommt (Abb. 5.2).

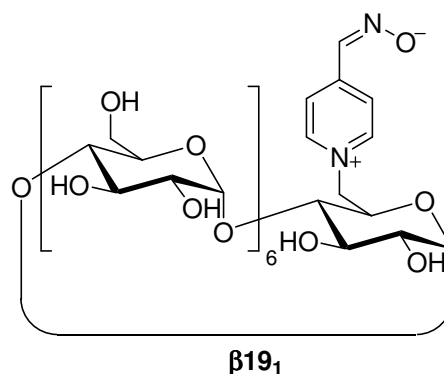


Abb. 5.2: Aktivster GA-Scavenger auf Oximbasis.

Für Hydroxamsäuren wurde eine tendenziell höhere Aktivität gefunden als für Oxime, was sich in kürzeren Halbwertszeiten des Tabunabbaus äußerte. Die Untersuchung der Aktivität methylierter Hydroxamsäuren zeigte, dass die *O*-Methylierung zu einem vollständigen Verlust der Aktivität führt, während die *N*-Methylierung der Hydroxamsäuregruppe keinen

signifikanten Einfluss auf die Geschwindigkeit des GA-Abbaus hat. Wiederum ist der Abbau von GA nicht enantioselektiv und wird durch das Glucosederivat **G28₁** in ähnlicher Weise beschleunigt wie durch das analoge monosubstituierte β -Cyclodextrin. Cyclodextrinderivate haben aber den Vorteil, dass mehrere funktionelle Gruppen entlang des Rings angeordnet werden können. Dadurch kann die Aktivität bei gleichbleibender Scavengerkonzentration signifikant gesteigert werden. Das beste Cyclodextrinderivat **β 28₇** vermittelt den GA-Abbau innerhalb von 3.0 min. Mechanistische Studien zeigten, dass **G28₁** bei Reaktion mit GA irreversibel phosphoryliert wird, was im Einklang mit dem Verlust der Scavengeraktivität steht. Der Verlauf der Reaktion der *N*-methylierten Hydroxamsäure **G29₁** mit GA ist komplexer und aktuell noch nicht komplett aufgeklärt.

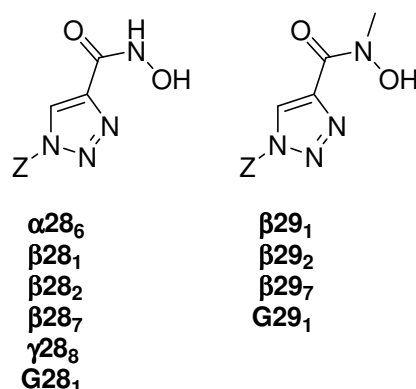


Abb. 5.3: GA-Scavenger auf Hydroxamsäurebasis.

VX

Die Entwicklung von Scavengern für VX war wegen der relativ hohen Stabilität dieses NOPs die größte Herausforderung. Bisher sind VX-Scavenger in der Literatur nicht beschrieben. Mit den in Abb. 5.4 gezeigten Hydroxamsäuren wurden erste Verbindungen identifiziert, die VX langsam aber in merklichem Umfang entgiften können. Dabei zeigte sich, dass die Anbindung der Hydroxamsäuregruppe an einen elektronenarmen Aromaten günstig ist (**β 36₁**, **β 37₁**). Sowohl ein aliphatischer Linker zwischen dem Triazolring und der Hydroxamsäuregruppe (**β 32₁**), die Anbindung einer Hydroxamsäure an einen elektronenreichen Pyrrolring (**β 34₁**) als auch den Einsatz des Carbamats **β 27₁** führten zu einem kompletten Verlust der Scavengeraktivität (Abb. 5.4).

Wiederum ist der Abbau in Gegenwart der Cyclodextrinderivate nicht enantioselektiv und ähnlich schnell wie in Gegenwart entsprechender Glucosederivate. Bei Anbindung von 7 Substituenten an einen β -Cyclodextrinring konnte aber immerhin eine VX-Entgiftung mit einer Halbwertszeit von ca. 3 h erreicht werden. Dabei gaben NMR-Studien Hinweise darauf, dass beim VX-Abbau in Gegenwart von **β 28₇** nur die P-S-Bindung gespalten wird und damit der unerwünschte, toxische Metabolit von VX, EA2192 (**113**), nicht gebildet wird.

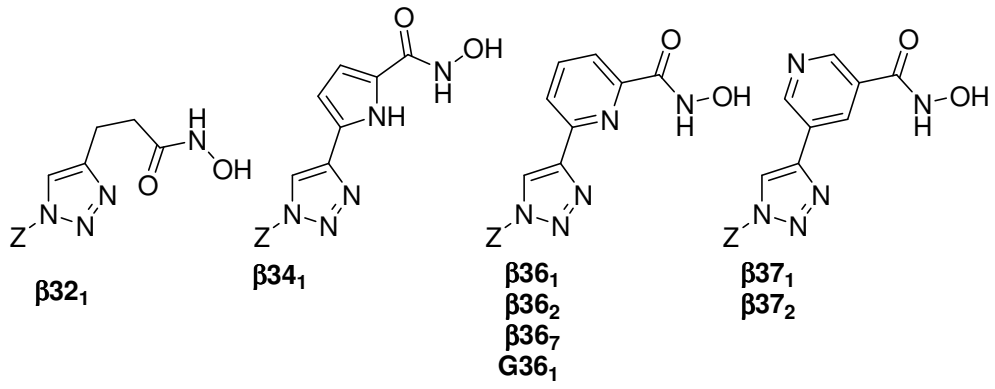


Abb. 4.4: VX-Scavenger auf Hydroxamsäurebasis

6. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass modifizierte Cyclodextrinderivate die Entgiftung von neurotoxischen Organophosph(on)aten beschleunigen können. Während Cyclosarin und Tabun mit geringen Halbwertszeiten abgebaut werden konnten, stellt die Entgiftung von VX und Paraoxon immer noch eine Herausforderung dar.

Zukünftige Arbeiten können zum einen eine weitere Verbesserung der Aktivität der nucleophilen Gruppen zum Ziel haben. Diese Arbeit gibt Hinweise darauf, dass eine Verringerung des pK_s -Werts der funktionellen Gruppen tendenziell mit einer Erhöhung der Aktivität einhergeht. Bei physiologischem pH-Wert sind die Gruppen also in einem größeren Umfang deprotoniert, wodurch eine Reaktion mit dem NOP schneller erfolgt. Eine Möglichkeit, die Aktivität der Hydroxamsäure zu erhöhen, wäre dementsprechend die Verwendung von Thiohydroxamsäuren deren pK_s -Werte in der Regel 3-4 Größenordnungen geringer sind als die von Hydroxamsäuren.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen weiterhin, dass im Einklang mit dem übergeordneten Projekt dieser Dissertation mit einer Reaktionsbeschleunigung insbesondere dann zu rechnen ist, wenn die NOPs an den Rezeptorteil des Scavengers binden. Hinweise darauf sind die hohe Geschwindigkeit und Enantioselektivität des GF-Abbaus in Gegenwart des Cyclodextrinderivats **β 18₁**, dessen Cyclohexylrest wahrscheinlich in die Kavität des Cyclodextrins eingelagert wird. GA und VX haben keine Substituenten, die effizient mit β -Cyclodextrin wechselwirken. Man kann die Wechselwirkung zwischen GA und VX mit β -Cyclodextrin möglicherweise verstärken, indem man Substituenten in den Cyclodextrinring einführt, die Wechselwirkungen mit diesen NOPs eingehen. Denkbar wären beispielsweise Wasserstoffbrückendonatoren, die an die NOP P=O Bindung binden. Arbeiten von Christian Schneider im Rahmen seiner Diplomarbeit zeigten allerdings, dass Komplexe entsprechender Cyclodextrine mit Phosphonaten nur geringfügig stabiler sind als die von nativem β -Cyclodextrin.

Alternativ können andere makrozyklische Rezeptoren als Bindungsmotive für NOPs eingesetzt werden. So könnten anionische Calixarenderivate potentiell an unter physiologischen Bedingungen protonierte und damit positiv geladene VX-Moleküle binden (Abb. 6.1).^[177] Solche Scavenger sollen in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden, wobei deren Toxizität eine größere Unsicherheit darstellt als die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Cyclodextrinderivate.

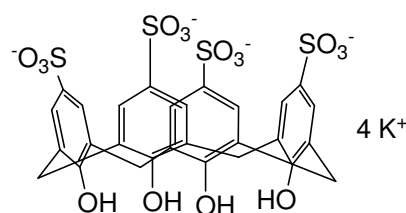


Abb. 6.1: Calixaren mit Sulfonatgruppen

7. Experimentelles

7.1 Apparatives

NMR-Spektroskopie	Bruker Avance 600 ($^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 151 MHz)
	Bruker Avance DRX 400 ($^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 101 MHz)
	Bruker Avance DRX 200 ($^1\text{H-NMR}$: 200 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 50 MHz)

Die chemische Verschiebung wurde auf die Signale der Restprotonen des verwendeten, deuterierten Lösungsmittels normiert:

$$^1\text{H}: \delta (\text{CDCl}_3) = 7.26; \delta (d_6\text{-DMSO}) = 2.50, \delta (D_2O) = 4.79$$

$$^{13}\text{C}: \delta (\text{CDCl}_3) = 77.16; \delta (d_6\text{-DMSO}) = 39.52.$$

Abkürzungen: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, m = Multiplett, br = breites Signal

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wurden nach Möglichkeit alle Signale zugeordnet. Auf Grund von breiten Multipletts war es jedoch in manchen Fällen nicht möglich, eindeutige Zuordnungen zu finden.

C,H,N,S-Analyse	Elementar vario Micro cube
Schmelzpunktbestimmung	Müller SPM-X 300
Massenspektrometrie	Bruker Ultraflex TOF/TOF (MALDI/TOF) Bruker Quadrupol-MS: Esquire 3000
IR-Spektroskopie	FT-IR-System Spectrum BX, Perkin-Elmer FT-IR-ATR Spektrum 100, Perkin-Elmer
HPLC	Dionex, P680 Pumpe, ASI-100 Autosampler, TCC-100 Säulenofen, UVD 170U UV/Vis-Detektor, Chromeleon V 6.7
Semipräparative HPLC	Dionex, Ultimate 3000, Chromeleon V 6.8
HPLC-Säulen	Thermo Scientific, BetaBasic-18, 5 μm Partikelgröße, 250mm Länge, 4.6 mm (analytisch) und 21.2 mm (semipräparativ) Durchmesser
Dünnschichtchromatografie	Merck KGaA, DC Kieselgel 60 F ₂₅₄
Säulenchromatographie	Sigma-Aldrich, Silica Gel 60 (70-230 Mesh)

7.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von namhaften Herstellern bezogen und wurden, wenn nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. α -, β - und γ -Cyclodextrin wurden von der Firma Wacker Chemicals zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden, falls nötig, nach Standardmethoden getrocknet.

7.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

7.3.1 HPLC-Methoden

Für die Aufreinigung der dargestellten Cyclodextrinderivate wurden zwei unterschiedliche HPLC-Methoden verwendet, die im Folgenden als Methode A und Methode B bezeichnet werden. Methode A wurde für eher unpolare Verbindungen benutzt während Methode B für polare und geladene Verbindungen verwendet wurde. Bei Verbindungen, die ein Pyridiniumkation enthalten, wurde zur wässrigen Phase des Laufmittels 0.1 % einer 25 %-igen Ammoniaklösung gegeben. Das Lösungsmittel der produktenthaltenden Fraktionen wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Lösungsmittel (Wasser oder DMF) aufgenommen, über einen 0.2 μm Spritzenvorfilter filtriert und durch Eintropfen der Lösung in Aceton ausgefällt. Nach Abfiltrieren des Produktes wurde dieses im Hochvakuum getrocknet.

Methode A:

0–6 min, 0 % organischer Anteil; 6–27 min, linearer Anstieg der organischen Phase auf 40 %; 27–33 min, 40 % organischer Anteil; 33–39 min, linearer Abfall des organischen Anteils auf 0 %; 39–45 min, 0 % organischer Anteil.

Methode B:

0–6 min, 0 % organischer Anteil; 6–22 min, linearer Anstieg der organischen Phase auf 15 %; 22–25 min, linearer Anstieg der organischen Phase auf 50 %; 25–30 min, 50 % organischer Anteil; 30–37 min, linearer Abfall des organischen Anteils auf 0 %; 37–45 min, 0 % organischer Anteil.

7.3.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur CuAAC-Reaktion

Das entsprechende Azid (300 mg für **42**, **51**, **52** und **53**; 200 mg für **44** und **56**) wurde unter N_2 -Atmosphäre in einer Ethanol/Wasser-Mischung (10 ml, 1:1 (v/v); für **42**, **44** und **56**) oder DMSO-Wasser-Mischung (10 ml, 4:1 (v/v); für **51**, **52** und **53**) gelöst. Dazu wurden nacheinander Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (0.01 eq. pro Azidgruppe), Natriumascorbat (0.04 eq. pro Azidgruppe), TBTA (0.01 eq. pro Azidgruppe) und das entsprechende Alkin (1.2 eq. pro Azidgruppe) gegeben und die Reaktionsmischung, wenn nicht anders angegeben, für 1-3 d bei 25 °C gerührt. Nach kompletter Umsetzung wurde die Reaktionsmischung entweder einkondensiert (**56**) oder in Aceton gegossen (**42**, **44**, **51**, **52**

und **53**) und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Die Rohprodukte wurden dann mittels semipräparativer HPLC mit einer der oben genannten Methoden aufgereinigt.

7.3.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Sonogashira-Hagihara-Reaktion

Das entsprechende Arylbromid (3.00 mmol) wurde unter N₂-Atmosphäre in frisch destilliertem Triethylamin (10 ml) gelöst. Kupfer(I)iodid (57.1 mg, 300 µmol), Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid (84.2 mg, 120 µmol) und Bis[(2-diphenylphosphino)phenyl]ether (64.6 mg, 120 µmol) wurden zugegeben und die Reaktionsmischung für 30 min bei 25 °C gerührt. Dann wurde Trimethylsilylacetylen (354 mg, 498 µl, 3.60 mmol) über einen Zeitraum von 15 min zugetropft und die Reaktionsmischung für 18 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt.

7.4 Synthesen

7.4.1 Literaturbekannte Cyclodextrinderivate

Folgende Scavengermoleküle wurden analog zu der angegebenen Literatur hergestellt:

β1₁^[141], **β1₇**^[146], **β10₁**^[142], **α11₆**^[115], **β11₁**^[110], **β11₇**^[98], **β15₁**^[142], **β15₇**^[142], **β17₁**^[143].

7.4.2 Im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierte Scavenger

In den angehängten Publikationen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, sind bereits die Synthesen einiger der im Kapitel 3 vorgestellten Verbindungen beschrieben.

Im Experimentellen Teil der Veröffentlichung in *Beil. J. Org. Chem.* wurden folgende Verbindungen beschrieben: **β18₁**, **β19₁**, **β20₁**, **β21₁**, **β22₁**, **β23₁**, **β24₁**, **β25₁**, **β26₁** sowie die entsprechenden Vorstufen **18**, **19**, **20**, **21**, **22**, **23**, **24**, **25** und **26**.

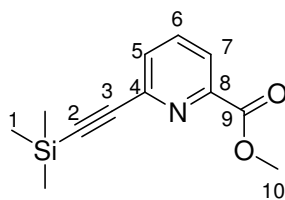
Im Experimentellen Teil der Veröffentlichung in *Toxicology* wurden folgende Verbindungen beschrieben: **G19₁**, **G21₁** und **β23₂**.

Im Experimentellen Teil der Veröffentlichung in *Chem. Commun.* wurden folgende Verbindungen beschrieben: **β28₁**, **β28₂**, **β28₇**, **α28₆**, **γ28₈**, **G28₁**, **β29₁**, **β29₂**, **β29₇**, **G29₁**, **β30₁**, **β31₁**, **β32₁** sowie die Vorstufen **29**, **30**, **31** und **32**.

7.4.3 Synthese der Vorstufen

Methyl-6-(2-(trimethylsilyl)ethinyl)picolinat (**84**)^[178]

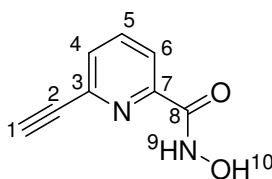
Methyl-6-brompicolinat wurde analog zu der unter 7.3.3 beschriebenen Arbeitsvorschrift umgesetzt. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte mit Ethylacetat/n-Hexan (1:2 (v/v)) als Eluens.



Ausbeute: 561 mg (2.40 mmol, 80 %), beiger Feststoff; Schmelzpunkt: 64-65 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.27 (s, 9 H, H^1), 3.89 (s, 3 H, H^{11}), 7.76-7.79 (m, 1 H, H^5), 7.99-8.05 (m, 2 H, $\text{H}^{6,7}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.00 (C^1), 53.0 (C^{10}), 95.5 (C^2), 103.8 (C^3), 125.0 (C^7), 130.9 (C^5), 138.9 (C^6), 142.3 (C^4), 148.2 (C^8), 165.0 (C^9); IR (cm^{-1}) 1741, 2167; MS (ESI, positiv) m/z = 234.1 (100 %, $\text{M}+\text{H}^+$), 272.0 (44 %, $\text{M}+\text{K}^+$); Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{Si}$: C 61.77, H 6.48, N 6.00; gefunden C 61.69, H 6.59, N 5.95.

6-Ethynyl-N-hydroxypicolinamid (36)

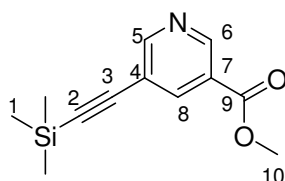
Methyl-6-(2-(trimethylsilyl)ethynyl)picolinat **84** (317 mg, 1.36 mmol) wurde in MeOH (20 mL) gelöst und zu einer Lösung aus $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (945 mg, 13.6 mmol) und NaOMe (1.47 g, 27.2 mmol) in MeOH (70 mL) bei 0 °C gegeben. Nach 20 min wurde mit HCl (0.1 M) neutralisiert, das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand mit CHCl_3 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde aus EtOAc umkristallisiert.



Ausbeute: 170 mg (1.05 mmol, 77 %), orange Kristalle; Schmelzpunkt: 172-174 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.44 (s, 1 H, H^1), 7.70-7.73 (m, 1 H, H^4), 7.95-8.01 (m, 2 H, $\text{H}^{5,6}$), 9.15 (s, 1 H, H^9), 11.4 (s, 1 H, H^{10}); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 81.2 (C^1), 82.5 (C^2), 121.9 (C^6), 129.7 (C^4), 138.3 (C^5), 140.6 (C^3), 150.6 (C^7), 160.8 (C^8); IR (cm^{-1}) 2111; MS (ESI, positiv) m/z (%) 185.1 (100 %, $\text{M}+\text{Na}^+$); Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ (M.W.: 162.15): C 59.26, H 3.73, N 17.28; gefunden: C 59.23, H 3.84, N 17.23.

