

Cyclopeptid-basierte Rezeptoren zur Erkennung und Detektion von Anionen in Wasser

vom Fachbereich Chemie der
Technischen Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

D 386



Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 27.10.2017

vorgelegt von
Fabian Sommer
geboren in Homburg

Betreuer: Prof. Dr. S. Kubik

Kaiserslautern, 2017

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Kubik im Zeitraum von Mai 2013 bis März 2017 im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Werner R. Thiel

Betreuer: Prof. Dr. Stefan Kubik

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Markus Gerhards

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Kubik

2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Jens Hartung

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 Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Kaiserslautern, den _____

Fabian Sommer

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- *Anion binding of a neutral bis(cyclopeptide) in water-methanol mixtures containing up to 95 % water.* F. Sommer, S. Kubik, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 8851–8860.
- *Effects of Solvent Properties on the Anion-Binding of Neutral Water-Soluble Bis(cyclopeptides) in Water and Aqueous Solvent Mixtures.* F. Sommer, Y. Marcus, S. Kubik, *ACS Omega* **2017**, 2, 3669–3680.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Stefan Kubik für die Aufnahme in den Arbeitskreis und für die Bereitstellung der interessanten Themen dieser Dissertation. Weiter möchte ich ihm für die vielen hilfreichen Diskussionen und die stete Hilfsbereitschaft danken.

Prof. Hanna Radecka und Prof. Jerzy Radecki (Olsztyn, Polen) danke ich für die aufschlussreichen Gespräche und die Kooperationsbereitschaft, wodurch das Kapitel „Modifikation von Au-Oberflächen mit CPs zur Entwicklung eines Sensors“ inspiriert wurde. Im Zusammenhang mit diesem Projekt möchte ich außerdem Prof. Wim Dehaen (Leuven, Belgien) danken, der eine wichtige Verbindung zur Verfügung stellte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projekts „Modifikation von Au-NPs mit CPs zur Entwicklung optischer Sonden“ dieser Arbeit.

Weiterer Dank gilt den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises Sebastian Anders, Beatrice Andrae, Julia Bartl, Daniel Bauer, Alexander Ganß, Laura Gilbert, Michaela Klische, Arnold Leidner, Viktoria Leonhardt, Ligia Mesquita, Disha Mungalpara, Stefanie Noé, Lena Reinke, Björn Schäfgen, Astrid Schaly, Stephanie Scheib, Theresa Schitter, Steffen Schlicher, Christian Schneider, Serap Yapar und Michael Zengerle für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Laboralltag und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Meinen Forschungspraktikanten Julia Bartl, Annika Bernhardt, Patrick Gaß und Jaqueline Pollini danke ich für ihre in verschiedenen Teilen dieser Dissertation geleisteten Beiträge sowie deren vorbildliche Motivation und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Weiterer Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitskreise von Prof. Dr.-Ing. Jens Hartung, Prof. Lukas J. Gooßen und Jr.-Prof. Dr. Frederic W. Patureau für die angenehme Zusammenarbeit während dieser Zeit. Zudem möchte ich Prof. Dr.-Ing. Jens Hartung für die Anfertigung des Zweitgutachtens sowie Prof. Dr. Markus Gerhards für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission danken.

Dr. Harald Kelm sowie Frau Christiane Müller danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Prof. Dr. Sandro Keller aus dem Fachbereich Biophysik danke ich für hilfreiche Diskussionen und Unterstützung bei der Auswertung diverser Bindungsstudien.

Allen Mitarbeitern der Analytikabteilung der organischen Chemie danke ich für die durchgeführten Elementaranalysen.

Ich danke allen Mitarbeitern der Physikalischen Chemie für die unkomplizierte Mitbenutzung des MALDI/TOF- und ATR-IR-Gerätes und speziell Annika Steiner, Max Gaffga und Johannes Lang für die Durchführung von ESI/MS-Messungen.

Weiterer Dank gilt Ludvik Napast, Jürgen Rahm und Frank Schröder, die neben der Bereitstellung von Chemikalien auch bei apparativen Problemen und Reparaturen stets hilfreich zur Seite standen.

Ich danke ebenfalls den Mitarbeitern der Glasbläserei für die Reparaturen und Spezialanfertigungen und nicht zuletzt den Mitarbeitern der Sonderabfallsammelstelle.

Für die Hilfe bei organisatorischen und administrativen Angelegenheiten danke ich Frau Susanne Zeigner aus dem Sekretariat der organischen Chemie und Frau Heike Schramm aus dem Dekanat.

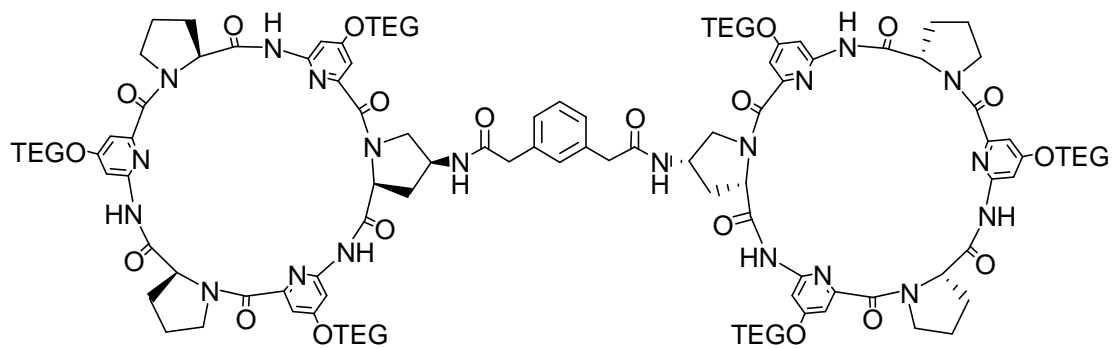
Ein großer Dank geht an meine Familie und Freunde, die mit ihrer Motivation und Hilfsbereitschaft zum Erfolg dieser Arbeit in großem Maße beigetragen haben.

Abkürzungsverzeichnis

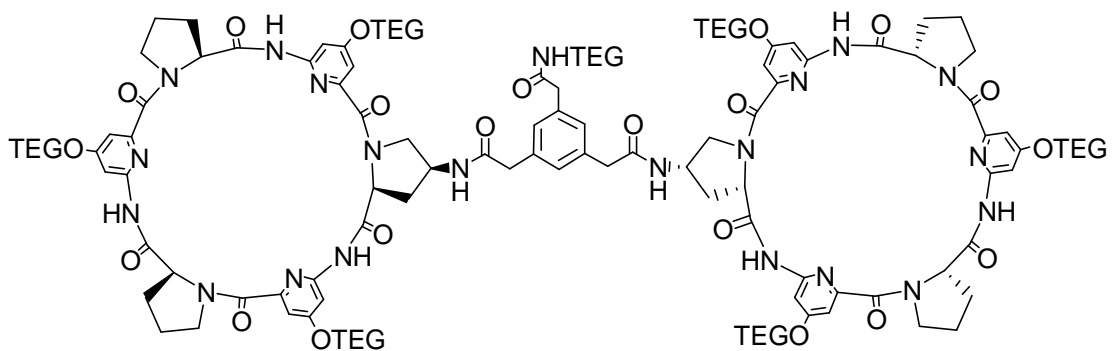
α	H-Brücken Donoracidität
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
All	Allyl
Au-Elektrode	Goldelektrode
Au-NP	Goldnanopartikel
Au-Oberfläche	Goldoberfläche
β	H-Brücken Akzeptorbasizität
BCP	Bis(cyclopeptid)
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CP	Cyclopeptid
d	Tage
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIEA	<i>N, N</i> -Diisopropylethylamin
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DPPA	Diphenylphosphorylazid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI	Elektrospray Ionisation
h	Stunden
HE	Hydrophober Effekt
HO-TEG	2-[2-(2-Methoxyethoxy)-ethoxy]-ethanol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrarotspektroskopie
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K_a	Bindungskonstante
M	Molar
MALDI	Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation

min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
<i>m/z</i>	Masse/Ladungs-Verhältnis
N	Normal
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanz)
PBP	Phosphat-bindendes Protein
PFP	Pentafluorphenyl
ppm	Parts per million
PyCloP	Chlortripyrrolidinphosphoniumhexafluorophosphat
RP	Reversed Phase
SBP	Sulfat-bindendes Protein
SPR	Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonenresonanz)
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N, N, N', N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time of Flight
<i>t_R</i>	Retentionszeit
UV/Vis	Absorptionsspektroskopie im UV/Vis-Bereich
(<i>v/v</i>)	Verhältnis volume to volume
Z	Benzyloxycarbonyl

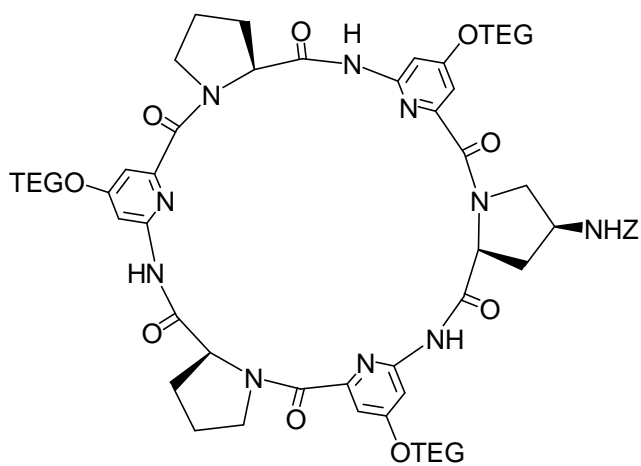
Auswahl zentraler Zielverbindungen dieser Arbeit