Methyl-5-(3-(trimethylsilyl)ethynyl)nicotinat (85)^[179]

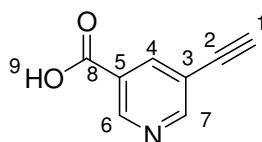
Methyl-5-bromnicotinat wurde analog zu der unter 7.3.3 beschriebenen Arbeitsvorschrift umgesetzt. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte mit Ethylacetat/n-Hexan (1:2 v/v) als Eluens.



Ausbeute: 601 mg (2.58 mmol, 86 %), gelber Feststoff; Schmelzpunkt: 45-47 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.25 (s, 9 H, H^1), 3.89 (s, 3 H, H^{10}), 8.23 (t, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.1$ Hz, H^8), 8.85 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 1.9$ Hz, H^5), 9.01 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 1.8$ Hz, H^6); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 0.00 (C^1), 53.0 (C^{10}), 99.9 (C^2), 100.8 (C^3), 119.7 (C^4), 125.7 (C^5), 139.5 (C^8), 149.6 (C^6), 155.7 (C^7), 164.8 (C^9); IR (cm^{-1}) 1727, 2160; MS (ESI, positiv) m/z (%) 234.1 (100 %, $\text{M}+\text{H}^+$); Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{Si}$ (M.W.: 233.34): C 61.77, H 6.48, N 6.00; gefunden C 61.73, H 6.53, N 6.07.

5-Ethynyl-nicotinsäure (**86**)^[179]

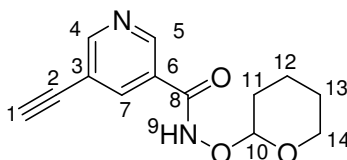
Methyl-5-(2-(trimethylsilyl)ethynyl)nicotinat (**85**) (500 mg, 2.15 mmol) wurde in NaOH (25 mL, 0.1 M) gegeben und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit EtOAc gewaschen und mit KHSO_4 angesäuert (pH 3). Der ausgefallene Feststoff wurde mit EtOAc extrahiert und die organische Phase mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingengt.



Ausbeute: 225 mg (1.53 mmol, 71 %), weißer Feststoff. Die spektroskopischen Daten entsprachen den Literaturwerten.^[180]

5-Ethynyl-N-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)nicotinamid (**87**)

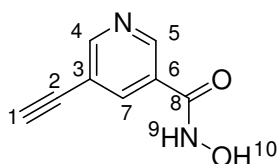
5-Ethynyl-nicotinsäure **86** (225 mg, 1.53 mmol) und NH_2OTHP (197 mg, 1.68 mmol) wurden in EtOAc (11 mL) gelöst. Eine Lösung von DCC (347 mg, 1.68 mmol) in EtOAc (5 ml) wurde tropfenweise bei 0 °C zur Reaktionslösung gegeben. Nach 3 h wurde das Reaktionsgemisch filtriert, das Filtrat eingengt und der Rückstand über Kieselgel mit EtOAc/n-Hexan (4:1 v/v) als Eluens gereinigt.



Ausbeute: 255 mg (1.04 mmol, 68 %), weißer Feststoff; Schmelzpunkt: 107-108 °C; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.56-1.72 (m, 6 H, $\text{H}^{11, 12, 13}$), 3.53-4.04 (m, 2 H, H^{14}), 4.56 (s, 1 H, H^1), 5.02 (s, 1 H, H^{10}), 8.19 (t, 1 H, $J(\text{H,H}) = 1.8$ Hz, H^7), 7.82 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.0$ Hz, H^4), 8.89 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.0$ Hz, H^5), 11.9 (s, 1 H, H^9); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 18.7 (C^{12}), 25.1 (C^{13}), 28.3 (C^{11}), 61.9 (C^{14}), 80.1 (C^2), 85.6 (C^1), 101.6 (C^{10}), 118.9 (C^3), 128.2 (C^6), 137.9 (C^7), 148.3 (C^4), 154.7 (C^5), 162.1 (C^8); IR (cm^{-1}) 2114; MS (ESI, positiv) m/z (%) 247.1 (100 %, $\text{M}+\text{H}^+$); Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$: C 63.40, H 5.73, N 11.38; gefunden C 63.34, H 5.88, N 11.30.

5-Ethynyl-N-hydroxynicotinamid (37)

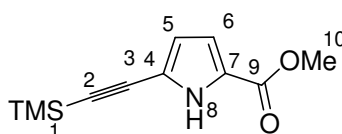
Zu 5-Ethynyl-N-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)nicotinamid **87** (237 mg, 962 μmol) in MeOH (30 mL) wurde bei 0 °C tropfenweise TFA (11.0 mg, 96.2 μmol) hinzugegeben und 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die Lösung wurde mit gesättigter NaHCO_3 und NaCl-Lösung gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt aus EtOAc umkristallisiert.



Ausbeute: 104 mg (641 μmol , 67 %), weißer Feststoff; Schmelzpunkt: 165-166 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.56 (s, 1 H, H^1), 8.17 (t, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.0$ Hz, H^7), 8.80 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.0$ Hz, H^4), 8.89 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.0$ Hz, H^5), 9.33 (s, 1 H, H^9) 11.5 (s, 1 H, H^{10}); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 79.7 (C^2), 84.9 (C^1), 118.5 (C^3), 128.1 (C^6), 137.1 (C^7), 147.5 (C^4), 153.9 (C^5), 161.5 (C^8); IR (cm^{-1}) 2110; MS (ESI, positiv) m/z (%) 163.1 (100 %, $\text{M}+\text{H}^+$); Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$: C 59.26, H 3.73, N 17.28; gefunden C 59.08, H 3.97, N 17.25.

Methyl-5-(2-(trimethylsilyl)ethynyl)-1H-pyrrol-2-carboxylat (91)

Methyl-5-bromo-1H-pyrrol-2-carboxylat^[137] wurde analog zu der unter 7.3.3 beschriebenen Arbeitsvorschrift umgesetzt. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte mit Diethylether/Pentan (1:6 v/v) als Eluens.

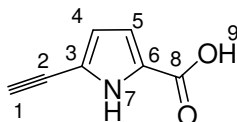


Ausbeute: 635 mg (2.87 mmol, 80 %), farbloser Feststoff; Schmelzpunkt 118-120 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ 0.24 (s, 9 H, H^1), 3.86 (s, 3 H, H^{10}), 6.44 (dd, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.6$ Hz, $J(\text{H,H}) = 3.2$ Hz, H^6), 6.81 (dd, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.5$ Hz, $J(\text{H,H}) = 3.8$ Hz, H^5), 9.32 (s, 1 H, H^8); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz) δ -0.1 (C^1), 51.8 (C^{10}), 95.8 (C^2), 98.1 (C^3), 115.5 (C^5), 116.6 (C^4), 117.8 (C^6), 123.2 (C^7), 160.8 (C^9); IR-ATR (cm^{-1}) 2153; MS (ESI, positiv) m/z (%) 221.7 (8 %, $\text{M}+\text{H}^+$), 243.7 (100 %, $\text{M}+\text{Na}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{Si}$: C 59.69, H 6.83, N 6.33; gefunden C 59.65, H 6.86, N 6.33.

5-Ethynyl-1H-pyrrol-2-carbonsäure (92)

Methyl-5-(2-(trimethylsilyl)ethynyl)-1H-pyrrol-2-carboxylat (**91**) (664 mg, 3.00 mmol) wurde in MeOH/ H_2O (1:1 (v/v), 20 ml) gelöst. Nach Zugabe von NaOH (240 mg, 6.00 mmol) wurde

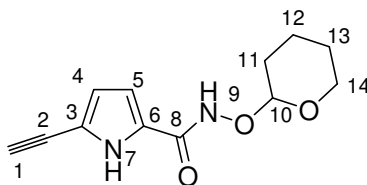
für 2 d bei 25 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf die Hälfte eingeeengt, mit HCl (1 N) auf pH 2 eingestellt und mit Chloroform (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingeeengt, wobei das Produkt analysenrein erhalten wurde.



Ausbeute: 286 mg (2.12 mmol, 71 %), farbloser Feststoff; Schmelzpunkt 148-150 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ 4.30 (s, 1 H, H¹), 6.40 (dd, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.3$ Hz, $J(\text{H,H}) = 3.7$ Hz, H⁵), 6.68 (dd, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.5$ Hz, $J(\text{H,H}) = 3.7$ Hz, H⁴), 12.34 (s, 1 H, H⁹), 12.54 (s, 1 H, H⁷); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz) δ 76.1 (C¹), 82.7 (C²), 114.8 (C⁴), 115.7 (C³), 116.2 (C⁵), 124.4 (C⁶), 161.1 (C⁸); IR-ATR (cm⁻¹) 2113; MS (ESI, positiv) m/z (%) 135.8 (75 %, M+H⁺), 157.7 (100 %, M+Na⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₇H₅NO₂: C 62.22, H 3.73, N 10.37; gefunden C 62.01, H 3.87, N 10.33.

5-Ethynyl-N-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-1H-pyrrol-2-carboxamid (93)

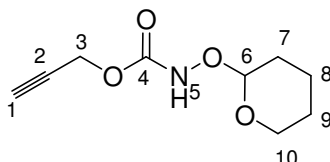
5-Ethynyl-1H-pyrrol-2-carbonsäure (92) (218 mg, 1.61 mmol) wurde mit THP-Hydroxylamin^[129] (208 mg, 1.77 mmol) in Dichlormethan (10 ml) gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Dazu wurde langsam eine Lösung von DCC (366 mg, 1.77 mmol) in Dichlormethan (10 ml) getropft. Nach 2 h wurde der ausgefallene Feststoff abfiltriert, das Filtrat zur Trockene eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel mit Ethylacetat/Hexan (2:3 (v/v)) als Eluens aufgereinigt.



Ausbeute: 216 mg (922 μmol , 57 %), farbloser Feststoff; Schmelzpunkt 159-160 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ 1.53 (s, 3 H, H^{12,13}), 1.70 (s, 3 H, H^{11,12}), 3.48-3.54 (m, 1 H, H¹⁴), 3.98-4.09 (m, 1 H, H¹⁴), 4.27 (s, 1 H, H¹), 4.92 (s, 1 H, H¹⁰), 6.38 (dd, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.3$ Hz, $J(\text{H,H}) = 3.7$ Hz, H⁵), 6.70 (dd, 1 H, $J(\text{H,H}) = 2.5$ Hz, $J(\text{H,H}) = 3.6$ Hz, H⁴), 11.29 (s, 1 H, H⁹), 12.18 (s, 1 H, H⁷); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz) δ 18.4 (C¹²), 24.7 (C¹³), 27.9 (C¹¹), 61.5 (C¹⁴), 76.2 (C¹), 82.6 (C²), 101.4 (C¹⁰), 110.8 (C⁴), 115.0 (C³), 115.3 (C⁵), 124.8 (C⁶), 158.3 (C⁸); IR-ATR (cm⁻¹) 2108; MS (ESI, positiv) m/z (%) 234.7 (21 %, M+H⁺), 256.7 (65 %, M+Na⁺), 272.7 (100 %, M+K⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₁₂H₁₄N₂O₃: C 61.53, H 6.02, N 11.96; gefunden C 61.32, H 6.15, N 11.90.

Prop-2-inyltetrahydro-2H-pyran-2-yloxy-carbamat (97)

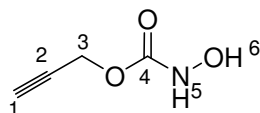
Perfluorophenyl-prop-2-inylcarbonat (**96**)^[139] (1.06 g, 4.00 mmol) wurde in Dichlormethan (20 ml) gelöst und bei 0 °C mit NH₂-OTHP^[129] (469 mg, 4.00 mmol) versetzt. Nach 18 h Rühren bei 25 °C wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Diethylether/Pentan (3:7 (v/v)) als Eluens aufgereinigt.



Ausbeute: 753 mg (3.78 mmol, 95 %), farbloses Öl; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) δ 1.50-1.63 (m, 6 H, H^{7, 8, 9}), 3.34-3.54 (m, 3 H, H^{1, 10}), 3.83-3.96 (m, 1 H, H¹⁰), 4.69 (s, 1 H, H³), 4.78 (s, 1 H, H⁶), 10.56 (s, 1 H, H⁵); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz) δ 18.3 (C⁷), 24.7 (C⁸), 27.8 (C⁹), 52.1 (C³), 61.2 (C¹⁰), 77.6 (C¹), 78.8 (C²), 101.1 (C⁶), 155.6 (C⁴); IR-ATR (cm⁻¹) 2128; MS (ESI, positiv) *m/z* (%) 221.7 (42 %, M+Na⁺), 420.7 (100 %, M+M+Na⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₉H₁₃NO₄: C 54.26, H 6.58, N 7.03; gefunden C 54.16, H 6.39, N 7.10.

Prop-2-inyl-hydroxycarbamat (27)

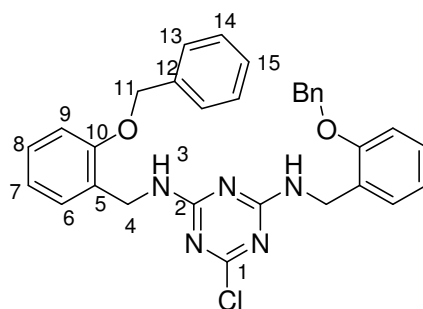
Prop-2-inyltetrahydro-2H-pyran-2-yloxy-carbamat (**97**) (630 mg, 3.16 mmol) wurde in Methanol (20 ml) gelöst und nach Zugabe von *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (50 mg) 4 h lang bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Hexan (1:3 (v/v)) als Eluens aufgereinigt.



Ausbeute: 247 mg (2.15 mmol, 68 %), farbloses Öl; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz) δ 3.51 (t, 1 H, *J*(H,H) = 2.4 Hz, H¹), 4.65 (d, 1 H, *J*(H,H) = 2.4 Hz, H³), 8.84 (s, 1 H, H⁵), 9.83 (s, 1 H, H⁶); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz) δ 51.7 (C³), 77.4 (C¹), 79.1 (C²), 156.7 (C⁴); IR-ATR (cm⁻¹) 2130; MS (ESI, positiv) *m/z* (%) 137.8 (100 %, M+Na⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₄H₅NO₃: C 41.74, H 4.38, N 12.17; gefunden C 41.73, H 4.67, N 11.95.

Bis-*N*²,*N*⁴-(2-(benzyloxy)benzyl)-6-chloro-1,3,5-triazin-2,4-diamin (59)

Cyanurchlorid (184 mg, 1 mmol, 1 eq.) wurde in Aceton (4 ml) gelöst und in Eiswasser (9 ml) gegeben. Hierzu wurde eine Lösung von 2-(Benzyloxy)phenylmethanamin (426 mg, 2 mmol) in Aceton (2 ml) und eine Lösung von Natriumhydrogencarbonat (168 mg, 2 mmol) in Wasser (3 ml) getropft und für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach anschließendem Erhitzen auf 50 °C für 2 h wurde auf 25 °C abgekühlt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch auf einer Kieselgelsäule mit Pentan und Ethylacetat als Eluens (zuerst 4:1 Pentan/Ethylacetat (v/v), dann reines Ethylacetat) aufgereinigt.



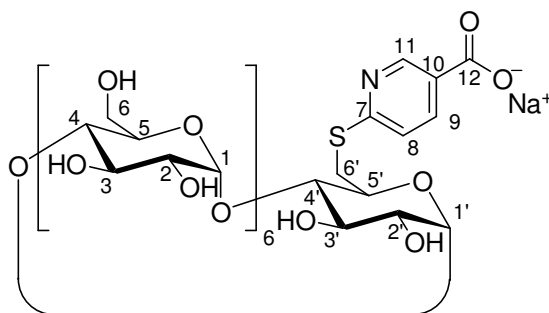
Ausbeute: 187 mg (348 μmol , 35 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 4.54-4.56 (m, 4 H, H^4), 5.14 (s, 4 H, H^{11}), 6.86-7.45 (m, 18 H, $\text{H}^{6, 7, 8, 9, 13, 14, 15}$).

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum weist auf eine Verunreinigung hin, die nicht abgetrennt werden konnte. Daher wurde Verbindung **59** nicht analysenrein weiter umgesetzt.

7.4.4 Synthese der Scavenger

6-(3-Carboxyphenylsulfanyl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (β2_1)

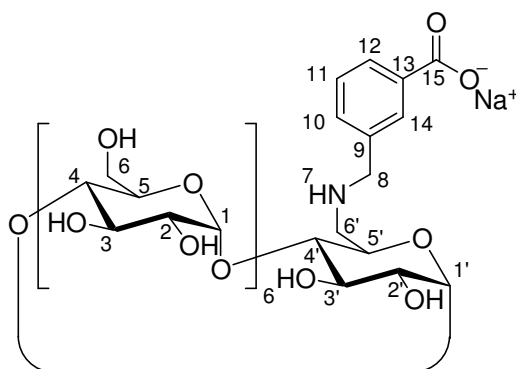
6-(*p*-Tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin (**40**)^[93] (0.50 g, 388 μmol), 6-Mercaptonicotinsäure (301 mg, 1.94 mmol) und Triethylamin (588 mg, 806 μl , 5.82 mmol) wurden in DMF (5 ml) gelöst und für 3 d unter N_2 -Atmosphäre bei 70 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Aceton gegossen, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß Methode A, die unter 7.3.1 beschrieben ist.



Ausbeute: 80.0 mg (62.9 μmol , 16 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 3.18-3.45 (m, 13 H, $\text{H}^{4, 4', 6, 6'}$), 3.49-4.21 (m, 29 H, $\text{H}^{2, 2', 3, 3', 5, 5', 6}$), 4.47-4.61 (m, 5 H, H_{OH}^6), 4.81-4.85 (m, 7 H, $\text{H}^{1, 1'}$), 4.93 (s, 1 H, H_{OH}^6), 5.61-5.90 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2, 2', 3, 3'}$), 7.35 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 8.2 \text{ Hz}$, H^8), 8.00 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 8.2 \text{ Hz}$, H^9), 8.73 (s, 1 H, H^{11}); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 101 MHz) δ 59.2-60.8 ($\text{C}^{6, 6'}$), 71.5-73.4 ($\text{C}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 81.0-81.6 ($\text{C}^{4, 4'}$), 101.7-102.2 ($\text{C}^{1, 1'}$), 136.9 (C^9), 149.8 (C^{11}) Auf Grund des schlechten Signal zu Rausch-Verhältnis wurden nicht alle Signale im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum aufgelöst; MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1272.4 (20 %, $\text{M}+\text{H}^+$), 1294.4 (100 %, $\text{M}+\text{Na}^+$), 1310.4 (13 %, $\text{M}+\text{K}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{NO}_{36}\text{SNa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$: C 42.76, H 5.83, N 1.04, S 2.38; gefunden C 42.66, H 6.21, N 1.26, S 2.13.

6-(3-Carboxybenzylamino)-6-deoxy- β -cyclodextrin ($\beta 3_1$)

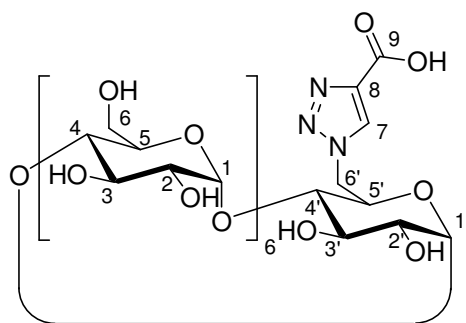
6-(*p*-Tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin (**40**)^[93] (0.50 g, 388 μ mol) und Methyl-(3-aminomethyl)-benzoat (**63**)^[124] (192 mg, 1.16 mmol) wurden in DMF (5 ml) gelöst und für 3 d unter einer N₂-Atmosphäre bei 70 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Aceton gegossen, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das erhaltene Zwischenprodukt **$\beta 63_1$** (450 mg, 351 μ mol) wurde in DMF (3 ml) und Wasser (1.25 ml) gelöst. Nach Zugabe von Natriumhydroxidlösung (1N, 1.75 ml) wurde 18 h lang bei 25 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Aceton gegeben und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Das Rohprodukt wurde nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode A aufgereinigt.



Ausbeute: 49 mg (38.6 μ mol, 11 %), farbloser Feststoff; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.72-2.77 (m, 1 H, H^{6'}), 2.87-2.90 (m, 1 H, H^{6'}), 3.31-3.49 (m, 13 H, H^{4, 4', 6}), 3.55-3.78 (m, 29 H, H^{2, 2', 3, 3', 5, 5', 6, 8}), 4.45-4.48 (m, 6 H, H_{OH}⁶), 4.83 (s, 7 H, H^{1, 1'}), 5.70-5.77 (m, 14 H, H_{OH}^{2, 2', 3, 3'}), 5.86 (m, 1 H, *J*(H,H) = 5.8 Hz, H⁷), 7.34 (t, 1 H, *J*(H,H) = 7.6 Hz, H¹¹), 7.46 (d, 1 H, *J*(H,H) = 6.4 Hz, H¹⁰), 7.75 (d, 1 H, *J*(H,H) = 7.7 Hz, H¹²), 7.90 (s, 1 H, H¹⁴); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz) δ 59.9 (C⁶), 72.1-73.1 (C^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}), 81.6 (C^{4, 4'}), 102.0 (C^{1, 1'}) Auf Grund des schlechten Signal zu Rausch-Verhältnis wurden nicht alle Signale im ¹³C-NMR-Spektrum aufgelöst; MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 1268.8 (100 %, M+H⁺), 1290.8 (33 %, M+Na⁺), 1306.8 (7 %, M+K⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₅₀H₇₆NO₃₆Na · 5 H₂O: C 43.51, H 6.28, N 1.01; gefunden C 43.45, H 6.44, N 0.60.

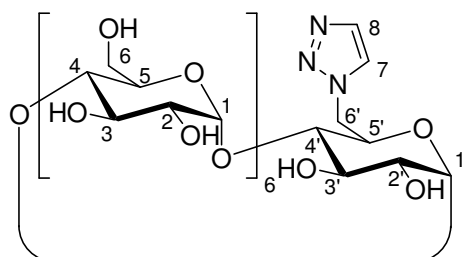
6-(4-Carboxy-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin ($\beta 4_1$)

Propargylsäure wurde mit **42**^[109] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



Ausbeute: 70.3 mg (57.2 μmol , 22 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$: (D_2O , 400 MHz) δ 2.77-2.80 (m, 1 H, $\text{H}^{6'}$), 3.15-3.18 (m, 1 H, $\text{H}^{6'}$), 3.45-3.74 (m, 16 H, $\text{H}^{2, 4, 6}$), 3.80-4.05 (m, 22 H, $\text{H}^{3, 5, 6}$), 4.18-4.23 (m, 1 H), 4.60-4.66 (m, 1 H), 4.96-5.18 (m, 7 H, $\text{H}^{1, 1'}$), 8.26 (s, 1 H, H^7); $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 101 MHz) δ 52.1 ($\text{C}^{6'}$), 59.7-61.2 (C^6), 71.4-73.9 ($\text{C}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 81.3-83.9 ($\text{C}^{4, 4'}$), 102.1-102.9 ($\text{C}^{1, 1'}$), 129.5 (C^7), 145.5 (C^8), 168.0 (C^9); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1228.5 (100 %, $\text{M}+\text{H}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_{36} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$: C 42.09, H 6.04, N 3.27 gefunden: C 41.76, H 6.28, N 3.57.

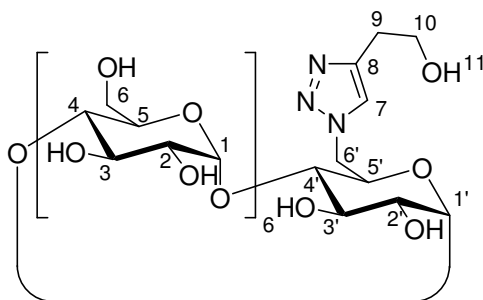
Bei der Aufreinigung wurde als Nebenprodukt 6-(1H-1,2,3-Triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (**$\beta 16_1$**) isoliert, das ebenfalls vollständig charakterisiert wurde.



Ausbeute: 151 mg (127 μmol , 49 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz) δ 2.82-2.84 (d, 1 H, $J(\text{H},\text{H}) = 11.04$, $\text{H}^{6'}$), 3.17-3.19 (d, 1 H, $J(\text{H},\text{H}) = 12.2$ Hz, $\text{H}^{6'}$), 3.50-3.68 (m, 14 H, $\text{H}^{2, 4}$), 3.70-4.05 (m, 24 H, $\text{H}^{3, 5, 6}$), 4.20-4.23 (m, 1 H), 4.65-4.69 (m, 1 H), 4.98-5.20 (m, 7 H, $\text{H}^{1, 1'}$), 7.84 (s, 1 H, H^7), 8.04 (s, 1 H, H^8); $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 101 MHz) δ 51.0 ($\text{C}^{6'}$), 59.1-60.3 (C^6), 70.6-73.0 ($\text{C}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 80.6-83.0 ($\text{C}^{4, 4'}$), 101.3-102.0 ($\text{C}^{1, 1'}$), 127.1 (C^8), 133.8 (C^9); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1186.6 (100 %, $\text{M}+\text{H}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{44}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_{34} \cdot 3 \text{H}_2\text{O} \cdot 0.5 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: C 43.06, H 6.35, N 3.31 gefunden: C 43.11, H 6.39, N 3.43.

6-(4-(2-Hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (**$\beta 5_1$**)^[181]

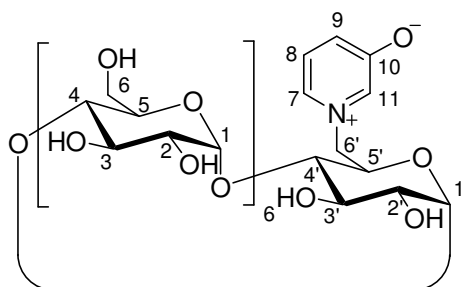
1-Butinol wurde mit **42**^[109] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode A aufgereinigt.



Ausbeute: 152 mg (40.3 μmol , 25 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 2.70 (t, 2 H, $J(H,H) = 7.0$, H^9), 2.77-2.80 (m, 1 H, $\text{H}^{6'}$), 2.99-3.02 (m, 1 H, $\text{H}^{6'}$), 3.25-3.35 (br, unter H_2O , 20 H, $\text{H}^{2,4,6}$), 3.51-3.62 (m, 20 H, $\text{H}^{3,5,6,10}$), 3.91-3.96 (m, 1 H), 4.29 (br, 1 H), 4.39-4.45 (m, 6 H, H_{OH}^6), 4.70-4.98 (m, 7 H, H^1), 4.97-4.98 (m, 1 H, H^{11}), 5.70 (br, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2,2',3,3'}$), 7.77 (s, 1 H, H^7); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 101 MHz) δ 29.2 (C^9), 50.4 ($\text{C}^{6'}$), 58.9 (C^{10}), 59.9-60.4 (C^6), 70.3-73.3 ($\text{C}^{2,2',3,3',5,5'}$), 80.7-83.7 ($\text{C}^{4,4'}$), 101.2-102.3 ($\text{C}^{1,1'}$), 123.3 (C^7), 144.8 (C^8); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1230.5 (8 %, $\text{M}+\text{H}^+$), 1252.5 (100 %, $\text{M}+\text{Na}^+$), 1268.5 (59 %, $\text{M}+\text{K}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{46}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_{35} \cdot 3 \text{H}_2\text{O} \cdot 1 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: C 43.85, H 6.53, N 3.13 gefunden: C 43.60, H 6.47, N 3.41.

6-(3-Oxidopyridinium-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (β_1)

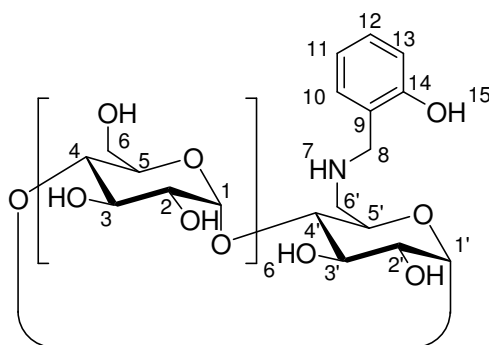
6-(*p*-Tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin (**40**)^[93] (500 mg, 388 μmol) wurde in trockenem DMF (5 ml) gelöst, mit 3-Hydroxypyridin (369 mg, 3,88 mmol) versetzt und bei 80 °C für 10 d unter einer N_2 -Atmosphäre gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Aceton gegossen, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß Methode B, die unter 7.3.1 beschrieben ist.



Ausbeute: 201 mg (166 μmol , 43 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz) δ 2.72 (d, 1 H, $J(H,H) = 11.1$ Hz, $\text{H}^{6'}$), 3.03 (d, 1 H, $J(H,H) = 11.6$ Hz, $\text{H}^{6'}$), 3.41-3.69 (m, 20 H, $\text{H}^{4,5,6}$), 3.75-4.04 (m, 18 H, $\text{H}^{2,3,6}$), 4.21 (t, 1 H, $J(H,H) = 9.7$ Hz), 4.39 (t, 1 H, $J(H,H) = 10.8$ Hz), 4.92-5.13 (m, 7 H, $\text{H}^{1,1'}$), 7.46 (d, 1 H, $J(H,H) = 8.8$ Hz, H^9), 7.53-7.56 (m, 1 H, H^8), 7.73 (s, 1 H, H^{11}) 7.76 (d, 1 H, $J(H,H) = 5.3$ Hz, H^7); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 101 MHz) δ 38.9 ($\text{C}^{6'}$), 59.1-61.5 (C^6), 70.9-73.1 ($\text{C}^{2,2',3,3',5,5'}$), 80.5-83.3 ($\text{C}^{4,4'}$), 101.2-102.1 ($\text{C}^{1,1'}$), 127.6 (C^8), 129.3 (C^7), 134.4 (C^{11}), 134.6 (C^9), 166.6 (C^{10}); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1213.0 (100 %, $\text{M}+\text{H}^+$), 1235.0 (27 %, $\text{M}+\text{Na}^+$), 1251.1 (11 %, $\text{M}+\text{K}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{47}\text{H}_{73}\text{NO}_{35} \cdot 3 \text{H}_2\text{O} \cdot 1 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: C 45.35, H 6.47, N 1.06; gefunden C 45.30, H 6.49, N 1.08.

6-(2-Hydroxybenzylamino)-6-deoxy- β -cyclodextrin ($\beta 7_1$)

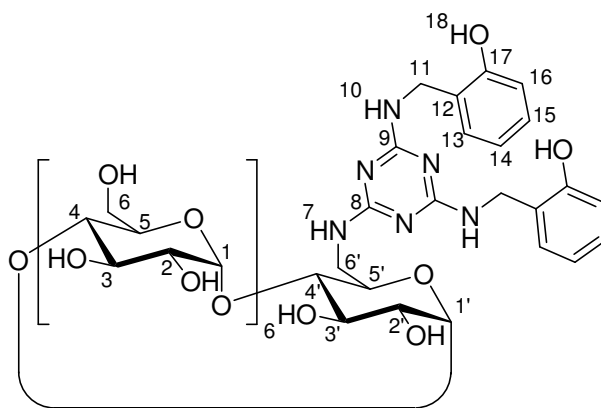
6-(*p*-Tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin (**40**)^[93] (0.50 g, 388 μ mol) und 2-(Benzyloxy)phenylmethanamin (**58**)^[119] (413 mg, 1.94 mmol) wurden in DMF (5 ml) gelöst und für 3 d unter einer N₂-Atmosphäre bei 70 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Aceton gegossen, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Zwischenprodukt wurde in DMF gelöst, mit 10 % Palladium auf Aktivkohle (50 mg) versetzt und bei 25 °C und Normaldruck unter einer H₂-Atmosphäre gerührt. Nach 2 d wurde die Reaktionsmischung über Celite filtriert, die Lösung in Aceton gegeben und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Die Aufreinigung erfolgte gemäß Methode A, die unter 7.3.1 beschrieben ist.



Ausbeute: 125 mg (101 μ mol, 26 %), farbloser Feststoff; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.70-2.75 (m, 1 H, H^{6'}), 2.89-2.92 (m, 1 H, H^{6'}), 3.30-3.44 (m, 13 H, H^{4, 4', 6}, unter H₂O), 3.51-3.85 (m, 29 H, H^{2, 2', 3, 3', 5, 5', 6, 8}), 4.50 (br, 6 H, H_{OH}⁶), 4.80-4.83 (m, 7 H, H^{1, 1'}), 5.71-5.78 (m, 14 H, H_{OH}^{2, 2', 3, 3'}), 5.90 (s, 1 H, H⁷), 6.64-6.71 (m, 2 H, H^{11, 13}), 7.01-7.06 (m, 2 H, H^{10, 12}); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 48.7 (C⁸), 50.5 (C^{6'}), 59.6-60.0 (C⁶), 65.0 (C^{5, 5'}), 70.0 (C^{3, 3'}), 72.1-73.1 (C^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}), 81.2-81.7 (C⁴), 84.1 (C^{4'}), 101.8-102.4 (C^{1, 1'}), 115.3 (C¹³), 118.5 (C¹²), 124.4 (C⁹), 127.8 (C¹¹), 128.6 (C¹⁰), 157.1 (C¹⁴); MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 1240.8 (100 %, M+H⁺), 1262.8 (5 %, M+Na⁺), 1278.8 (2 %, M+K⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₄₉H₇₇NO₃₅ · 3 H₂O: C 45.48, H 6.46, N 1.08; gefunden C 45.74, H 6.56, N 1.09.

6-((4,6-Bis(2-hydroxybenzylamino)-1,3,5-triazin-2-ylamino) methyl)6-deoxy- β -cyclodextrin ($\beta 8_1$)

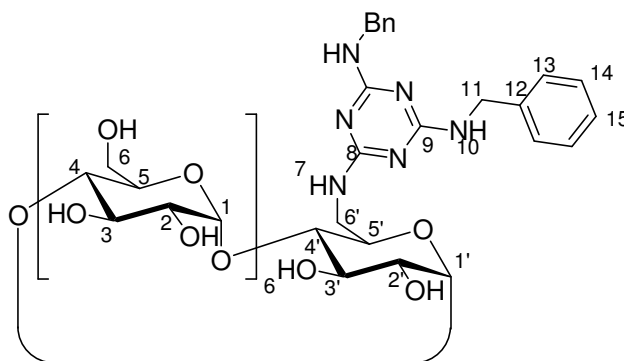
Mono-6-amino- β -cyclodextrin (442 mg, 390 μ mol) wurde in trockenem DMF (4 ml) gelöst, mit *N*²,*N*⁴-Bis(2-(benzyloxy)benzyl)-6-chloro-1,3,5-triazin-2,4-diamin (**59**) (161 mg, 300 μ mol) versetzt und bei 90 °C für 18 h unter einer N₂-Atmosphäre gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Aceton gegossen, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde in DMF aufgenommen, mit 10 % Palladium auf Aktivkohle (20 mg) versetzt und für 2 d unter einer H₂-Atmosphäre bei Normaldruck gerührt. Nach Filtration über Celite wurde das Filtrat auf Aceton gegeben, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß Methode A, die unter 7.3.1 beschrieben ist.



Ausbeute: 68.4 mg (47.0 μmol , 16 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz, 373 °K) δ 2.77-2.91 (br, unter H_2O , 6 H, H_{OH}^6), 3.33-3.45 (m, 14 H, $\text{H}^{2, 2', 4, 4'}$), 3.66-3.88 (m, 28 H, $\text{H}^{5, 5', 6, 6', 3, 3'}$), 4.41-4.46 (m, 4 H, H^{11}), 4.88-4.91 (m, 7 H, H^1), 5.17 (br, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2, 2', 3, 3'}$), 5.63 (s, 1 H, H^7), 6.35 (s, 2 H, H^{10}), 6.74 (t, 2 H, $J(\text{H},\text{H}) = 7.4$ Hz, H^{14}), 6.80 (d, 2 H, $J(\text{H},\text{H}) = 8.0$ Hz, H^{16}), 7.06 (t, 2 H, $J(\text{H},\text{H}) = 7.6$ Hz, H^{15}), 7.19 (d, 2 H, $J(\text{H},\text{H}) = 7.4$ Hz, H^{13}), 7.98 (s, 2 H, H^{18}); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 151 MHz) δ 40.8 (C^6), 59.8-60.0 (C^6), 72.1-73.2 ($\text{C}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 81.3-81.6 ($\text{C}^{4, 4'}$), 101.7-102.0 ($\text{C}^{1, 1'}$), 115.4 (C^{16}), 118.8 (C^{14}), 126.2 (C^{15}), 127.9 (C^{13}), 128.7 (C^{12}), 155.0 (C^{17}), 165.3, 165.4; MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1456.1 (100 %, $\text{M}+\text{H}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{59}\text{H}_{86}\text{N}_6\text{O}_{36} \cdot 2 \text{H}_2\text{O} \cdot 2 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: C 48.57, H 6.40, N 5.23; gefunden C 48.63, H 6.71, N 5.49.