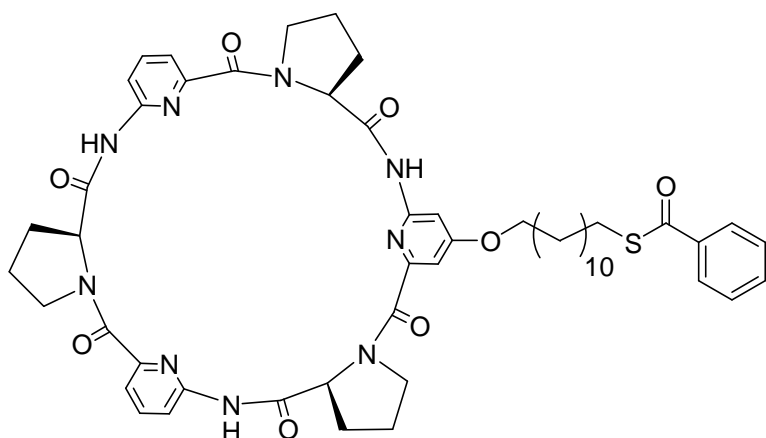
BCP1



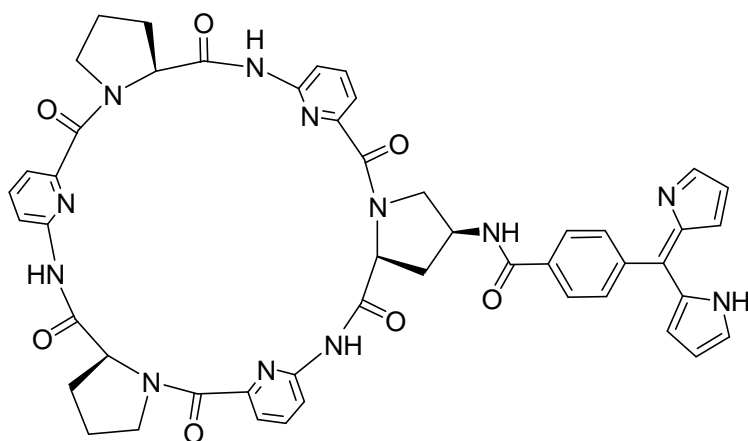
BCP2



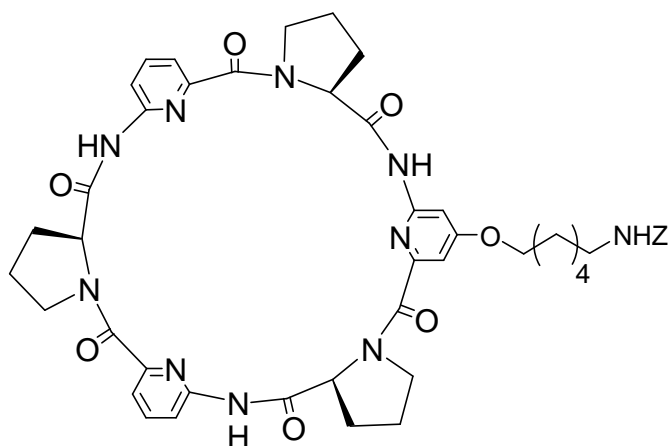
CP1



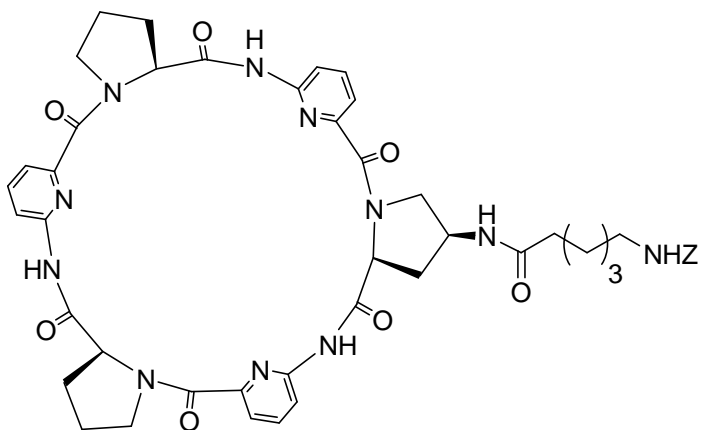
CP2



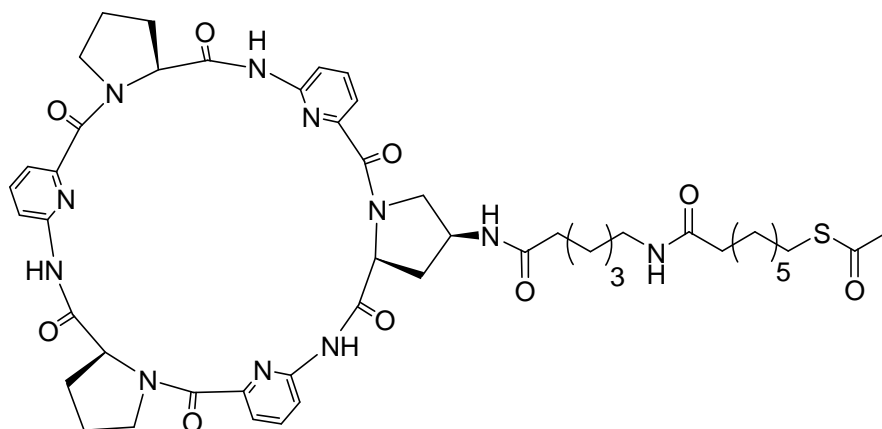
CP3



CP10



CP11



L_{CP}^{Ac}

1	Einleitung.....	1
1.1	Natur als Vorbild für die Anionenerkennung.....	1
1.2	Der Hydrophobe Effekt.....	2
1.3	Der Hofmeister-Effekt.....	5
1.4	Synthetische Rezeptoren in Wasser	7
2	Bis(cyclopeptide) zur Anionenerkennung in wässrigen Medien....	11
2.1	Kenntnisstand.....	11
2.1.1	Cyclopeptide zur Anionenerkennung.....	11
2.1.2	Bis(cyclopeptide).....	13
2.2	Charakterisierung der Anionenaffinität von BCP1 in Wasser/Methanol-Gemischen.....	22
2.2.1	Aufgabenstellung.....	22
2.2.2	Synthese von BCP1.....	23
2.2.3	Bindungsstudien mit BCP1	29
2.2.4	Forschungsartikel: Anion binding of a neutral bis(cyclopeptide) in water-methanol mixtures containing up to 95 % water	34
2.3	Charakterisierung der Anionenaffinität von BCP1 und BCP2 in Wasser und verschiedenen Lösungsmitteln	45
2.3.1	Aufgabenstellung.....	45
2.3.2	Synthese von BCP2.....	46
2.3.3	Bindungsstudien mit BCP2 in Wasser	48
2.3.4	Bindungsstudien mit BCP1 in den reinen Lösungsmitteln	50
2.3.5	Bindungsstudien mit BCP1 in Lösungsmittelgemischen.....	54
2.3.6	Forschungsartikel: Effects of Solvent Properties on the Anion-Binding of Neutral Water-Soluble Bis(cyclopeptides) in Water and Aqueous Solvent Mixtures	60
2.4	Zusammenfassung	73
3	Cyclopeptide zur Immobilisierung auf Gold	75
3.1	Kenntnisstand.....	75
3.1.1	Sensoren und Sonden.....	75
3.1.2	Modifizierte Au-Oberflächen für elektrochemische Sensoren.....	76
3.1.3	Modifizierte Au-Nanopartikel für optische Sonden	79