6-((4,6-Bis(benzylamino)-1,3,5-triazin-2-ylamino)methyl)-6-deoxy- β -cyclodextrin ($\beta 9_1$)

Mono-6-amino-6-deoxy- β -cyclodextrin ($\beta 11_1$)^[107] (442 mg, 390 μmol) wurde in trockenem DMF (4 ml) gelöst, mit **9**^[120] (97.7 mg, 300 μmol) versetzt und bei 90 °C für 18 h unter einer N_2 -Atmosphäre gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Aceton gegossen, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß Methode A, die unter 7.3.1 beschrieben ist.

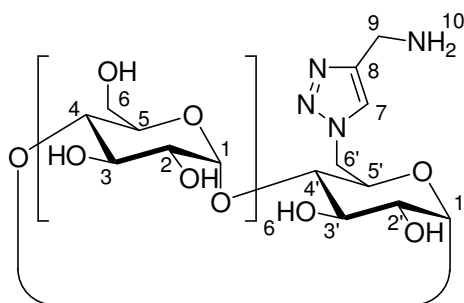


Ausbeute: 57.5 mg (40.4 μmol , 13 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz, 373 K) δ 3.26 (t, 1 H, $J(\text{H},\text{H}) = 10.2$ Hz, H^6), 3.34-3.49 (m, 15 H, $\text{H}^{2, 2', 4, 4', 6'}$), 3.58-3.93 (m, 32 H, $\text{H}_{\text{OH}}^6, \text{H}^{3, 3', 5, 5', 6}$), 4.42 (d, 2 H, $J(\text{H},\text{H}) = 15.6$ Hz, H^{11}), 4.53 (d, 2 H, $J(\text{H},\text{H}) = 15.1$ Hz, H^{11}), 4.87-4.90 (m, 7 H, $\text{H}^{1, 1'}$), 5.13-5.24 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2, 2', 3, 3'}$), 5.61 (s, 1 H, H^7), 6.34 (s, 2 H, H^{10}), 7.19-7.31 (m, 10 H, $\text{H}^{13, 14, 15}$); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 101 MHz) δ 43.1-43.4 (C^6), 59.8 (C^6), 72.1-

73.3 (C², 2', 3, 3', 5, 5'), 81.1-81.6 (C⁴, 4'), 101.6-102.5 (C¹, 1'), 126.4 (C¹⁵), 127.0 (C¹³), 127.3 (C¹²), 128.1 (C¹⁴), 140.8 (C⁸), 165.7 (C⁹); MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 1424.1 (100 %, M+H⁺), 1445.9 (3 %, M+Na⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₅₉H₈₆N₆O₃₄ · 2 H₂O: C 48.56, H 6.22, N 5.76; gefunden C 48.33, H 6.17, N 5.65.

6-((4-(Aminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-6-deoxy-β-cyclodextrin (β12₁)^[181]

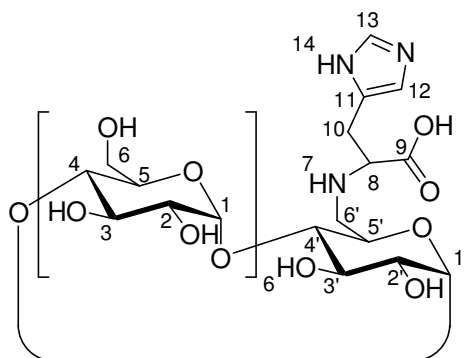
Propargylamin wurde mit **42**^[109] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



Ausbeute: 176 mg (145 μmol, 34 %), farbloser Feststoff; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.69-2.80 (m, 1 H, H^{6'}), 2.96-3.03 (m, 1 H, H^{6'}), 3.22-3.40 (m, 20 H, H^{2, 4, 6}), 3.51-3.74 (m, 20 H, H^{3, 5, 6, 9}), 3.91-3.96 (m, 1 H), 4.38 (s, 1 H), 4.44-4.59 (m, 6 H, H_{OH}⁶), 4.70-5.03 (m, 9 H, H^{1, 1', 10}), 5.63-5.89 (m, 14 H, H_{OH}^{2, 2', 3, 3'}), 7.87-7.89 (m, 1 H, H⁷); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 50.9 (C^{6'}), 59.2-60.6 (C⁶), 70.9-73.7 (C^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}), 81.7-82.4 (C^{4, 4'}), 84.2 (C⁹), 101.7-102.6 (C^{1, 1'}), 146.4 (C⁸), 149.3 (C⁷); MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 1215.7 (5 %, M+H⁺), 1237.6 (100 %, M+Na⁺), 1253.6 (38 %, M+K⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₄₅H₇₄N₄O₃₄ · 2 H₂O · 1 C₃H₆O: C 44.04, H 6.47, N 4.28 gefunden: C 43.92, H 6.42, N 4.09.

6-(1-Carboxy-2-(1*H*-imidazol-5-yl)ethylamino)-6-deoxy-β-cyclodextrin (β13₁)

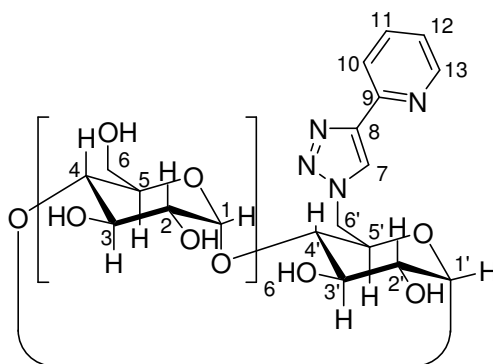
6-(*p*-Tolylsulfonyl)-β-cyclodextrin (1.00 g, 776 μmol), Histidin (1,20 g, 7,76 μmol) und Triethylamin (785 mg, 7,76 mmol) wurden in DMSO (20 ml) gelöst und 3 d unter einer N₂-Atmosphäre bei 70 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Aceton gegossen, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß Methode A, die unter 7.3.1 beschrieben ist.



Ausbeute: 176 mg (138 μmol , 18 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ 2.69-2.72 (m, 1 H, $\text{H}^{6'}$), 3.00-3.02 (m, 2 H, H^{10}), 3.16-3.78 (m, 40 H, $\text{H}^{2, 3, 4, 5, 6, 6', 8}$), 3.84-3.87 (m, 1 H), 4.00-4.04 (m, 1 H), 4.40-4.68 (m, 6 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{6'}$), 4.76-4.95 (m, 7 H, H^1), 5.76-5.94 (m, 15 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 7.00 (s, 1 H, H^{13}), 7.57 (s, 1 H, H^{12}); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 151 MHz) δ 28.4 (C^{10}), 47.3 ($\text{C}^{6'}$), 54.9 (C^8), 59.1-60.7 (C^6), 70.5-73.2 ($\text{C}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 80.9-83.8 ($\text{C}^{4, 4'}$), 101.2-102.3 ($\text{C}^{1, 1'}$), 117.1 (C^{12}), 137.4, 137.6, 170.6 (C^9); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1272.9 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1294.9 ($\text{M}+\text{Na}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{48}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{O}_{36} \cdot 4 \text{H}_2\text{O} \cdot 1 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: C 43.68, H 6.54, N 3.00; gefunden C 43.40, H 6.67, N 2.70.

6-(4-(Pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (β14_1)

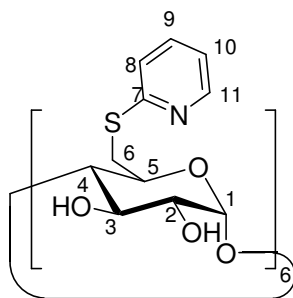
2-Ethynylpyridin wurde mit **42**^[109] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode A aufgereinigt.



Ausbeute: 73.1 mg (57.8 μmol , 22 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 2.92-2.99 (m, 2 H, $\text{H}^{6'}$), 3.20-3.50 (m, 20 H, $\text{H}^{2, 4, 6}$), 3.54-3.83 (m, 18 H, $\text{H}^{3, 5, 6}$), 4.08-4.13 (m, 1 H), 4.26 (t, 1 H, $J(\text{H},\text{H}) = 5.3 \text{ Hz}$), 4.41-4.71 (m, 6 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{6'}$), 4.74-5.07 (m, 7 H, $\text{H}^{1, 1'}$), 5.61-5.91 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2, 2', 3, 3'}$), 7.32-7.35 (m, 1 H, H^{12}), 7.87-7.91 (m, 1 H, H^{11}), 8.01 (d, 1 H, $J(\text{H},\text{H}) = 7.9 \text{ Hz}$, H^{10}), 8.56-8.58 (m, 2 H, $\text{H}^{7, 13}$); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 101 MHz) δ 50.6 ($\text{C}^{6'}$), 58.6-60.4 (C^6), 69.9-73.3 ($\text{C}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 80.7-83.5 ($\text{C}^{4, 4'}$), 101.2-102.3 ($\text{C}^{1, 1'}$), 119.5 (C^{10}), 122.9 (C^{12}), 124.1 (C^7), 137.2 (C^{11}), 147.1 (C^8), 149.5 (C^{13}), 150.1 (C^{13}); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1264.2 (100 %, $\text{M}+\text{H}^+$), 1286.2 (10 %, $\text{M}+\text{Na}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_{34} \cdot 6 \text{H}_2\text{O} \cdot 1 \text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$: C 43.18, H 6.62, N 4.84 gefunden: C 43.10, H 6.52, N 4.55.

Hexakis-6-(2-mercaptopyridyl)-hexakis-6-deoxy- α -cyclodextrin (α15_6)

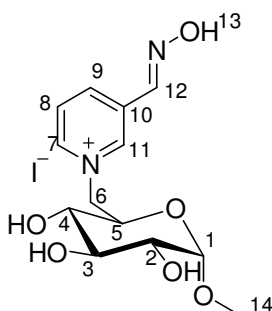
Unter einer Stickstoffatmosphäre wurde eine Lösung aus 2-Mercaptopyridin (408 mg, 3.67 mmol) und Triethylamin (743 mg, 7.43 mmol) in DMF (5 ml) mit Hexakis-6-iodo-hexakis-6-deoxy- α -cyclodextrin^[97] (498 mg, 305 μmol) versetzt und für 20 h bei 70 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Wasser gegeben und der erhaltene Feststoff abfiltriert. Dieser wurde einmal mit Wasser und zweimal mit Aceton gewaschen, in Ethanol *p.a.* suspendiert und für 17 h auf 80 °C erhitzt. Nach der Filtration wurde das Produkt im Hochvakuum getrocknet.



Ausbeute: 214 mg (140 μmol , 46 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3.35-3.44 (m, 18 H), 3.76-3.83 (m, 12 H), 4.03 (br, 6 H), 4.87 (s, 6 H, H^1), 5.61 (s, 6 H, H_{OH}^3), 5.76 (d, 6 H, $J(\text{H,H}) = 17.5$ Hz, H_{OH}^2), 6.92 (t, 6 H, $J(\text{H,H}) = 5.9$ Hz, H^{10}), 7.02 (d, 6 H, $J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, H^8), 7.36 (t, 6 H, $J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, H^9), 8.25 (d, 6 H, $J(\text{H,H}) = 3.7$ Hz, H^{11}); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 31.6 (C^6), 69.6 (C^5), 71.9 (C^2), 72.9 (C^3), 85.5 (C^4), 102.0 (C^1), 119.3 (C^{10}), 121.5 (C^8), 136.1 (C^9), 148.8 (C^{11}), 158.7 (C^7); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1532.5 (100 %, $\text{M}+\text{H}^+$), 1554.5 (85 %, $\text{M}+\text{Na}^+$), 1570.6 (28 %, $\text{M}+\text{K}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{66}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_{24}\text{S}_6 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: C 50.56, H 5.27, N 5.36, S 12.27; gefunden C 50.27, H 5.37, N 5.17, S 12.40.

6-(3-((Hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranose-iodid (G18₁)

6-Iodo-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranose (**54**)^[117] (200 mg, 658 μmol) und 3-(Hydroxyiminomethyl)-pyridin (**18**)^[126] (402 mg, 3.29 mmol) wurden in trockenem DMF (5 ml) gelöst und für 10 d unter einer N_2 -Atmosphäre bei 80 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde einkondensiert und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde in wenig Methanol gelöst und in einer Diethyletheratmosphäre kristallisiert.

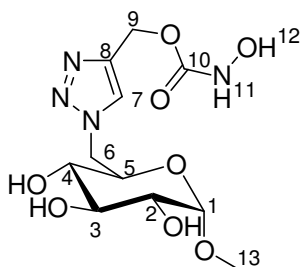


Ausbeute: 153 mg (359 μmol , 55 %), roter Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 2.91-2.95 m, 3 H, H^{14}), 2.96-3.02 (m, 1 H, H^4), 3.16-3.21 (m, 1 H, H^2), 3.39-3.43 (m, 1 H, H^3), 3.78-3.84 (m, 1 H, H^5), 4.51-4.52 (m, 1 H, H^1), 4.74-4.79 (m, 1 H, H^6), 4.93 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 6.4$ Hz, H_{OH}^2), 4.97-4.98 (m, 1 H, H^6), 5.09 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 5.2$ Hz, H_{OH}^3), 5.60 (d, 1 H, H_{OH}^4), 8.15-8.18 (m, 1 H, H^8), 8.36 (s, 1 H, H^{12}), 8.77 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 8.2$ Hz, H^7), 8.98 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 6.1$ Hz, H^9), 9.18 (s, 1 H, H^{11}), 12.29 (s, 1 H, H^{13}); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 101 MHz) δ 54.4 (C^{14}), 62.1 (C^6),

70.0 (C⁵), 71.4 (C²), 71.6 (C⁴), 72.9 (C³), 100.1 (C¹), 127.8 (C⁸), 133.1 (C¹⁰), 142.0 (C⁷), 143.3 (C^{11,12}), 145.4 (C⁹); MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 283.0 (95 %, M-I⁻O), 299.0 (100 %, M-I⁻); Elementaranalyse berechnet (%) für C₁₃H₁₉N₂O₆·0.5 H₂O: C 35.88, H 4.63, N 6.44; gefunden C 36.08, H 5.02, N 6.42.

6-(4-((Hydroxycarbamoyloxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol)-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranose (G27₁)

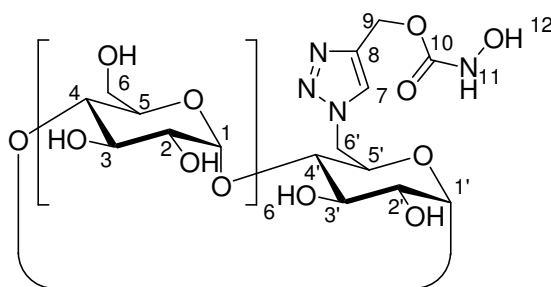
Prop-2-ynyl-hydroxycarbamat (**27**) wurde mit **56**^[118] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



Ausbeute 120 mg (359 μ mol, 39 %), farbloser Feststoff; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 2.96 (s, 3 H, H¹³), 2.98-3.01 (m, 1 H, H⁴), 3.16-3.20 (m, 1 H, H²), 3.37-3.41 (m, 1 H, H³), 3.66-3.70 (m, 1 H, H⁵), 4.38-4.42 (m, 1 H, H⁶), 4.49 (d, 1 H, *J*(H,H) = 3.7 Hz, H¹), 4.68-4.71 (m, 1 H, H⁶), 4.83 (d, 1 H, *J*(H,H) = 6.5 Hz, H_{OH}²), 4.95 (d, 1 H, *J*(H,H) = 5.0 Hz, H_{OH}⁴), 5.08 (s, 2 H, H⁹), 5.36 (d, 1 H, *J*(H,H) = 5.9 Hz, H_{OH}³), 8.03 (s, 1 H, H⁷), 8.72 (d, 1 H, *J*(H,H) = 1.0 Hz, H¹¹), 9.67 (s, 1 H, H¹²); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz) δ 50.9 (C⁶), 54.3 (C¹³), 57.2 (C⁹), 70.4 (C⁵), 71.6, 71.7, 73.1 (C³), 99.7 (C¹), 125.7 (C⁷), 142.2 (C⁸), 157.4 (C¹⁰); MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 335.1 (25 %, M+H⁺), 341.1 (3 %, M-O+Na⁺), 357.1 (100 %, M+Na⁺), 373.1 (13 %, M+K⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₁₁H₁₈N₄O₈: C 39.52, H 5.43, N 16.76; gefunden C 39.52, H 5.63, N 16.47.

6-(4-((Hydroxycarbamoyloxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol)-6-deoxy- β -cyclodextrin (β 27₁)

Prop-2-ynyl-hydroxycarbamat (**27**) wurde mit **42**^[109115] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.

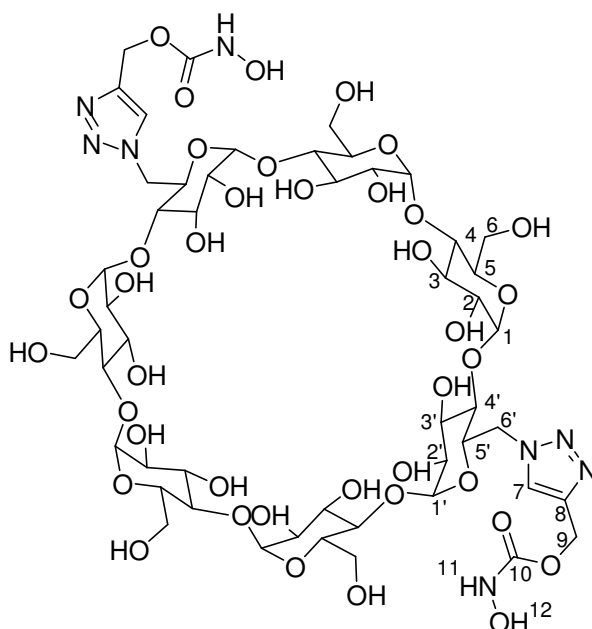


Ausbeute 140 mg (110 μ mol, 42 %), farbloser Feststoff; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 2.86-2.89 (m, 1 H, H^{6'}), 3.06-3.09 (m, 1 H, H^{6'}), 3.24-3.39 (m, 20 H, H^{2, 4, 6}), 3.55-3.74 (m, 18 H, H^{3, 5},

⁶), 3.96-4.00 (m, 1 H), 4.29 (t, 1 H, $J(H,H) = 5.8$ Hz), 4.47-4.61 (m, 6 H, H_{OH}^6), 4.76-4.87 (m, 7 H, H^1), 5.03-5.09 (m, 2 H, H^9), 5.64-5.89 (m, 14 H, $H_{OH}^{2, 2', 3, 3'}$), 8.06 (s, 1 H, H^7), 8.74 (s, 1 H, H^{11}), 9.65 (s, 1 H, H^{12}); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz) δ 50.3 ($C^{6'}$), 57.1(C^9), 59.9-60.2 (C^6), 69.9-73.2 ($C^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 81.1-83.4 ($C^4, 4'$), 101.3-102.2 ($C^1, 1'$), 125.7 (C^7), 142.1 (C^8), 157.4 (C^{10}); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1281.8 (3 %, M-O+Na⁺), 1297.8 (100 %, M+Na⁺), 1313.8 (16 %, M+K⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₄₆H₇₄N₄O₃₇ · 3 H₂O: C 41.57, H 6.07, N 4.22; gefunden C 41.56, H 6.16, N 4.15.