Teil A: Modifikation von Au-Oberflächen mit CPs zur Entwicklung eines Sensors	85
3.2 Aufgabenstellung	85
3.3 Ergebnisse und Diskussion	87
3.3.1 Syntheseplanungen	87
3.3.2 Synthese von CP2	90
3.3.3 Synthese von CP3	101
3.4 Zusammenfassung	106
Teil B: Modifikation von Au-NPs mit CPs zur Entwicklung optischer Sonden	107
3.5 Aufgabenstellung	107
3.6 Ergebnisse und Diskussion	110
3.6.1 Syntheseplanungen	110
3.6.2 Synthese von CP10	112
3.6.3 Synthese von CP11	116
3.6.4 Synthese der Liganden	117
3.6.5 Synthese der Au-NPs	119
3.6.6 Versuche zur Immobilisierung von Liganden auf Au-NPs.....	121
3.6.6.1 Austauschreaktionen mit Au-NP _{Citrat}	122
3.6.6.2 Austauschreaktionen mit Au-NP _{Amin}	126
3.6.7 Qualitative Untersuchung von Au-NP _{TEG/CP} bezüglich der Anionenaffinität.....	132
3.7 Zusammenfassung und Ausblick	134
4 Experimenteller Teil.....	135
4.1 Verwendete Chemikalien, Analytik und Apparatives	135
4.2 Allgemeine Vorschriften.....	139
4.2.1 Spaltung von Acetylgruppen unter sauren Bedingungen.....	139
4.2.2 Spaltung von Boc-Gruppen in 4 N HCl in 1,4-Dioxan	139
4.2.3 Spaltung von Estergruppen mit NaOH.....	139
4.2.4 Spaltung von Z-Gruppen mit H ₂ /Pd	139
4.2.5 Iodabbau von Au-NPs	140
4.3 Synthesen zu „Bis(cyclopeptide) zur Anionenerkennung in wässrigen Medien“	141
4.3.1 Synthese von Boc-((2 <i>S</i> , 4 <i>S</i>)-4 <i>Z</i> -Aminoprolin (17)	141

4.3.2	Benzyl-6-ethoxycarbonyl-4-[2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]-pyridin-2-ylcarbamate (15) ..	144
4.4	Synthesen zu „Cyclopeptide zur Immobilisierung auf Gold“	148
4.4.1	6-Allyloxycarbonyl-4-(12-bromododecyloxy)-picolinsäure (34)	148
4.4.2	<i>tert</i> -Butyl-6-(ethyloxycarbonyl)-4-(12-bromododecyloxy)-pyridin-2-ylcarbamate (38) und Benzyl-6-ethyloxycarbonyl-4-(bromododecyloxy)-pyridin-2-carbamate (39)	151
4.4.3	<i>tert</i> -Butyl-6-(ethoxycarbonyl)-4-(benzylhexylcarbamate-1-yloxy)-pyridin-2-yl-carbamate (63)	156
4.4.4	Methyl-6-aminopyridin-2-carboxylate (42)	161
4.4.5	Synthese der Dipeptide	161
4.4.6	Synthese des Tetrapeptids und der linearen Hexapeptide	166
4.4.7	Synthese und Derivatisierung der Cyclopeptide	168
4.4.8	Synthese der Liganden zur Modifikation von Au-Nanopartikeln	181
4.4.9	Synthese der Au-NPs	188
4.4.10	Immobilisierung der Liganden auf den Au-NPs	189
5	Literaturverzeichnis	204
6	Anhang	209
6.1	Supporting Information zu Kapitel 2.2.4	209
6.2	Supporting Information zu Kapitel 2.3.6	229

1 Einleitung

1.1 Natur als Vorbild für die Anionenerkennung

Anionen haben einen wichtigen Stellenwert in der belebten Natur. So sind beispielsweise eine Vielzahl der an biochemischen Prozessen beteiligten Co-Faktoren und Substrate negativ geladen.^[1] Ein Beispiel für einen natürlichen Anionenrezeptor ist das Phosphat-bindende Protein (PBP, Abbildung 1a)), welches ein desolvatisiertes HPO_4^{2-} -Anion über insgesamt 12 Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brückenbindungen) mit einer Bindungskonstante von $K_a = 3.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ in Wasser komplexiert.^[2,3] Die Substratselektivität wird durch die exakte Anordnung von H-Brücken Donor- sowie Akzeptorstellen erreicht. Dabei sind die Salzbrücke zwischen dem Anion und der Guanidiniumgruppe eines Argininrests und die H-Brücke zwischen dem Proton des HPO_4^{2-} -Anions und der Carboxylatgruppe eines Aspartatrests im aktiven Zentrum besonders charakteristische Erkennungsmotive des PBP.

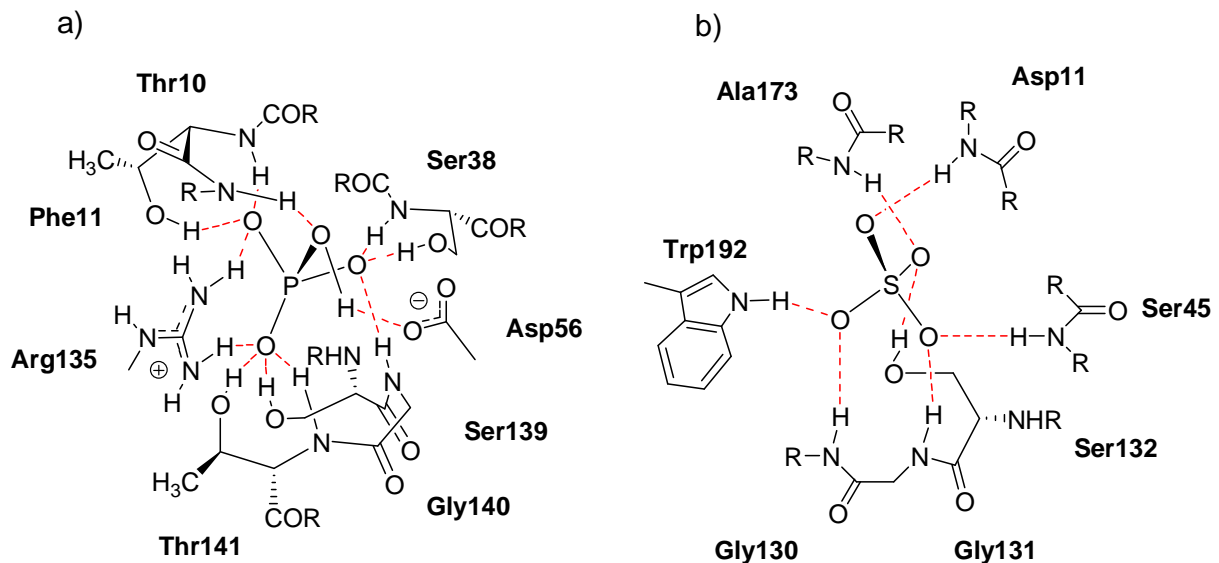


Abbildung 1 Bindungsmotive des a) PBP und des b) SBP. Rot dargestellt sind die H-Brücken-Wechselwirkungen in den aktiven Zentren der beiden Proteine.

Ein weiteres Beispiel ist das Sulfat-bindende Protein (SBP, Abbildung 1b)), welches für den Anionentransport in dem Bakterium *Salmonella typhimurium* verantwortlich ist.^[4-6] Hier wird das Sulfatanion über insgesamt sieben H-Brückenbindungen mit einer Bindungskonstante von $K_a = 8.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ gebunden.^[7] Die Affinität für das Substrat ist somit

eine halbe Größenordnung höher als die des PBP, obwohl weniger H-Brücken und keine Coulomb-Wechselwirkungen zur Bindung beitragen. Die Ursache für die hohe Affinität ist, dass das Anion im aktiven Zentrum des SBP sehr effektiv vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt und perfekt zu den Bindungsstellen positioniert ist.

1.2 Der Hydrophobe Effekt

Das Lösungsmittel Wasser hat charakteristische Eigenschaften, die einen entscheidenden Einfluss auf molekulare Erkennungsvorgänge ausüben. Wesentliche Faktoren sind die starken intermolekularen H-Brücken zwischen Wassermolekülen und das daraus resultierende dynamische Netzwerk, in dem jedes Wassermolekül im zeitlichen Mittel an ca. 3.5 H-Brücken beteiligt ist.^[8] Für die Bildung dieser H-Brücken sind die hohe H-Brücken Donoracidität der Wassermoleküle von $\alpha = 1.17$ (Referenzwert Methanol, $\alpha = 1.00$) sowie die als moderat einzustufende H-Brücken Akzeptorbasizität von $\beta = 0.47$ (Referenzwert Hexamethylphosphortriamid, $\beta = 1.00$) verantwortlich.^[9] Maßgeblich bedingt durch das Netzwerk von Wassermolekülen wird in wässrigen Medien der sogenannte hydrophobe Effekt (HE) beobachtet.^[10] Dieser immer noch nicht komplett verstandene Effekt tritt ausschließlich in Wasser sowie in wässrigen Lösungsmittelgemischen auf und wird in reinen organischen Gemischen nicht beobachtet. Er soll im Folgenden erläutert werden.

Integriert man in ein Netzwerk aus Wassermolekülen ein kleines, sphärisches und hydrophobes Molekül (Abbildung 2a)), so können sich die umgebenden Wassermoleküle umorganisieren ohne dass es zu einem energetisch ungünstigen Bruch von H-Brücken kommt. Darum ist die Solvatisierung von kleinen hydrophoben Molekülen zwar mit einem ungünstigen entropischen Beitrag verbunden, der enthalpische Beitrag kann aber sogar günstig sein, wenn H-Brücken durch die Solvatisierung verstärkt werden. Lagern sich zwei unpolare Moleküle in Wasser zusammen, ist der Vorgang entsprechend zumeist enthalpisch etwa neutral aber entropisch günstig, da für die Solvataion der beiden assoziierten Moleküle weniger Wassermoleküle benötigt werden als für die Solvataion der Einzelmoleküle. Bei der Assoziation werden also aus den Solvathüllen der gelösten Moleküle Wassermoleküle entlassen, sodass die Assoziation zweier hydrophober Moleküle ein entropiegetriebener Prozess ist, was charakteristisch für den sogenannten „klassischen hydrophoben Effekt“ ist.

Beim Übergang zu einem größeren ($>10 \text{ \AA}$ Durchmesser) hydrophoben Molekül (Abbildung 2b)) mit konvexer Oberfläche kommt es zu einem Enthalpie/Entropie-Übergang.

1 EINLEITUNG

Es ist aufgrund der Größe des hydrophoben Moleküls nun nicht mehr möglich, alle H-Brücken zwischen Wassermolekülen aufrecht zu erhalten. Dadurch ist die Solvatisierung eines hydrophoben Moleküls von einem ungünstigen enthalpischen Beitrag dominiert. Allerdings ist die Solvatisierung entropisch begünstigt, was darauf zurückzuführen ist, dass die Ordnung des Netzwerks bei der Einlagerung des Moleküls massiv gestört wird. Die Zusammenlagerung zweier großer hydrophober Moleküle ist dementsprechend enthalpisch begünstigt aber entropisch ungünstig. Man spricht in diesem Fall von dem „nicht-klassischen hydrophoben Effekt“.

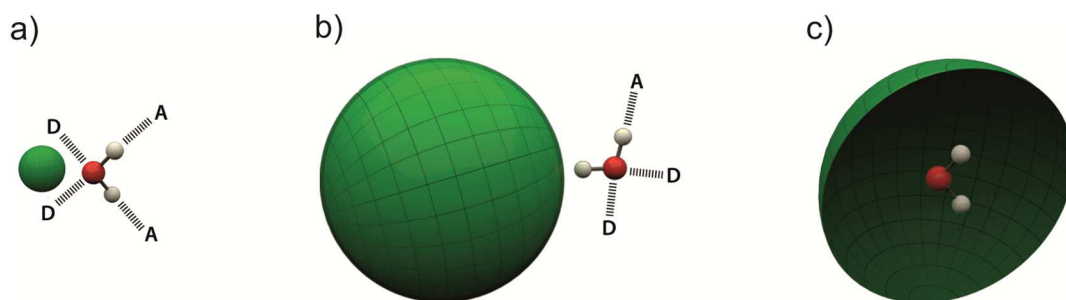


Abbildung 2 Hydrophobe Moleküle in Wasser und deren Effekt auf H-Brücken a) kleines sphärisches Molekül; b) großes sphärisches Molekül; c) großes konkaves Molekül. Reprinted (adapted) with permission from M. B. Hillyer, B. C. Gibb, *Annu. Rev. Phys. Chem* 2016, 67, 307–329.