Bis-6^A,6^D-(4-((Hydroxycarbamoyloxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol)-bis-6^A,6^D-deoxy- β -cyclodextrin (**β 27₂**)

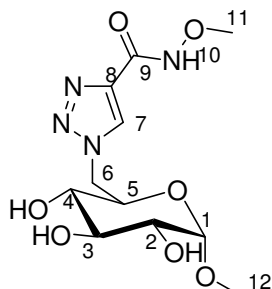
Prop-2-ynylhydroxycarbamat (**27**) wurde mit **44**^[111] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



Ausbeute 104 mg (73.5 μ mol, 43 %), farbloser Feststoff; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 2.97-3.02 (m, 2 H, H^6), 3.17-3.19 (m, 2 H, H^6), 3.25-3.41 (m, 19 H, $H^{2, 4, 6}$), 3.56-3.74 (m, 15 H, $H^{3, 5, 6}$), 3.95-3.98 (m, 2 H), 4.33-4.35 (m, 2 H), 4.51-4.68 (m, 5 H, H_{OH}^6), 4.68-4.86 (m, 7 H, H^1), 5.05-5.08 (m, 4 H, H^9), 5.69-5.88 (m, 14 H, $H_{OH}^{2, 2', 3, 3'}$), 8.05 (s, 2 H, H^7), 8.75 (d, 2 H, $J(H,H) = 4.0$ Hz, H^{11}), 9.66 (s, 2 H, H^{12}); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz) δ 50.1 ($C^{6'}$), 57.1(C^9), 59.2-60.1 (C^6), 69.8-73.1 ($C^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 81.4-83.1 ($C^4, 4'$), 101.5-102.2 ($C^1, 1'$), 126.1 (C^7), 142.1 (C^8), 157.4 (C^{10}); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1422.0 (3 %, M-O+Na⁺), 1438.1 (100 %, M+Na⁺), 1454.1 (9 %, M+K⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₅₀H₇₈N₈O₃₉: C 40.87, H 5.76, N 7.63; gefunden C 41.00, H 5.87, N 7.49.

6-(4-(Methoxycarbamoyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranose (**G56₁**)

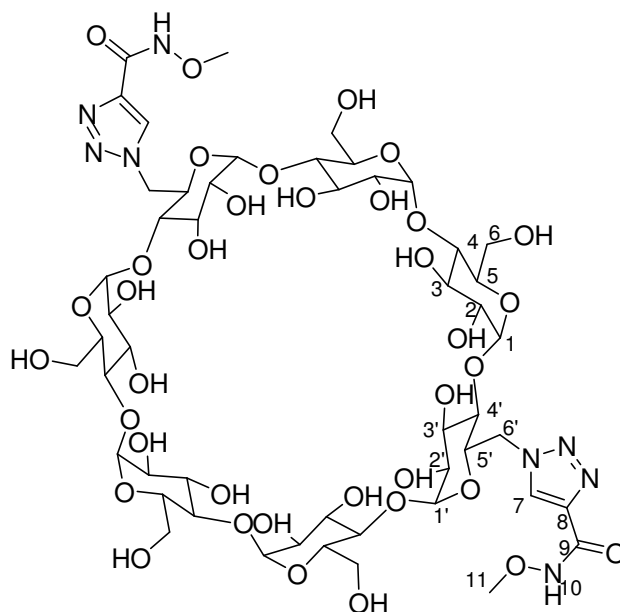
O-Methyl-propiolhydroxamsäure (**30**)^[182] wurde mit 6-Azido-6-deoxy-1-*O*-methyl- α -D-glucopyranose (**56**)^[118] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt. Im Anschluss wurde säulenchromatographisch über Kieselgel mit Methanol/Dichlormethan (2:15 (v/v)) als Eluens aufgereinigt.



Ausbeute: 143 mg (398 μ mol, 44 %), weißer Feststoff; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 2.96-3.01 (m, 4 H, H^{4,12}), 3.15-3.20 (m, 1 H, H²), 3.36-3.42 (m, 1 H; H³), 3.67 (s, 3 H, H¹¹), 3.70-3.75 (m, 1 H, H⁵), 4.45-4.51 (m, 2 H, H^{1,6}), 4.75 (dd, 1 H, $J(H,H) = 2.4$ Hz, $J(H,H) = 14.1$ Hz, H⁶), 4.85 (d, 1 H, $J(H,H) = 6.5$ Hz, H_{OH}²), 4.97 (d, 1 H, $J(H,H) = 5.1$ Hz, H_{OH}³), 5.41 (d, 1 H, $J(H,H) = 5.8$ Hz, H_{OH}⁴), 8.48 (s, 1 H, H⁷), 11.91 (s, 1 H, H¹⁰); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz) δ 51.2 (C⁶), 54.2 (C¹²), 63.4 (C¹¹), 70.0 (C⁵), 71.6 (C²), 71.7 (C⁴), 73.0 (C³), 99.8 (C¹), 127.8 (C⁷), 140.5 (C⁸), 157.4 (C⁹); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 310.9 (16 %, M-O+Na⁺), 319.0 (5 %, M+H⁺), 341.0 (100 %, M+Na⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₁₁H₁₈N₄O₇ · 0.4 H₂O: C 40.59, H 5.82, N 17.21; gefunden C 40.76, H 5.96, N 17.23.

Bis-6^A,6^D-(4-(Methoxycarbonyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-bis-6^A,6^D-deoxy- β -cyclodextrin (**β 30₂**)

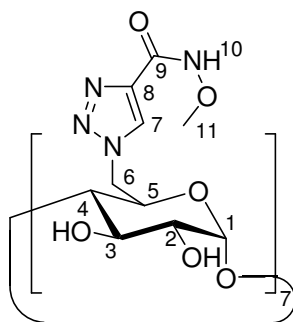
O-Methyl-propiolhydroxamsäure (**30**)^[182] wurde mit Bis-6^A,6^D-azido-bis-6^A,6^D-deoxy- β -cyclodextrin (**44**)^[111] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



Ausbeute: 84.0 mg (60.7 μmol , 24 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ 2.93 (s, 2 H, $\text{H}^{2'}$), 3.14 (t, 2 H, $J(\text{H,H}) = 10.6$ Hz, $\text{H}^{4'}$), 3.25-3.41 (m, 10 H, $\text{H}^{2, 4}$), 3.48-3.79 (m, 30 H, $\text{H}^{3, 3', 5, 5', 6, 11}$), 4.02-4.12 (m, 2 H, $\text{H}^{6'}$), 4.39 (s, 2 H, $\text{H}^{6'}$), 4.52-4.72 (m, 5 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{6'}$), 4.75-5.05 (m, 7 H, H^1), 5.65-5.92 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2, 2', 3, 3'}$), 8.57 (s, 2 H, H^7), 11.84 (s, 2 H, H^{10}); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 151 MHz) δ 50.6 ($\text{C}^{6'}$), 58.8-60.4 (C^6), 63.3 (C^{11}), 69.6-73.3 ($\text{C}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 80.6-83.2 ($\text{C}^{4, 4'}$), 101.1-102.3 ($\text{C}^{1, 1'}$), 127.5 (C^7), 140.7 (C^8), 157.5 (C^9); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1375.6 (57 %, $\text{M-OMe}+\text{Na}^+$), 1383.6 (5 %, $\text{M}+\text{H}^+$), 1391.6 (40 %, $\text{M-Me}+\text{H}^+$), 1405.6 (100 %, $\text{M}+\text{Na}^+$), 1421.6 (63 %, $\text{M}+\text{K}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{50}\text{H}_{78}\text{N}_8\text{O}_{37} \cdot 2 \text{H}_2\text{O} \cdot 1 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: C 43.09, H 6.00, N 7.59; gefunden C 43.22, H 6.00, N 7.55.

Heptakis-6-(4-(methoxycarbamoyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-heptakis-6-deoxy- β -cyclodextrin (β30_7)

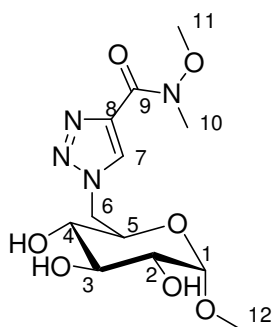
O-Methyl-propiolhydroxamsäure (**30**)^[182] wurde mit Heptakis-6-azido-heptakis-6-deoxy- β -cyclodextrin (**52**)^[98] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift, jedoch bei 70 °C, umgesetzt. Das Rohprodukt wurde aus Ethanol/wässrigem Ammoniak umkristallisiert.



Ausbeute: 242 mg (121 μmol , 53 %), weißer Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 3.27-3.37 (m, 14 H, $\text{H}^{2,4}$), 3.59 (s, 21 H, H^{11}), 3.68-3.70 (m, 7 H, H^3), 4.09 (s, 7 H, H^5), 4.43-4.56 (m, 14 H, H^6), 5.09 (s, 7 H, H^1), 5.89 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2,3}$), 8.42 (s, 7 H, H^7), 10.99 (s, 7 H, H^{10}); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 101 MHz) δ 49.6 (C^6), 63.3 (C^{11}), 69.2 (C^5), 71.7 (C^2), 72.4 (C^3), 82.4 (C^4), 101.7 (C^1), 128.3 (C^7), 140.6 (C^8), 157.2 (C^9); MS (ESI, positiv) m/z (%) 1002.2 (8 %, $\text{M}+2 \text{H}^+$), 1013.2 (42 %, $\text{M}+\text{H}^++\text{Na}^+$), 1024.1 (100 %, $\text{M}+2 \text{Na}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{70}\text{H}_{98}\text{N}_{28}\text{O}_{42} \cdot 4 \text{H}_2\text{O} \cdot 1 \text{C}_2\text{H}_6\text{O}$: C 40.76, H 5.32, N 18.48; gefunden C 40.71, H 5.50, N 18.24.

6-(4-(*N,O*-Dimethylhydroxycarbamoyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy-1-*O*-methyl- α -D-glucopyranose (**G31**₁)

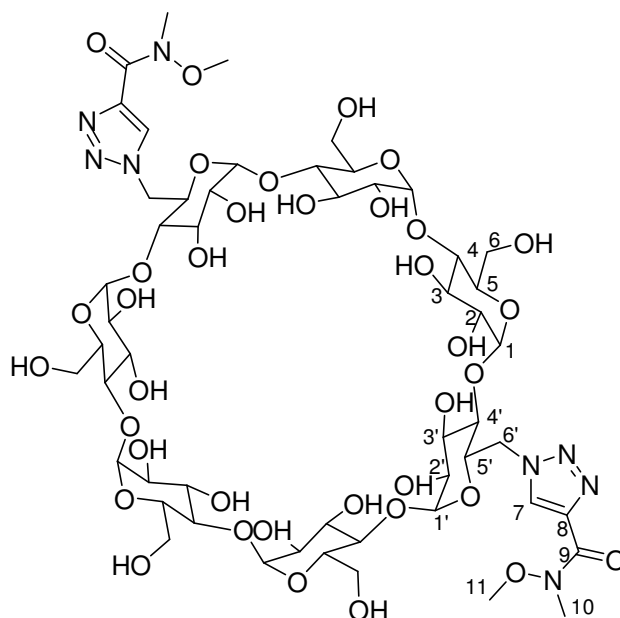
N,O-Dimethylpropiolhydroxamsäure (**31**)^[182] wurde mit 6-Azido-6-deoxy-1-*O*-methyl- α -D-glucopyranose (**56**)^[118] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel mit Methanol/Dichlormethan (2:15 (v/v)) als Eluens gereinigt.



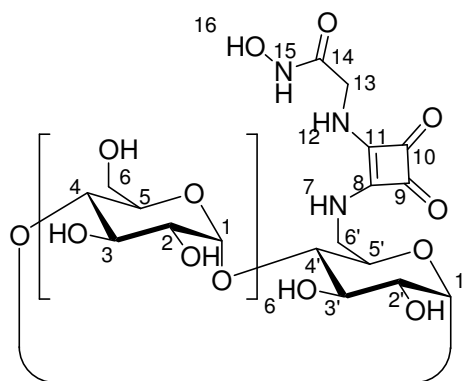
Ausbeute: 131 mg (394 μmol , 43 %), weißer Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 2.95-3.03 (m, 4 H, $\text{H}^{4,12}$), 3.16 (s, 1 H, H^2), 3.20 (s, 3 H, H^{10}), 3.36-3.43 (m, 1 H, H^3), 3.70-3.75 (m, 4 H, $\text{H}^{5,11}$), 4.46-4.52 (m, 2 H, $\text{H}^{1,6}$), 4.76-4.79 (m, 1 H, H^6), 4.85 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 6.4$ Hz, H_{OH}^2), 4.97 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 5.0$ Hz, H_{OH}^3), 5.41 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 5.8$ Hz, H_{OH}^4), 8.45 (s, 1 H, H^7); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 101 MHz) δ 33.0 (C^{10}), 51.1 (C^6), 54.2 (C^{12}), 61.3 (C^{11}), 70.1 (C^5), 71.8 ($\text{C}^{2,4}$), 73.1 (C^3), 99.8 (C^1), 129.0 (C^7), 139.4 (C^8), 160.3 (C^9); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 325.0 (5 %, $\text{M-OMe}+\text{Na}^+$), 355.1 (100 %, $\text{M}+\text{Na}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_7 \cdot 0.3 \text{H}_2\text{O} \cdot 0.3 \text{C}_2\text{H}_6\text{O}$: C 43.05, H 6.42, N 15.94; gefunden C 43.18, H 6.50, N 15.91.

Bis-6^A,6^D-(4-(*N,O*-Dimethylhydroxycarbamoyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-bis-6^A,6^D-deoxy- β -cyclodextrin (**β 31₂**)

N,O-Dimethylpropiolhydroxamsäure (**31**)^[182] wurde mit Bis-6^A,6^D-azido-bis-6^A,6^D-deoxy- β -cyclodextrin (**44**)^[111] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



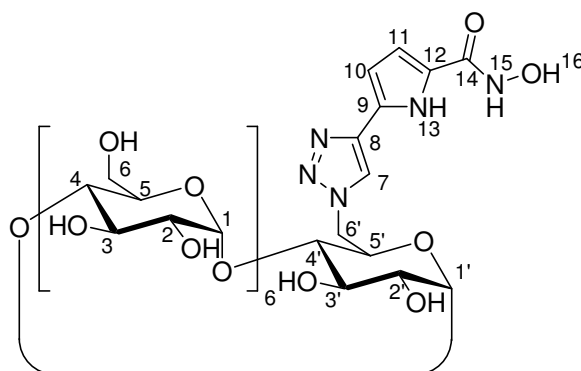
Ausbeute: 69.7 mg (49.4 μmol , 20 %), weißer Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ 2.89 (s, 2 H, $\text{H}^{2'}$), 3.08-3.10 (m, 2 H, $\text{H}^{4'}$), 3.20-3.42 (m, 16 H, $\text{H}^{2,4,10}$), 3.50-3.80 (m, 30 H, $\text{H}^{3,5,6,11}$), 4.08-4.14 (m, 2 H, $\text{H}^{6'}$), 4.31-4.35 (m, 2 H, $\text{H}^{6'}$), 4.51-4.71 (m, 5 H, H_{OH}^6), 4.76-5.04 (m, 7 H, H^1), 5.67-5.96 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2,3}$), 8.48 (s, 1 H, H^7), 8.52 (s, 1 H, H^7); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 151



Ausbeute: 153 mg (0.12 mmol, 53 %), weißer Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3.32-3.86 (m, 40 H, $\text{H}^{2,3,4,5,6,2',3',4',5'}$), 3.96-3.98 (m, 2 H, $\text{H}^{6'}$), 4.24 (s, 2 H, H^{13}), 4.15-4.51 (m, 6 H, H_{OH}^6), 4.88-4.93 (m, 7 H, $\text{H}^{1,1'}$), 5.12-5.27 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2,3,2',3'}$), 7.16 (br, 2 H, $\text{H}^{7,12}$), 8.58 (br, 1 H, H^{15}), 10.13 (br, 1 H, H^{16}); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 31.2 (C^{13}), 44.0 ($\text{C}^{6'}$), 60.1-60.6 (C^6), 72.4-73.5 ($\text{C}^{2,3,5,2',3',5'}$), 81.8-83.2 ($\text{C}^{4,4'}$), 102.2-102.7 ($\text{C}^{1,1'}$), 165.8 (C^{14}), 168.3 (C^8), 168.6 (C^{11}), 182.9 (C^9), 183.3 (C^{10}); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1309.7 (51%) [$\text{M-O} + \text{Na}$] $^+$, 1324.7 (100%) [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 1340.7 (25%) [$\text{M} + \text{K}$] $^+$; Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{48}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_{38} \cdot 4 \text{H}_2\text{O} \cdot 1 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: C 42.24, H 6.32, N 2.90 gefunden: C 42.37, H 6.40, N 2.97.

6-(4-(5-(Hydroxycarbonyl)-1H-pyrrol-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (β34_1)

5-Ethynyl-N-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-1H-pyrrol-2-carboxamid (**93**) wurde mit **42**^[109] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt. Das THP-geschützte Zwischenprodukt wurde in DMF/MeOH (1:1 (v/v), 10 ml) gelöst, mit *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (50 mg) versetzt und für 18 h bei 25 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Aceton gegossen, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.