Betrachtet man statt eines sphärischen hydrophoben Moleküls mit positiver Oberflächenkrümmung (Abbildung 2a) bzw. b)) eines mit einer negativen Oberflächenkrümmung (Abbildung 2c)), so ergeben sich etwas andere Verhältnisse. Die Wassermoleküle, die den hydrophoben Hohlraum ausfüllen, können deutlich weniger H-Brücken zu Bindungspartnern ausbilden als in reinem Wasser. Im Extremfall muss die Kavität von einem isolierten Wassermolekül besetzt werden. Es entstehen sogenannte „High-Energy“^[11] Wassermoleküle, was erklärt, warum die Solvatisierung von hydrophoben Hohlräumen in Wasser enthalpisch sehr ungünstig ist. Dabei wird der Enthalpiebeitrag der Solvatisierung umso ungünstiger, je weniger H-Brücken die gebundenen Wassermoleküle ausbilden können. Entropisch ist diese Solvatisierung sogar leicht günstig, da Wassermoleküle von dem hochgeordneten H-Brücken Netzwerk in einen etwas weniger geordneten Zustand übergehen.

Bei Komplexierung eines Gastmoleküls (beispielsweise eines Anions) in einer solchen hydrophoben Kavität werden die darin gebundenen Wassermoleküle (Abbildung 2c)) freigesetzt, was zu einem enthalpischen Energiegewinn führt, die Komplexierungsenthalpie

1 EINLEITUNG

ist also negativ. Ein Beispiel hierfür wurde 2014 von Isaacs *et al.* beschrieben.^[12] Dabei handelt es sich um Cucurbit[7]uril **2** (Abbildung 3a)), das den kationischen organischen Gast **3** (Abbildung 3c)) mit Bindungskonstanten von bis zu $K_a = 10^{17} \text{ M}^{-1}$ in Wasser mit stark exothermer Wärmetönung (bis zu $\Delta H = -90 \text{ kJ/mol}$) komplexiert. Das elektrostatische Potential (Abbildung 3b)) von dem kleineren Cucurbit[6]uril **1** zeigt, dass seine hydrophobe Kavität eine negative Potentialoberfläche besitzt, wodurch eine günstige Wechselwirkung mit dem Kation möglich ist. Diese Kation-Dipol-Wechselwirkung sowie das Entlassen von High-Energy Wassermolekülen aus der hydrophoben Kavität während der Komplexbildung erklären die günstige Komplexbildungsenthalpie und die äußerst hohe Komplexstabilität.

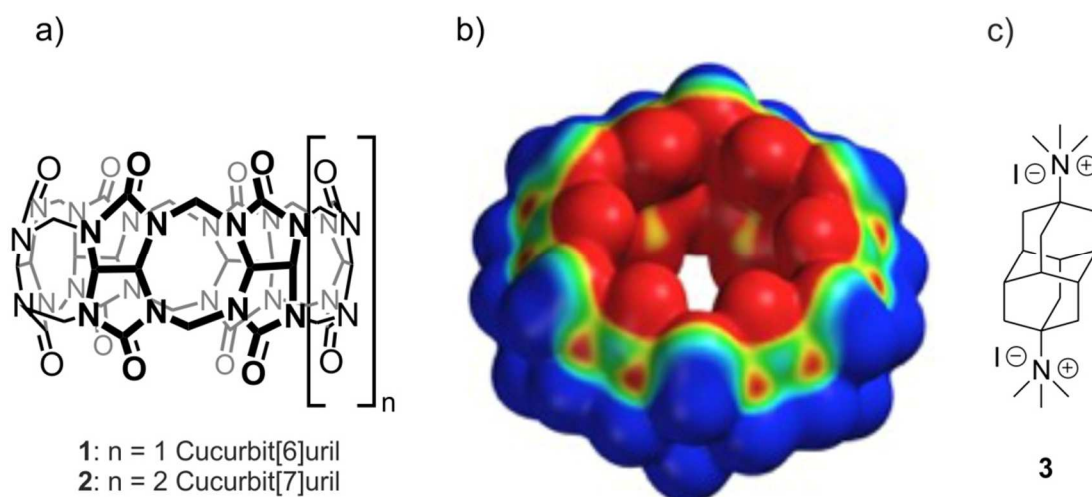


Abbildung 3 a) Strukturen von Cucurbit[6]uril **1** und Cucurbit[7]uril **2**; b) elektrostatische Potentialoberfläche von **1**; c) Struktur des Diamantans-Diammonium Salzes **3**, welches von Isaacs untersucht wurde.^[12]

Die bei organischen Gastmolekülen wirksamen Prinzipien der Komplexbildung lassen sich allerdings nicht ohne weiteres auf anorganische Anionen als Substrate übertragen. Der Hauptgrund ist deren starke Hydratisierung in Wasser. So beträgt im Fall von SO_4^{2-} die Hydratationsenthalpie $\Delta H_{\text{hydr}} = -1035 \text{ kJ/mol}$.^[13] Diese Energie muss bei der Komplexbildung von Sulfatanionen zunächst aufgewendet werden, um das Anion von der Solvathülle zu befreien. Danach kann es in der Kavität eines Rezeptors gebunden werden, wobei die Effizienz der Bindung den für die Dehydratisierung notwendigen Energiebetrag überkompensieren muss. Allerdings kommt es bei der Bindung auch zur Freisetzung der

1 EINLEITUNG

Wassermoleküle aus der Solvathülle des Anions, welche entropisch günstig ist und somit die Komplexbildung positiv beeinflusst.

1.3 Der Hofmeister-Effekt

Dass Salze die Löslichkeit eines in Wasser gelösten Makromoleküls beeinflussen können, wurde bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts von Franz Hofmeister gezeigt.^[14] In seinen systematischen Untersuchungen versetzte er eine wässrige Lösung von Hühnerei Globulin mit steigenden Mengen verschiedener Salze und überprüfte, ob es zu einem Ausflocken des Proteins kommt. Hofmeister fand eine Abhängigkeit der Tendenz des Proteins aus der Lösung auszufallen von der Art des Salzes. Dabei haben die Anionen in dem Salz einen stärkeren Effekt als die Kationen, weshalb im Folgenden nur die Anionen diskutiert werden.

Auf Basis seiner Ergebnisse sortierte Hofmeister die Anionen nach ihrer Tendenz, die Löslichkeit von Hühnerei Globulin zu erhöhen bzw. zu erniedrigen. Ein Ausschnitt dieser sogenannten Hofmeister-Serie ist in Abbildung 4 für verschiedene Anionen gezeigt.

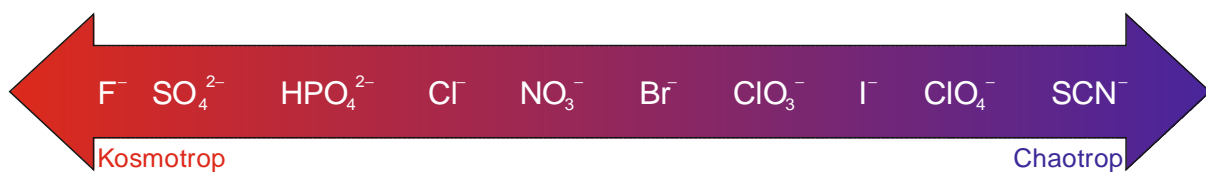


Abbildung 4 Ausschnitt der Hofmeister-Serie für Anionen.

Anionen, die in der gezeigten Auflistung weiter links stehen, wie F^- und SO_4^{2-} , führen zum Ausfallen des Proteins. Deren Salze werden aufgrund dieses Verhaltens auch als „salting-out“ Salze bezeichnet. Daneben bezeichnet man diese Anionen als „kosmotrop“. Sie verstärken den oben beschriebenen HE, also die Zusammenlagerung hydrophober Moleküle in wässriger Lösung. Anionen, die in der Hofmeister-Serie eher rechts angeordnet sind, wie ClO_4^- und SCN^- , haben einen gegenläufigen Effekt. Diese Anionen erhöhen die Löslichkeit von Proteinen und ihre Salze werden entsprechend auch als „salting-in“ Salze bezeichnet. Heute ist der Begriff „chaotrope“ Anionen geläufiger. Diese Anionen schwächen den HE.

Die genauen Ursachen für diesen Hofmeister-Effekt sind noch nicht ganz klar. 2011 konnten C. L. D. Gibb und B. C. Gibb allerdings zeigen, dass chaotrope Anionen eine

1 EINLEITUNG

Affinität für hydrophobe Kavitäten besitzen und darin gebunden werden.^[15] Diese Bindung konkurriert mit der Bindung von sphärischen hydrophoben Substraten, deren Affinität zu dem entsprechenden Rezeptor also sinkt. In diesen Arbeiten wurde die Bindung des Adamantyl-Derivats **5** an den amphiphilen Rezeptor **4** (Abbildung 5) in Ab- und Anwesenheit diverser Salze (Natriumsalze von: F^- , SO_4^{2-} , AcO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_3^- , I^- , SCN^- , ClO_4^-) mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht.

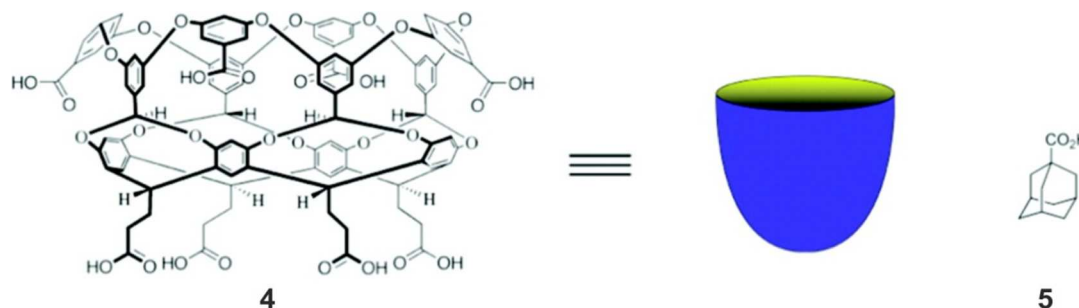


Abbildung 5 Von Gibb und Gibb verwendeter Rezeptor **4** sowie das komplexierte Adamantylderivat **5**. Reprinted (adapted) with permission from C. L. D. Gibb, B. C. Gibb, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 7344–7347, Copyright 2011 American Chemical Society.

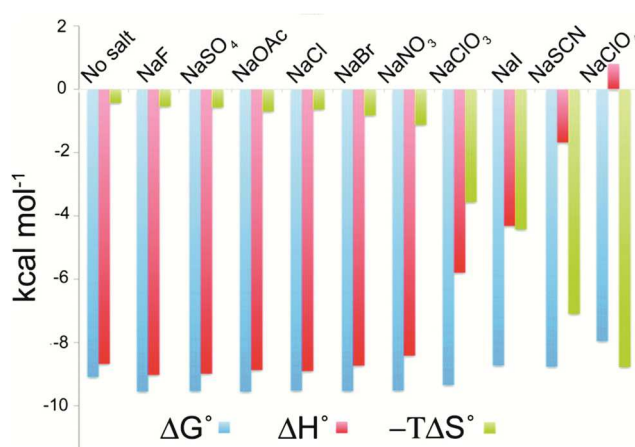


Abbildung 6 Einfluss der Anwesenheit diverser Hofmeister-Salze auf die thermodynamische Signatur der Komplexbildung von **5** in dem Rezeptor **4**. Reprinted (adapted) with permission from C. L. D. Gibb, B. C. Gibb, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 7344–7347, Copyright 2011 American Chemical Society.