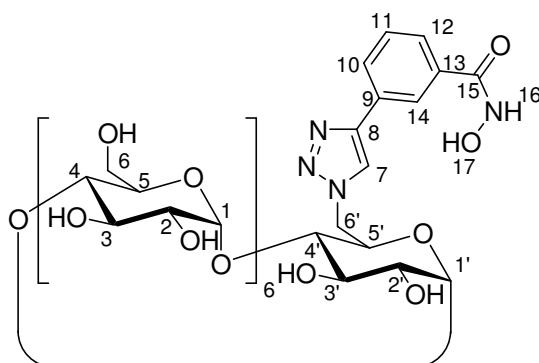


Ausbeute 100 mg (76.4 μmol , 29 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ 3.03 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 11.0$ Hz, $\text{H}^{6'}$), 3.12 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 11.5$ Hz, $\text{H}^{6'}$), 3.25-3.40 (m, 12 H, $\text{H}^{2,4}$), 3.56-3.72 (m, 25 H, $\text{H}^{3,5,6}$), 4.06-4.09 (m, 1 H, $\text{H}^{2'}$), 4.32 (s, 1 H, $\text{H}^{4'}$), 4.50-4.67 (m, 6 H, H_{OH}^6), 4.78-4.85 (m, 7 H, $\text{H}^{1,3'}$), 5.07 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 3.3$ Hz, $\text{H}^{1'}$), 5.63-5.92 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2,3}$), 6.48 (s, 1 H, H^{10}), 6.73 (s, 1 H, H^{11}), 8.40 (s, 1 H, H^7), 8.91 (s, 1 H, H^{13}), 10.8 (s, 1 H, H^{15}), 11.8 (s, 1 H,

H¹⁶); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz) δ 50.3 (C^{6'}), 58.9-60.2 (C⁶), 69.6-73.2 (C^{2,3,5}), 80.9-83.1 (C⁴), 101.3-102.2 (C¹), 106.7 (C¹⁰), 111.1 (C¹¹), 121.8 (C⁷), 124.5 (C⁸), 126.3 (C¹²), 140.1 (C⁹), 159.6 (C¹⁴); MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 1316.5 (100 %, M-O+Na⁺), 1332.5 (58 %, M+Na⁺), 1348.5 (7 %, M+K⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₄₉H₇₅N₅O₃₆·1 H₂O·1 C₃H₆O : C 45.06, H 6.03, N 5.05; gefunden C 45.32, H 6.31, N 4.79.

6- (4-(3-(hydroxycarbamoyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol)-6-deoxy-β-cyclodextrin (β35₁)

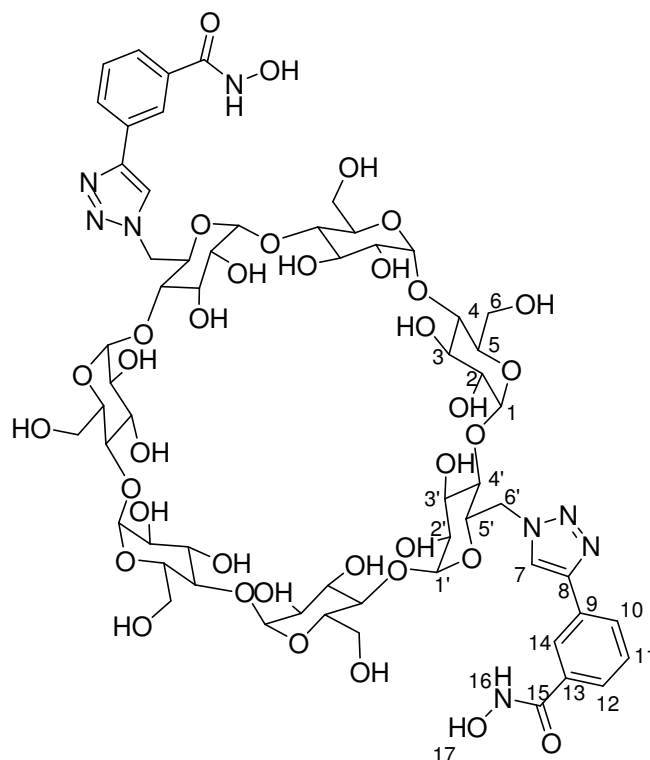
35^[133] wurde mit **42**^[109] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



Ausbeute: 70.6 mg (53.4 μmol, 21 %), weißer Feststoff; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.89-2.98 (m, 2 H, H^{6'}), 3.25-3.78 (m, 38 H, H^{2, 3, 4, 5, 6}), 4.10 (t, 1 H, *J*(H,H) = 10.1 Hz), 4.27 (m, 1 H), 4.45-4.65 (m, 6 H, H_{OH}⁶), 4.75-4.86 (m, 7 H, H^{1, 1'}), 5.67-5.85 (m, 14 H, H_{OH}^{2, 2', 3, 3'}), 7.47 (t, 1 H, *J*(H,H) = 7.7 Hz, H¹¹), 7.68 (d, 1 H, *J*(H,H) = 7.8 Hz, H¹⁰), 7.87 (d, 1 H, *J*(H,H) = 7.7 Hz, H¹²), 8.23 (s, 1 H, H¹⁴), 8.54 (s, 1 H, H⁷), 8.99 (br, 1 H, H¹⁶), 11.31 (br, 1 H, H¹⁷); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 50.6 (C^{6'}), 59.5-60.2 (C⁶), 69.8-73.2 (C^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}), 80.7-83.5 (C^{4, 4'}), 101.3-102.2 (C^{1, 1'}), 122.5 (C⁷), 123.7 (C¹⁴), 125.9 (C¹⁰), 127.8 (C¹²), 128.9 (C¹¹), 131.0 (C⁹), 133.4 (C¹³), 145.7 (C⁸), 164.0 (C¹⁵); MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 1306.9 (5 %, M-O+H⁺), 1328.0 (42 %, M-O+Na⁺), 1342.9 (100 %, M+Na⁺), 1360.0 (15 %, M+K⁺); Elementaranalyse berechnet (%) für C₅₁H₇₆N₄O₃₆ · 1H₂O · 1 C₃H₆O: C 46.42, H 6.06, N 4.01; gefunden C 46.50, H 6.32, N 3.72.

Bis-6^A,6^D-(4-(3-(hydroxycarbamoyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol)-bis-6^A,6^D-deoxy-β-cyclodextrin (β35₂)

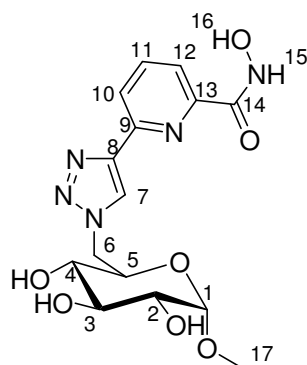
35^[133] wurde mit Bis-6^A,6^D-azido-bis-6^A,6^D-deoxy-β-cyclodextrin (**44**)^[111] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



Ausbeute: 65.2 mg (43.3 μmol , 17 %), weißer Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.95-3.80 (m, 42 H, $\text{H}^{2, 3, 4, 5, 6, 6'}$), 4.10-4.58 (m, 5 H, H_{OH}^6), 4.72-5.12 (m, 7 H, $\text{H}^{1, 1'}$), 5.78 (br, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2, 2', 3, 3'}$), 7.34 (t, 1 H, $J(\text{H,H}) = 7.8 \text{ Hz}$, H_{D}^{11}), 7.48 (t, 1 H, $J(\text{H,H}) = 7.8 \text{ Hz}$, H_{A}^{11}), 7.60 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 7.2 \text{ Hz}$, H_{D}^{10}), 7.65 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 7.6 \text{ Hz}$, H_{A}^{10}), 7.86 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 7.2 \text{ Hz}$, H_{D}^{12}), 7.92 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 7.8 \text{ Hz}$, H_{A}^{12}), 8.23 (s, 1 H, H_{D}^{14}), 8.25 (s, 1 H, H_{A}^{14}), 8.52 (s, 1 H, H_{D}^7), 8.59 (s, 1 H, H_{A}^7), 9.65 (br, 2 H, H^{16}); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 55.8 ($\text{C}^{6'}$), 63.9-65.5 (C^6), 73.8-78.4 ($\text{C}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 86.1-88.6 ($\text{C}^{4, 4'}$), 106.7-107.5 ($\text{C}^{1, 1'}$), 127.9 (C^7), 128.9 (C^{14}), 131.2 (C^{10}), 133.0 (C^{10}), 134.1 (C^{12}), 136.2 (C^{11}), 138.7 (C^8), 150.9 (C^9), 164.0 (C^{15}); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1475.9 (2 %, M-2O+H^+), 1492.0 (16 %, M-O+H^+), 1497.9 (25 %, M-2O+Na^+), 1508.1 (21 %, M+H^+), 1514.0 (M-O+Na^+), 1530.1 (100 %, M+Na^+), 1546.1 (26 %, M+K^+); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{60}\text{H}_{82}\text{N}_8\text{O}_{37} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: C 46.69 H 5.62, N 7.26; gefunden C 46.79, H 5.58, N 7.14.

6-(4-(6-(Hydroxycarbamoyl)pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol)-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranose (G36₁)

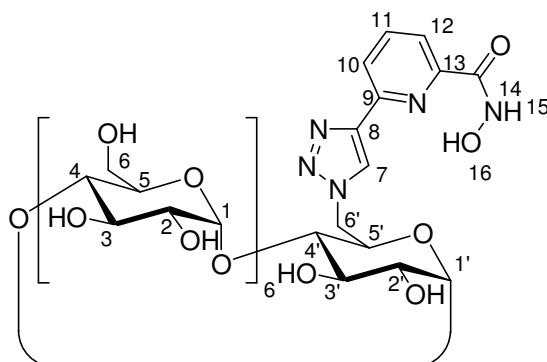
36 wurde mit 6-Azido-6-deoxy-1-O-methyl- α -D-glucopyranose (**56**)^[118] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



Ausbeute: 103 mg (270 μmol , 30 %), weißer Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 2.97 (s, 3 H, H^{17}), 3.03-3.09 (m, 1 H, H^3), 3.16-3.23 (m, 1 H, H^4), 3.40-3.46 (m, 1 H, H^2), 3.74-3.79 (m, 1 H, H^5), 4.46-4.54 (m, 2 H, $\text{H}^{1,6}$), 4.77-4.81 (m, 1 H, H^6), 4.86-4.88 (m, 1 H, H_{OH}^3), 4.97-4.98 (m, 1 H, H_{OH}^2), 5.43-5.44 (m, 1 H, H_{OH}^4), 7.89 (dd, 1 H, $J(\text{H,H}) = 0.8$ Hz, $J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, H^{12}), 8.04 (t, 1 H, $J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, H^{11}), 8.15 (dd, 1 H, $J(\text{H,H}) = 0.8$ Hz, $J(\text{H,H}) = 7.4$ Hz, H^{10}), 9.06 (s, 1 H, H^7), 9.24 (s, 1 H, H^{15}), 11.60 (s, 1 H, H^{16}); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 51.3 (C^6), 54.2 (C^{17}), 70.4 (C^2), 71.6, 71.7, 73.0 (C^4), 99.7 (C^1), 120.2 (C^{12}), 121.1 (C^{10}), 127.5 (C^7), 138.7 (C^{11}), 146.6 (C^8), 148.9 (C^9), 149.5 (C^{13}), 160.7 (C^{14}); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 382.2 (3 %, $\text{M}+\text{H}^+$), 388.2 (61 %, $\text{M-O}+\text{Na}^+$), 404.2 (100 %, $\text{M}+\text{Na}^+$), 420.2 (8 %, $\text{M}+\text{K}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_7 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$: C 45.11, H 5.30, N 17.54; gefunden C 45.21, H 5.56, N 17.30.

6-(4-(6-(hydroxycarbamoyl)pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol)-6-deoxy- β -cyclodextrin ($\beta 36_1$)

36 wurde mit **42**^[109] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.

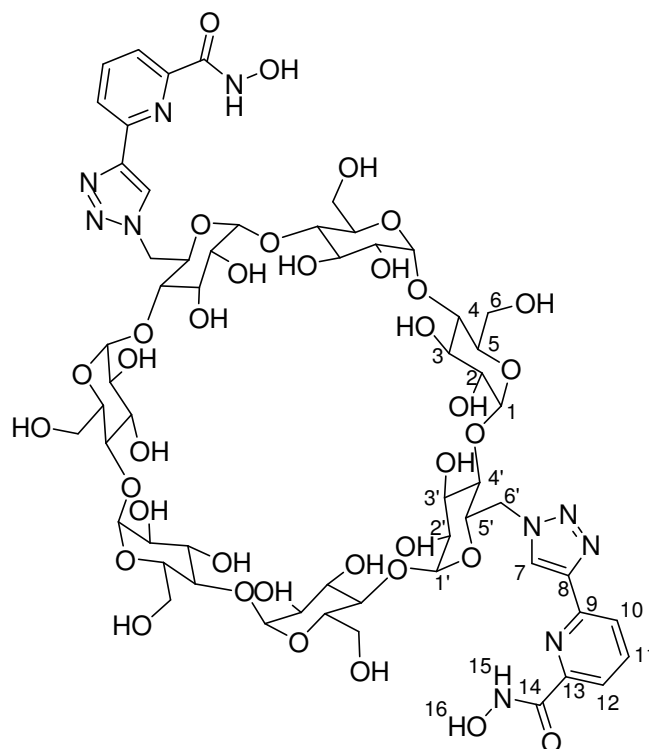


Ausbeute: 54.0 mg (40.0 μmol , 16 %) weißer Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.94 (s, 2 H, $\text{H}^{6'}$), 3.24-3.49 (m, 20 H, $\text{H}^{2,4,6}$), 3.53-3.75 (m, 18 H, $\text{H}^{3,5,6}$), 4.07-4.11 (m, 1 H), 4.15-4.21 (m, 1 H), 4.49-4.76 (m, 6 H, H_{OH}^6), 4.81-5.13 (m, 7 H, $\text{H}^{1,1'}$), 5.71-5.78 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2,2',3,3'}$), 7.89 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 7.7$ Hz, H^{12}), 8.06 (t, 1 H, $J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz, H^{11}), 8.13 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 7.7$ Hz, H^{10}), 8.96 (s, 1 H, H^7), 9.61 (br, 1 H, H^{15}), 11.6 (br, 1 H, H^{16}); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 51.2 ($\text{C}^{6'}$), 56.3-60.6 (C^6), 70.6-73.7 ($\text{C}^{2,2',3,3',5,5'}$), 81.6-83.8 ($\text{C}^{4,4'}$), 101.9-102.7 ($\text{C}^{1,1'}$), 120.7 (C^{12}), 121.6 (C^{10}), 126.4 (C^7), 139.2 (C^{11}), 147.1 (C^8), 149.3 (C^9), 150.0 (C^{13}), 161.3 (C^{14}); MS (MALDI) m/z (%) 1328.9 (100 %, $\text{M-O}+\text{Na}^+$), 1344.9 (97 %, $\text{M}+\text{Na}^+$);

Elementaranalyse berechnet für $C_{50}H_{75}N_5O_{36} \cdot 4 H_2O \cdot 1 C_3H_6O$: C 43.83, H 6.18, N 4.82; gefunden C 43.88, H 6.48, N 4.86.

Bis-6^A,6^D-(4-(6-(hydroxycarbamoyl)pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol)-bis-6^A,6^D-deoxy- β -cyclodextrin (β 36₂)

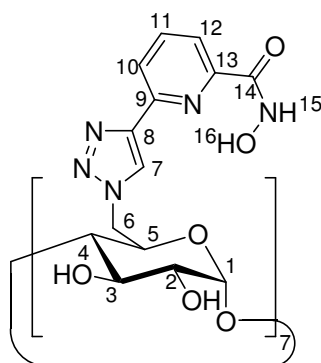
36 wurde mit Bis-6^A,6^D-azido-bis-6^A,6^D-deoxy- β -cyclodextrin (**44**)^[111] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



Ausbeute: 100.6 mg (66.7 μ mol, 26 %), weißer Feststoff; 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 3.06-3.44 (m, 22 H, H^{2, 4, 6, 6'}), 3.54-3.81 (m, 18 H, H^{3, 5, 6}), 4.11-4.66 (m, 7 H, H_{OH}⁶), 4.81-5.19 (m, 7 H, H^{1, 1'}), 5.74-5.93 (m, 14 H, H_{OH}^{2, 2', 3, 3'}), 7.86-7.91 (m, 2 H, H¹²), 7.99-8.08 (m, 2 H, H¹¹), 8.13-8.16 (m, 2 H, H¹⁰), 8.96-8.97 (m, 2 H, H⁷), 9.23 (br, 2 H, H¹⁵), 11.60 (br, 2 H, H¹⁶); ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 50.5 (C^{6'}), 59.9-60.1 (C⁶), 69.8-73.1 (C^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}), 81.1-83.0 (C^{4, 4'}), 101.5-102.2 (C^{1, 1'}), 120.3 (C¹²), 121.3 (C¹⁰), 126.3 (C⁷), 138.7 (C¹¹), 146.6 (C⁸), 148.9 (C⁹), 149.5 (C¹³), 160.8 (C¹⁴); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1515.8 (100 %, M-O+Na⁺), 1531.6 (98 %, M+Na⁺), 1547.7 (13 %, M+K⁺); Elementaranalyse berechnet für $C_{58}H_{80}N_{10}O_{37} \cdot 1H_2O \cdot 1 C_3H_6O$: C 46.21, H 5.59, N 8.83; gefunden C 46.09, H 5.70, N 8.67.

Heptakis-6-(4-(6-(hydroxycarbamoyl)pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol)-heptakis-6-deoxy- β -cyclodextrin (β 36₇)

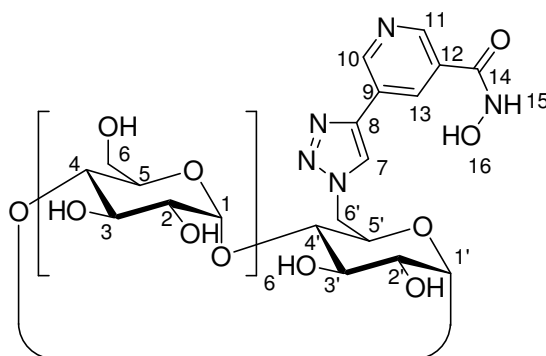
36 wurde mit Heptakis-6-azido-heptakis-6-deoxy- β -cyclodextrin (**52**)^[98] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift, jedoch bei 70 °C, umgesetzt. Zur Aufreinigung wurde das Rohprodukt aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.



Ausbeute: 253 mg (103 μmol , 45 %), weißer Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 3.26-3.34 (m, 7 H, H^3), 3.52-3.56 (m, 7 H, H^4), 3.76-3.80 (m, 7 H, H^5), 4.18-4.26 (m, 14 H, $\text{H}^{2, 6}$), 4.50-4.53 (m, 7 H, H^6), 5.15 (s, 7 H, H^1), 6.01 (s, 7 H; H_{OH}^3), 6.07-6.09 (m, 7 H, H_{OH}^2), 7.48 (d, 7 H, $J(\text{H,H}) = 7.6$ Hz, H^{12}), 7.59 (t, 7 H, $J(\text{H,H}) = 7.8$ Hz, H^{11}), 7.77 (d, 7 H, $J(\text{H,H}) = 7.7$ Hz, H^{10}), 8.56 (s, 7 H, H^7), 9.16 (s, 7 H, H^{15}), 11.30 (s, 7 H, H^{16}); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 50.0 (C^6), 69.5 (C^2), 72.0 (C^3), 72.4 (C^5), 83.2 (C^4), 101.9 (C^1), 119.7 (C^{12}), 121.1 (C^{10}), 126.4 (C^7), 137.8 (C^{11}), 146.0 (C^8), 148.2 (C^9), 148.9 (C^{13}), 160.7 (C^{14}); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 2452.4 (100 %, $\text{M-O}+\text{Na}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{98}\text{H}_{105}\text{N}_{35}\text{O}_{42} \cdot 6 \text{H}_2\text{O} \cdot 3 \text{C}_2\text{H}_6\text{O}$: C 46.41, H 5.06, N 18.21; gefunden C 46.49, H 5.03, N 18.13.

6-(4-(5-(hydroxycarbonyl)pyridin-3-yl)-1H-1,2,3-triazol)-6-deoxy- β -cyclodextrin ($\beta 37_1$)

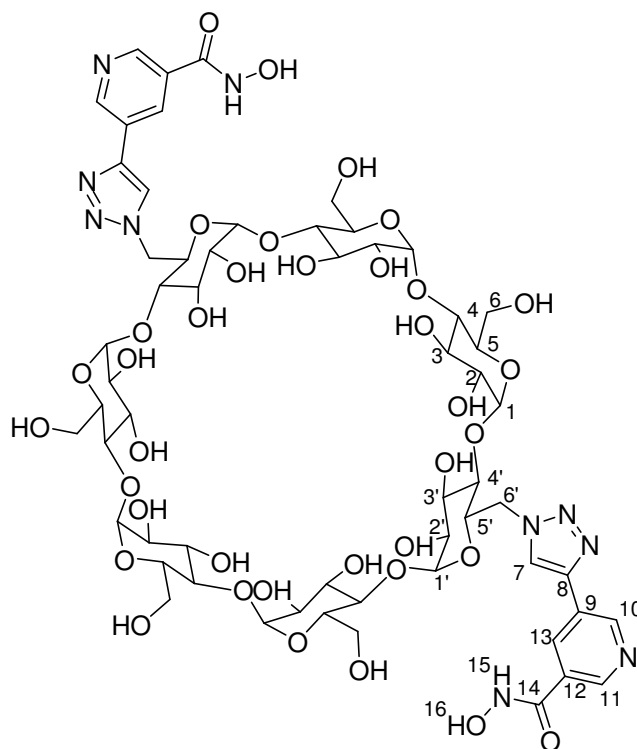
37 wurde mit **42**^[109] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



Ausbeute: 88.6 mg (67.0 μmol , 26 %), weißer Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.82-2.89 (m, 2 H, $\text{H}^{6'}$), 3.23-3.46 (m, 20 H, $\text{H}^{2, 4, 6}$), 3.52-3.76 (m, 18 H, $\text{H}^{3, 5, 6}$), 4.09 (t, 1 H, $J(\text{H,H}) = 9.9$ Hz), 4.26 (s, 1 H), 4.49-4.66 (m, 6 H, H_{OH}^6), 4.75-5.09 (m, 7 H, $\text{H}^{1, 1'}$), 5.70-5.98 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2, 2', 3, 3'}$), 8.59 (t, 1 H, $J(\text{H,H}) = 1.8$ Hz, H^{13}), 8.76 (s, 1 H, H^7), 8.85 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 1.9$ Hz, H^{11}), 9.07 (d, 1 H, $J(\text{H,H}) = 1.8$ Hz, H^{10}), 9.23 (br, 1 H, H^{15}), 11.44 (br, 1 H, H^{16}); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 51.4 ($\text{C}^{6'}$), 59.1-60.8 ($\text{C}^{6'}$), 70.5-73.7 ($\text{C}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 81.3-84.0 ($\text{C}^4, 4'$), 101.8-102.7 ($\text{C}^1, 1'$), 123.6 (C^7), 127.2 (C^9), 129.6 (C^{12}), 131.2 (C^{13}), 143.4 (C^8), 147.1 (C^{10}), 148.7 (C^{11}), 162.6 (C^{14}); MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1328.9 (67 %, $\text{M-O}+\text{Na}^+$), 1344.9 (100 %, $\text{M}+\text{Na}^+$); Elementaranalyse berechnet für $\text{C}_{50}\text{H}_{75}\text{N}_5\text{O}_{36} \cdot 3\text{H}_2\text{O} \cdot 1 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: C 44.38, H 6.11, N 4.88; gefunden C 44.49, H 6.09, N 4.84.

Bis-6^A,6^D-(4-(5-(hydroxycarbonyl)pyridin-3-yl)-1H-1,2,3-triazol)-bis-6^A,6^D-deoxy- β -cyclodextrin (β 37₂)

37 wurde mit Bis-6^A,6^D-azido-bis-6^A,6^D-deoxy- β -cyclodextrin (**44**)^[111] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.

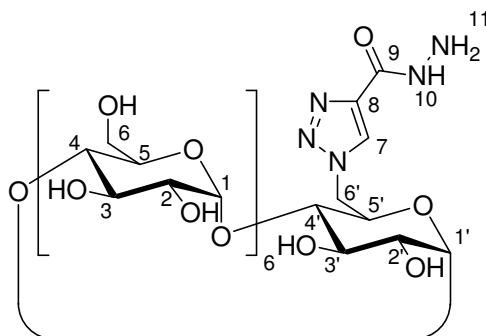


Ausbeute: 39.8 mg (26.4 μ mol, 10 %), weißer Feststoff; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.81-2.85 (m, 2 H, H^{6'}), 3.12-3.17 (m, 2 H, H^{6'}), 3.23-3.42 (m, 19 H, H^{2, 4, 6,}), 3.61-4.10 (m, 19 H, H^{3, 5, 6,}), 4.20-4.58 (m, 5 H, H_{OH}⁶), 4.72-5.29 (m, 7 H, H^{1, 1'}), 5.70-6.11 (m, 14 H, H_{OH}^{2, 2', 3, 3',}), 8.33 (s, 1 H, H¹³), 8.46 (s, 1 H, H¹³), 8.57 (d, 1 H, *J*(H,H) = 1.6 Hz, H¹⁰), 8.69 (s, 2 H, H⁷), 8.77 (s, 1 H, H¹⁰), 8.78 (s, 1 H, H¹¹), 8.90 (s, 1 H, H¹¹), 9.34 (br, 2 H, H¹⁵), 11.7 (br, 2 H, H¹⁶); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 51.4 (C^{6'}), 58.7-60.8 (C^{6'}), 70.5-74.0 (C^{2, 2', 3, 3', 5, 5',}), 80.8-84.0 (C^{4, 4',}), 101.5-102.9 (C^{1, 1',}), 122.3 (C⁷), 122.7 (C⁷), 126.8 (C⁹), 127.2 (C⁹), 128.9 (C¹²), 129.3 (C¹²), 131.0 (C¹³), 143.2 (C⁸), 143.4 (C⁸), 146.7 (C¹⁰), 146.9 (C¹⁰), 148.1 (C¹¹), 148.5 (C¹¹), 162.3 (C¹⁴); MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 1478.1 (98 %, M-2O+H⁺), 1494.2 (86 %, M-O+H⁺), 1500.2 (60 %, M-2O+Na⁺), 1510.2 (45 %, M+H⁺), 1516.2 (100 %, M-O+Na⁺), 1532.2 (70 %, M+Na⁺), 1548.2 (12 %, M+K⁺); Elementaranalyse berechnet für C₅₈H₈₀N₁₀O₃₇ · 4 H₂O · C₃H₆O: C 44.69, H 5.78, N 8.54; gefunden C 44.97, H 5.81, N 8.31.

6-(4-(Hydrazincarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-deoxy- β -cyclodextrin (β 38₁)

Propargylsäuremethylester wurde mit **42**^[109] nach der unter 7.3.2 beschriebenen allgemeinen Vorschrift umgesetzt. Das erhaltene Zwischenprodukt **β 100₁** (200 mg, 161 μ mol, 1 eq.) wurde in Wasser (3 ml) gelöst und mit Hydrazinmonohydrat (0.50 ml)

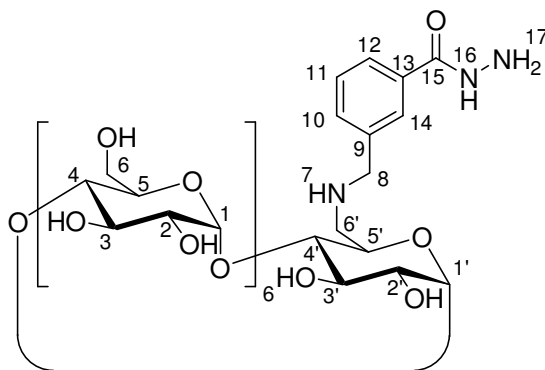
versetzt. Nach 2 d Rühren bei 25 °C wurde die Reaktionsmischung in Aceton gegossen, der Feststoff abfiltriert und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode B aufgereinigt.



Ausbeute: 50.1 mg (40.3 μmol , 25 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 2.81 (br, 1 H, $\text{H}^{6'}$), 2.99-3.01 (m, 1 H, $\text{H}^{6'}$), 3.30-3.45 (m, 20 H, $\text{H}^{2, 2', 4, 4', 6}$), 3.55-3.79 (m, 20 H, $\text{H}^{3, 5, 6, 11}$), 4.06-4.08 (m, 1 H, $\text{H}^{3'}$), 4.30 (br, 1 H, $\text{H}^{5'}$), 4.47-5.02 (m, 7 H, $\text{H}^{1, 1'}$), 5.63-5.93 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2, 2', 3, 3'}$), 8.50-8.67 (m, 1 H, H^7), 10.32 (s, 1 H, H^{10}); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100.6 MHz) δ 50.9 ($\text{C}^{6'}$), 58.8-60.4 (C^6), 69.9-73.3 ($\text{C}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 80.8-83.5 ($\text{C}^{4, 4'}$), 101.2-102.3 ($\text{C}^{1, 1'}$), 127.7 (C^7), 141.7, 141.8, 156.0, 159.5; MS (MALDI-TOF) m/z (%) 1251.9 (100 %, $\text{M-NH}_2+\text{Na}^+$), 1266.9 (69 %, $\text{M}+\text{Na}^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{N}_5\text{O}_{35} \cdot 2 \text{H}_2\text{O} \cdot 1 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: C 43.08, H 6.25, N 5.23 gefunden: C 42.88, H 6.58, N 5.45.

6-(3-(Hydrazinocarbonyl)benzylamino)-6-deoxy- β -cyclodextrin (β39_1)

Das Zwischenprodukt β63_1 (400 mg, 312 μmol) wurde in DMF (5 ml) gelöst, mit Hydrazinmonohydrat (156 mg, 151 μl , 3.12 mmol) versetzt und für 18 h bei 25 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Aceton gegossen, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und nach der unter 7.3.1 beschriebenen Methode A aufgereinigt.



Ausbeute: 36 mg (28.0 μmol , 9 %), farbloser Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ 2.73-2.79 (m, 1 H, $\text{H}^{6'}$), 2.89-2.94 (m, 1 H, $\text{H}^{6'}$), 3.21-4.7 (m, 13 H, $\text{H}^{4, 6, 4'}$), 3.58-3.75 (m, 29 H, $\text{H}^{2, 2', 3, 3', 5, 5', 6, 8}$), 4.47 (s, 6 H, H_{OH}^6), 4.55 (s, 1 H, H^7), 4.83 (s, 7 H, $\text{H}^{1, 1'}$), 5.69-5.82 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{OH}}^{2, 2', 3, 3'}$), 7.34-7.41 (m, 1 H, H^{10}), 7.45-7.50 (m, 1 H, H^{11}), 7.64 (d, 1 H, $J(\text{H}, \text{H}) = 7.8 \text{ Hz}$, H^{12}), 7.75 (s, 1 H, H^{14}), 9.72 (s, 2 H, H^{17}), 10.39 (s, 1 H, H^{16}); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100.6 MHz) δ 46.5 ($\text{C}^{6'}$), 52.9 (C^8), 59.9 (C^6), 70.7-73.0 ($\text{C}^{2, 2', 3, 3', 5, 5'}$), 81.6-83.7 (C^4), 102.0-102.4 (C^1), 125.0 (C^{14}), 126.5 (C^{12}), 128.1 (C^{11}), 130.4 (C^{10}), 133.2 (C^9), 141.3 (C^{13}), 166.2 (C^{15}); MS (MALDI-TOF) m/z

(%) 1267.7 (100 %, $M+H^+-NH$), 1282.7 (73 %, $M+H^+$), 1304.7 (3 %, $M+Na^+$); Elementaranalyse berechnet (%) für $C_{50}H_{79}N_3O_{35} \cdot 2 H_2O$: C 45.56, H 6.35, N 3.19; gefunden C 45.34, H 6.44, N 2.72.

8. Literaturverzeichnis

- ¹ J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, **2003**, 5, 3-8274-1303-6, 353-354.
- ² J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, **2003**, 5, 3-8274-1303-6, 131.
- ³ K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Elsevier GmbH München, **2005**, 9, 3-437-42521-8, 757.
- ⁴ P. Nuhn, *Naturstoffchemie*, S. Hirzel Verlag Stuttgart, **2006**, 4, 3-7776-1363-0, 21-22.
- ⁵ G. Schrader, *Monograph. Angew. Chem.* **1951**, 62, 1-31.
- ⁶ G. Schrader, *Angew. Chem.* **1950**, 62, 471-473.
- ⁷ G. Schrader, *Angew. Chem.* **1957**, 69, 86-90.
- ⁸ H. Thiermann, K. Kehe, D. Steinritz, J. Mikler, I. Hill, T. Zilker, P. Eyer, F. Worek, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **2007**, 58, 359-366.
- ⁹ R. T. Delfino, T. S. Ribeiro, J. D. Figueroa-Villar, *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 407-428.
- ¹⁰ M. Balali-Mood, H. Saber, *Ir. J. Med. Sci.* **2012**, 37, 74-91.
- ¹¹ C. M. Theriot, A. M. Grunden, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 89, 35-43.
- ¹² Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW), **1992**, Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and their Destruction.
- ¹³ Disarmament forum, UNIDIR **2002**, ISSN 1020-7287.
- ¹⁴ Report of the Third Special Session of the Conference of the States Parties to Review the Operation of the Chemical Weapons Convention, 3rd Review Conference 08.04.2013-19.04.2013, Den Haag, **2013**.
- ¹⁵ D. M. Maxwell, K. M. Brecht, I. Koplovitz, R. E. Sweeney, *Arch. Toxicol.* **2006**, 80, 756-760.
- ¹⁶ B. K. Singh, A. Walker, *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, 30, 428-471.
- ¹⁷ D. M. Quinn, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 955-979.
- ¹⁸ E. Carletti, J.-P. Colletier, F. Dupeux, M. Trovaslet, P. Masson, F. Nachon, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 4002-4008.
- ¹⁹ C. B. Millard, G. Koellner, A. Ordentlich, A. Shafferman, I. Silman, J. L. Sussman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9983-9884.
- ²⁰ B. Sanson, F. Nachon, J.-P. Colletier, M.-T. Froment, L. Toker, H. M. Greenblatt, J. L. Sussman, Y. Ashani, P. Masson, I. Silman, M. Weik, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7593-7603.
- ²¹ G. Mercey, T. Verdelet, J. Renou, M. Kliachyna, R. Baati, F. Nachon, L. Jean, P.-Y. Renard, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 756-766.
- ²² E. A. Sandilands, A. M. Good, D. N. Bateman, *Emerg. Med. J.* **2009**, 26, 690-694.
- ²³ J. H. McDonough Jr., J. McMonagle, T. Copeland, D. Zoeffel, T.-M. Shih, *Arch. Toxicol.* **1999**, 73, 473-478.
- ²⁴ P. M. Lundy, M. G. Hamilton, T. W. Sawyer, J. Mikler, *Toxicology* **2011**, 285, 90-96.
- ²⁵ M. C. de Koning, M. van Grol, D. Noort, *Toxicol. Lett.* **2011**, 206, 54-59.
- ²⁶ T. Wille, H. Thiermann, F. Worek, *Wehrmedizinische Monatsschrift* **12/2011**.

- ²⁷ G. A. Petroianu, D. E. Lorke, M. Y. Hasan, A. Adem, R. Sheen, S. M. Nurulain, H. Kalasz, *J. Appl. Toxicol.* **2007**, *27*, 350-357.
- ²⁸ D. E. Lorke, M. Y. Hasan, S. M. Nurulain, R. Sheen, K. Kuca, G. A. Petroianu, *J. Appl. Toxicol.* **2007**, *27*, 482-490.
- ²⁹ F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer, *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2237-2248.
- ³⁰ J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1753.
- ³¹ F. Bellia, D. La Mendola, C. Pedone, E. Rizzarelli, M. Saviano, G. Vecchio, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2756-2781.
- ³² G. Wenz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 851-870; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 803-822.
- ³³ E. M. Martin Del Valle, *Process. Biochem.* **2004**, *39*, 1033-1046.
- ³⁴ J. Szejtli, *Starch/Stärke* **1982**, *11*, 379-385.
- ³⁵ M. Naguib, *Anesth. Analg.* **2007**, *104*, 575-581.
- ³⁶ Römpp Online, Thieme **16.04.2013**.
- ³⁷ W. Saenger, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 343-361; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, *19*, 344-362.
- ³⁸ B. Uno, N. Kaida, T. Kawakita, K. Kano, T. Kubota, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 3753-3759.
- ³⁹ M. J. Jozwiakowski, K. A. Connors, *Carbohydr. Res.* **1985**, *143*, 51-59.
- ⁴⁰ K. A. Connors, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325-1357.
- ⁴¹ W. Saenger, M. Noltemeyer, P. C. Manor, B. Hingerty, B. Klar, *Bioorg. Chem.* **1976**, *5*, 187-195.
- ⁴² M. Ohashi, K. Kasatani, H. Shinohara, H. Sato, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5830-5837.
- ⁴³ I. Tabushi, Y. Kiyosuke, T. Sugimoto, K. Yamamura, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 916-919.
- ⁴⁴ G. Barone, G. Castronuovo, P. Del Vecchio, V. Elia, M. Muscetta, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1986**, *82*, 2089-2101.
- ⁴⁵ M. Kitagawa, H. Hoshi, M. Sakurai, Y. Inoue, R. Chujo, *Carbohydr. Res.* **1987**, *163*, c1-c3.
- ⁴⁶ G. Castronuovo, V. Elia, D. Fessas, A. Giordano, F. Velleca, *Carbohydr. Res.* **1995**, *272*, 31-39.
- ⁴⁷ T. Kinoshita, F. Ilnuma, A. Tsuji, *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 2413-2420.
- ⁴⁸ M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875-1917.
- ⁴⁹ P. W. Atkins, *Kurzlehrbuch Physikalische Chemie*, WILEY-VCH Weinheim, **2002**, *3*, 3-527-30433-9, 421-422.
- ⁵⁰ K. Takahashi, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2013-2033.
- ⁵¹ M. Yashiro, T. Takarada, S. Miyama, M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, *0*, 1757-1758.
- ⁵² C.-H. Zhou, D.-Q. Yuan, R.-G. Xie, *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 43-46.
- ⁵³ E. Monflier, G. Fremy, Y. Castanet, A. Mortreux, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2450-2452; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 2269-2271.
- ⁵⁴ D. C. Rideout, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7817-7818.
- ⁵⁵ H.-J. Schneider, N. K. Sangwan, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 924-925; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, *26*, 896-897.
- ⁵⁶ R. Breslow, S. D. Dong, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1997-2011.
- ⁵⁷ R. Breslow, P. Campbell, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3085.

- ⁵⁸ R. Breslow, P. Campbell, *Bioorg. Chem.* **1971**, *1*, 140-156.
- ⁵⁹ R. Breslow, H. Kahn, B. Siegel, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *20*, 1645-1646.
- ⁶⁰ R. L. Van Etter, G. A. Clowes, J. F. Sebastian, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3253-3262.
- ⁶¹ R. L. Van Etter, J. F. Sebastian, G. A. Clowes, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3242-3253.
- ⁶² V. Yeguas, R. López, A. Lambert, G. Monard, M. F. Ruiz-López, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4346-4355.
- ⁶³ R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 146-153.
- ⁶⁴ D. L. Zechel, S. G. Withers, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11-18.
- ⁶⁵ F. Ortega-Caballero, J. Bjerre, L. S. Laustsen, M. Bols, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7217-7226.
- ⁶⁶ J. Bjerre, M. Bols, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3487-3500.
- ⁶⁷ C. Rousseau, F. Ortega-Caballero, L. U. Nordstrøm, B. Christensen, T. E. Petersen, M. Bols, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5094-5101.
- ⁶⁸ Y. Zhou, E. Lindbäck, L. G. Marinescu, C. M. Pedersen, M. Bols, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 4063-4070.
- ⁶⁹ R. Breslow, L. E. Overman, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *92*, 1075-1077.
- ⁷⁰ R. Breslow, X. Zhang, Y. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4535-4536.
- ⁷¹ M. L. Singleton, J. H. Reibenspies, M. Y. Darensbourg, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8870-8871.
- ⁷² R. Breslow, A. Graff, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10988-10989.
- ⁷³ J. M. Desper, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12081-12082.
- ⁷⁴ R. Breslow, C. Schmuck, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6601-6605.
- ⁷⁵ C. van Hooijdonk, C. C. Groos, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1970**, *89*, 845-856.
- ⁷⁶ C. van Hooijdonk, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1972**, *91*, 1103-1109.
- ⁷⁷ C. van Hooijdonk, J. C. A. E. Breebaart-Hansen, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1970**, *89*, 289-299.
- ⁷⁸ B. Desire, S. Saint-Andre, *Fund. Appl. Toxicol.* **1986**, *7*, 646-657.
- ⁷⁹ D. Rong, V. T. D'Souza, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4275-4278.
- ⁸⁰ F. C. G. Hoskin, D. M. Steeves, J. E. Walker, *Biol. Bull.* **1999**, *197*, 284-285.
- ⁸¹ N. Masurier, F. Estour, M.-T. Froment, B. Lefèvre, J.-C. Debouzy, B. Brasme, P. Masson, O. Lafont, *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 615-623.
- ⁸² S. Müller, M. Koller, R. Le Provost, O. Lafont, F. Estour, T. Wille, H. Thiermann, F. Worek, G. Reiter, *Toxicol. Lett.* **2011**, *200*, 53-58.
- ⁸³ R. Le Provost, T. Wille, L. Louise, N. Masurier, S. Müller, G. Reiter, P.-Y. Renard, O. Lafont, F. Worek, F. Estour, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3026-3032.
- ⁸⁴ E. Carletti, N. Aurbek, E. Gillon, M. Loiodice, Y. Nicolet, J.-C. Fontecilla-Camps, P. Masson, H. Thiermann, F. Nachon, F. Worek, *Biochem. J.* **2009**, *421*, 97-106.
- ⁸⁵ P.-C. Tsai, N. Fox, A. N. Bigley, S. P. Harvey, D. P. Barondeau, F. M. Raushel, *Biochemistry* **2012**, *51*, 6463-6475.
- ⁸⁶ K. Kim, O. G. Tsay, D. A. Atwood, D. G. Churchill, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5345-5403.

- ⁸⁷ T. Wille, H. Thiermann, F. Worek, *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 1026-1031.
- ⁸⁸ A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, V. T. D'Souza, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977-1996.
- ⁸⁹ L. Krejčí, M. Buděšínský, I. Císařová, T. Kraus, *Chem. Commun.* **2009**, 3557-3559.
- ⁹⁰ M. Atsumi, M. Izumida, D.-Q. Yuan, K. Fujita, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8117-8120.
- ⁹¹ L. Porwol, Diplomarbeit **2012**, *Substituierte β -Cyclodextrinderivate mit Nucleophilen Zentren an der weiteren Öffnung des Cyclodextrinrings als Scavenger für Neurotoxische Organophosph(on)ate*, Diplomarbeit, TU Kaiserslautern **2012**.
- ⁹² R. P. Bonomo, V. Cucinotta, F. D'Alessandro, G. Impellizzeri, G. Maccerrone, G. Vecchio, E. Rizzarelli, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 2708-2713.
- ⁹³ M. McNaughton, L. Engman, A. Birmingham, G. Powis, I. A. Cotgreave, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 233-239.
- ⁹⁴ R. Breslow, J. W. Canary, M. Varney, S. T. Waddell, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5212-5219.
- ⁹⁵ I. Tabushi, K. Yamamura, T. Nabeshima, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5267-5270.
- ⁹⁶ A. J. Pearce, P. Sinaÿ, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3756-3758; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3610-3612.
- ⁹⁷ A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 94-95; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 78-80.
- ⁹⁸ P. R. Ashton, R. Königer, J. F. Stoddart, D. Alker, V. D. Harding, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 903-908.
- ⁹⁹ K. Chmurski, J. Defaye, *Supramol. Chem.* **2000**, *12*, 221-224.
- ¹⁰⁰ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708-2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- ¹⁰¹ P.-A. Faugeras, B. Boëns, P.-H. Elchinger, F. Brouillette, D. Montplaisir, R. Zerrouki, R. Lucas, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 4087-4105.
- ¹⁰² D. A. Pratt, R. P. Pesavento, W. A. van der Donk, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2735-2738.
- ¹⁰³ R. M. Tarkka, E. Buncl, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1503-1507.
- ¹⁰⁴ N. J. Fina, J. O. Edwards, *Int. J. Chem. Kin.* **1973**, *5*, 1-26.
- ¹⁰⁵ I.-H. Um, J.-Y. Hong, E. Buncl, *Chem. Commun.* **2001**, 27-28.
- ¹⁰⁶ D. J. Hupe, D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7653-7659.
- ¹⁰⁷ Y. S. Simanenko, T. M. Prokop'eva, A. F. Popov, C. A. Bunton, E. A. Karpichev, V. A. Savelova, K. K. Ghosh, *Russ. J. Org. Chem.* **2004**, *40*, 1337-1350.
- ¹⁰⁸ R. P. Bonomo, V. Cucinotta, F. D'Alessandro, G. Impellizzeri, G. Maccarrone, G. Vecchio, E. Rizzarelli, *Inorg. Chem.* **1991**, *13*, 2708-2713.
- ¹⁰⁹ K. Hamasaki, H. Ikeda, A. Nakamura, A. Ueno, F. Toda, I. Suzuki, T. Osa, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5035-5040.
- ¹¹⁰ K. Hamasaki, H. Ikeda, A. Nakamura, A. Ueno, F. Toda, I. Suzuka, T. Osa, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5035-5040.
- ¹¹¹ M. E. Davis, H. Gonzalez, and S. Hwang (California Institute of Technology, Pasadena, Calif., US), DE69935526T2, **1999**.
- ¹¹² I. Tabushi, K. Shimokawa, K. Fujita, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 1527-1530.

- ¹¹³ T. Sato, H. Nakamura, Y. Ohno, T. Endo, *Carbohydr. Res.* **1990**, *199*, 31-35.
- ¹¹⁴ N. Mourtzis, K. Eliadou, C. Aggelidou, V. Sophianopoulou, I. M. Mavridis, and K. Yannakopoulou, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 125-131.
- ¹¹⁵ J. M. García Fernández, C. O. Mellet, J. L. Jiménez Blanco, J. F. Mota, A. Gabelle, A. Coste-Sarguet, J. Defaye, *Carbohydr. Res.* **1995**, *268*, 57-71.
- ¹¹⁶ P. R. Skaanderupp, C. S. Poulsen, L. Hyldtoft, M. R. Jørgensen, R. Madsen, *Synthesis* **2002**, *12*, 1721-1727.
- ¹¹⁷ P. Wang, G.-J. Shen, Y.-F. Wang, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3985-3990.
- ¹¹⁸ S. Marchesan, D. Macmillan, *Chem. Commun.* **2008**, 4321-4323.
- ¹¹⁹ T. Sugiyama, H. Iwasawa, T. Hashizume, *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 1057-1060.
- ¹²⁰ D. W. P. M. Löwik, C. R. Lowe, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2825-2839.
- ¹²¹ V. V. Levin, A. A. Zemtsov, M. I. Struchkova, A. D. Dilman, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 917-919.
- ¹²² V. Dvomikovs, D. B. Smithrud, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2160-2167.
- ¹²³ Y. Okada, M. Yokozawa, M. Akiba, K. Oishi, K. Okawa, T. Akeboshi, Y. Kawamura, S. Inokuma, Y. Nakamura, J. Nishimura, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2506-2511.
- ¹²⁴ M. D. Clift, R. B. Silverman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3122-3125.
- ¹²⁵ D. Tanner, O. Wennerström, *Acta Chem. Scand., Ser. B* **1983**, *37*, 693-698.
- ¹²⁶ S. Ginsburg, I. B. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 481-485.
- ¹²⁷ R. Chinchilla, C. Nájera, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5084-5121.
- ¹²⁸ B. M. Anderson, C. J. Ciotti, N. O. Kaplan, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 1219-1225.
- ¹²⁹ N. I. Martin, J. J. Woodward, M. A. Marletta, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4035-4038.
- ¹³⁰ T. Suzuki, Y. Ota, Y. Kasuya, M. Mutsuga, Y. Kawamura, H. Tsumoto, H. Nakagawa, M. G. Finn, N. Miyata, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6969-6972; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6817-6820.
- ¹³¹ C. S. Beshara, A. Hall, R. L. Jenkins, K. L. Jones, T. C. Jones, N. M. Killeen, P. H. Taylor, S. P. Thomas, N. C. O. Tomkinson, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5729-5732.
- ¹³² A. V. Gudmundsdottir, C. E. Paul, M. Nitz, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 278-284.
- ¹³³ T. Suzuki, Y. Ota, M. Ri, M. Bando, A. Gotoh, Y. Itoh, H. Tsumoto, P. R. Tatum, T. Mizukami, H. Nakagawa, S. Iida, R. Ueda, K. Shirahige, N. Miyata, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9562-9575.
- ¹³⁴ G. Gilbert, T. Wagner-Jauregg, G. M. Steinberg, *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**, *93*, 468-475.
- ¹³⁵ K. Gupta, S. Giri, P. Chattaraj, *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1945-1952.
- ¹³⁶ C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 324-329.
- ¹³⁷ B. M. Trost, G. Dong, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6910-6919.
- ¹³⁸ S. R. Safir, J. H. Williams, *J. Org. Chem.* **1952**, *17*, 1298-1301.
- ¹³⁹ R. Ramesh, S. Rajasekaran, R. Gupta, S. Chandrasekaran, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1933-1936.
- ¹⁴⁰ K. Banert, S. Groth, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 865-867; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 866-868.

- ¹⁴¹ A. Schlatter, M. K. Kundu, W.-D. Woggon, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6899-6902; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6731-6734.
- ¹⁴² A. Steffen, C. Thiele, S. Tietze, C. Strassnig, A. Kämper, T. Legauer, G. Wenz, J. Apostolakis, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6801-6809.
- ¹⁴³ K. Hamasaki, A. Ueno, *Chem. Lett.* **1995**, 859-860.
- ¹⁴⁴ A. L. Green, B. Saville, *J. Chem. Soc.* **1956**, *0*, 3887-3892.
- ¹⁴⁵ B. E. Hackley, R. Plapinger, M. Stolberg, T. Wagner-Jauregg, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3651-3653.
- ¹⁴⁶ D. Vizitiu, C. S. Walkinshaw, B. I. Gorin, G. R. J. Thatcher, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8760-8766.
- ¹⁴⁷ T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- ¹⁴⁸ Y. Nagawa, K. Honda, H. Nakanishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 2931-2935.
- ¹⁴⁹ K. Park, T. Palani, A. Pyo, S. Lee, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 733-737.
- ¹⁵⁰ G. Wenz, C. Strassnig, C. Thiele, A. Engelke, B. Morgenstern, K. Hegetschweiler, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7202-7211.
- ¹⁵¹ D.-Q. Yuan, S. Immel, K. Koga, M. Yamaguchi, K. Fujita, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3501-3506.
- ¹⁵² T. Wille, H. Thiermann, F. Worek, *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 1026-1031.
- ¹⁵³ F. Worek, U. Mast, D. Kiderlen, C. Diepold, P. Eyer, *Clin. Chim. Acta* **1999**, *288*, 73-90.
- ¹⁵⁴ F. Brandhuber, Dissertation **2013**, *Prüfung der Wirksamkeit modifizierter Cyclodextrine als Therapeutika bei Organophosphatvergiftungen*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- ¹⁵⁵ T. Wille, O. Tenberken, G. Reiter, S. Müller, R. Le Provost, O. Lafont, F. Estour, H. Thiermann, F. Worek, *Toxicology* **2009**, *265*, 96-100.
- ¹⁵⁶ A. Albert, J. N. Phillips, *J. Chem. Soc.* **1956**, 1294-1304.
- ¹⁵⁷ F. Terrier, G. Moutiers, L. Xiao, E. Le Guével, F. Guirj, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1748-1754.
- ¹⁵⁸ A. L. Green, B. Saville, *J. Chem. Soc.* **1956**, 3887-3892.
- ¹⁵⁹ G. Becker, A. Kawan, L. Szinicz, *Arch. Toxicol.* **1997**, *71*, 714-718.
- ¹⁶⁰ Y. Ashani, A. K. Bhattacharjee, H. Leader, A. Saxena, B. P. Doctor, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 191-202.
- ¹⁶¹ G. M. Steinberg, S. Solomon, *Biochemistry* **1966**, *5*, 3142-3150.
- ¹⁶² P. Eyer, W. Hell, A. Kawan, H. Klehr, *Arch. Toxicol.* **1986**, *59*, 266-271.
- ¹⁶³ L. P. A De Jong, D. I. Ceulen, *Biochem. Pharmacol.* **1978**, *27*, 857-863.
- ¹⁶⁴ M. Nenner, *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 1255-1262.
- ¹⁶⁵ S. F. Mason, *J. Chem. Soc.* **1960**, 20-26.
- ¹⁶⁶ S. Guieu, M. Sollogoub, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7168-7171; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7060-7063.
- ¹⁶⁷ L. Larsson, *Acta. Chem. Scand.* **1953**, *7*, 306-314.
- ¹⁶⁸ J. Beneš, *Acta. Chem. Scand.* **1963**, *17*, 1783-1785.
- ¹⁶⁹ R. Swindler, R. E. Plapinger, G. M. Steinberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 3271-3274.
- ¹⁷⁰ L. Bauer, O. Exner, *Angew. Chem.* **1974**, *86*, 419-428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1974**, *13*, 376-384.
- ¹⁷¹ R. Swindler, G. M. Steinberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2618-2620.

- ¹⁷² B. E. Hackley, R. Plapinger, M. Stolberg, T. Wagner-Jauregg, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3651-3653.
- ¹⁷³ E. S. Orth, P. L. F. da Silva, R. S. Mello, C. A. Bunton, H. M. S. Milagre, M. N. Eberlin, H. D. Fiedler, F. Nome, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5011-5016.
- ¹⁷⁴ Y.-C. Yang, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 109-115.
- ¹⁷⁵ K. A. Daniel, L. A. Kopff, E. V. Patterson, *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 321-328.
- ¹⁷⁶ C. Wiles, P. Watts, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1360-1371.
- ¹⁷⁷ K. D. Danze, M. C. F. Ma, F. Pineux, F. Hof, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1512-1515.
- ¹⁷⁸ J.-M. Bernardon, P. Nedoncelle (Centre International de Recherches Dermatologiques Galderma, Valbonne, Fr), EP0879814B1, 1998.
- ¹⁷⁹ Y. Yasu, T. Koike, M. Akita, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2037-2039.
- ¹⁸⁰ P. Jain, J. T. Slama, A. L. Perez-Haddock, T. F. Walseth, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7599-7612.
- ¹⁸¹ M. Mourer, F. Hapiot, S. Tilloy, E. Monflier, S. Menuel, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5723-5730.
- ¹⁸² F. Brandhuber, M. Zengerle, L. Porwol, A. Bierwisch, M. Koller, G. Reiter, F. Worek, S. Kubik, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3425-3427.

Lebenslauf

Michael Zengerle

Doktorarbeit

12/2009-04/2013 Technische Universität Kaiserslautern, Arbeitsgruppe Prof. Stefan Kubik
„Cyclodextrine als Wirkstoffe zur Behandlung akuter Organophosph(on)atvergiftungen“

Hochschulausbildung

12/2008-09/2009 Diplomarbeit
Technische Universität Kaiserslautern, Arbeitsgruppe Prof. Stefan Kubik
„Untersuchungen zur Eignung der Iminbildung für die Darstellung verbrückter Biscyclopeptide“

10/2004-09/2009 Chemiestudium, Technische Universität Kaiserslautern
Schwerpunkt: Organische Chemie
Nebenfächer: Anorganische-, Technische-, Physikalische- und Biochemie

Studienbegleitende Praktika

07/2008-08/2008 Forschungspraktikum, Arbeitsgruppe Prof. Stefan Kubik, Technische Universität Kaiserslautern
„Synthese eines Cyclohexapeptids mit Pyrroluntereinheiten“

03/2008-06/2008 Forschungspraktikum, Arbeitsgruppe Prof. David A. Leigh, University of Edinburgh
“Towards the Active Template Synthesis of a Molecular Trefoil Knot”

11/2007-12/2007 Forschungspraktikum, Arbeitsgruppe Prof. Werner R. Thiel, Technische Universität Kaiserslautern
“Synthese von (R)-2-Carbamoyl-2'-(diphenylphosphinoyl)-1,1'-binaphthyl als Vorstufe für einen enantiomerenreinen Triazol-Posphin-Binaphthyl-Liganden”

Schulbildung

2001-2004 Technisches Gymnasium Ludwigshafen, Abschluss: Abitur