Kosmotrope (F^- , SO_4^{2-}) und in der Hofmeister-Serie mittig angeordnete Anionen, wie Cl^- oder Br^- , stabilisieren den Komplex zwischen **4** und **5** um ca. ~ 2 kJ/mol im Vergleich zur Komplexstabilität in Abwesenheit von Anionen (Abbildung 6). Diese Anionen verstärken also den HE. Dabei kommt der Energiegewinn durch leicht günstigere enthalpische und entropische Beiträge zur Komplexbildung zustande.

In Gegenwart von chaotropen Anionen, wie I^- , SCN^- oder ClO_4^- , nimmt in dieser Reihenfolge der günstige enthalpische Beitrag zur Komplexbildung sukzessive ab, während der günstige entropische Beitrag zunehmend steigt bis die Komplexbildung entropisch stark dominiert wird. Die Komplexstabilität in Gegenwart dieser Anionen sinkt allerdings um bis zu 6 kJ/mol, was gleichbedeutend mit einer Abschwächung des HE ist.

Die Anwesenheit von Anionen hat somit Auswirkung auf die Löslichkeit von Makromolekülen und dem Komplexierungsverhalten synthetischer Rezeptoren in wässrigen Medien. Aufschluss über diese Effekte liefert oft die Charakterisierung der Anionenaffinität mittels ITC und die systematische Untersuchung der enthalpischen und entropischen Beiträge zur Komplexbildung.

1.4 Synthetische Rezeptoren in Wasser

Lange Zeit wurde angenommen, dass für eine effektive Anionenbindung in Wasser starke Wechselwirkungsarten wie Ion-Ion-Wechselwirkungen zwischen einem positiv geladenen Rezeptor und dem negativ geladenen Substrat oder die Koordination des Anions an Lewis-acide Metallzentren nötig sind. Jedoch ist dies nicht zwingend der Fall, wenn Effekte wie der HE für die Anionenbindung mitverantwortlich sind.

Einen interessanten Rezeptor zur Anionenerkennung in Wasser stellte kürzlich die Gruppe um Pittelkow vor. Es handelt sich um das sogenannte Biotin[6]uril **6** (Abbildung 7), das in einem Schritt ausgehend von Biotin dargestellt werden kann.^[16] Durch die 12 nach innen gerichteten C-H Gruppen entsteht eine hydrophobe Kavität, in der Anionen gebunden werden können.

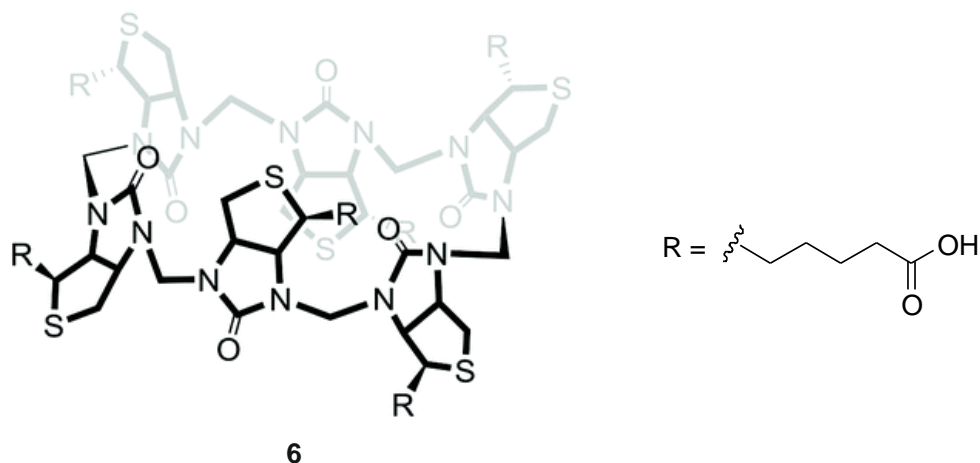


Abbildung 7 Struktur von Biotin[6]juril **6** nach Pittelkow *et al.* Reprinted (adapted) with permission from M. Lisbjerg, B. E. Nielsen, B. O. Milhøj, S. P. A. Sauer, M. Pittelkow, *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 369–373 - Published by The Royal Society of Chemistry.

In Bindungsstudien wurde gezeigt, dass dieser Rezeptor eine breite Auswahl verschiedener Anionen (Halogenide, Cyanate, N_3^- , NO_3^- und ClO_4^-) in Wasser bindet.^[17] Dabei wurden mittels ITC auch die thermodynamischen Parameter der Komplexbildung bestimmt (in 100 mM Phosphatpuffer bei 30 °C). Es zeigte sich, dass kleine Anionen wie Cl^- und NO_3^- ($\log K_a = 1.5$ bzw. 1.7) vergleichsweise schwach gebunden werden, während größere Anionen, wie I^- und SCN^- , deutlich stabilere Komplexe bilden ($\log K_a = 3.4$ bzw. 4.1). In allen Fällen ist die Komplexbildung enthalpiegetrieben mit ΔH bis zu -42.8 kJ/mol für die Iodidkomplexbildung. Weiter ist die Komplexbildung für alle untersuchten Anionen entropisch ungünstig, wieder mit dem Maximalwert für die Bildung des Iodidkomplexes bei $T\Delta S = -23.0$ kJ/mol. Die beobachteten Affinitäten erklären die Autoren durch die Balance zwischen dem Anionendurchmesser sowie der Härte/Weichheit der untersuchten Anionen.

Betrachtet man das elektrostatische Potential (Abbildung 8a) + b)) dieses Rezeptors, so findet man eine Analogie zu den Bambus[n]urilen, die von Sindelar *et al.* beschrieben wurden (Abbildung 9).^[18,19]

1 EINLEITUNG

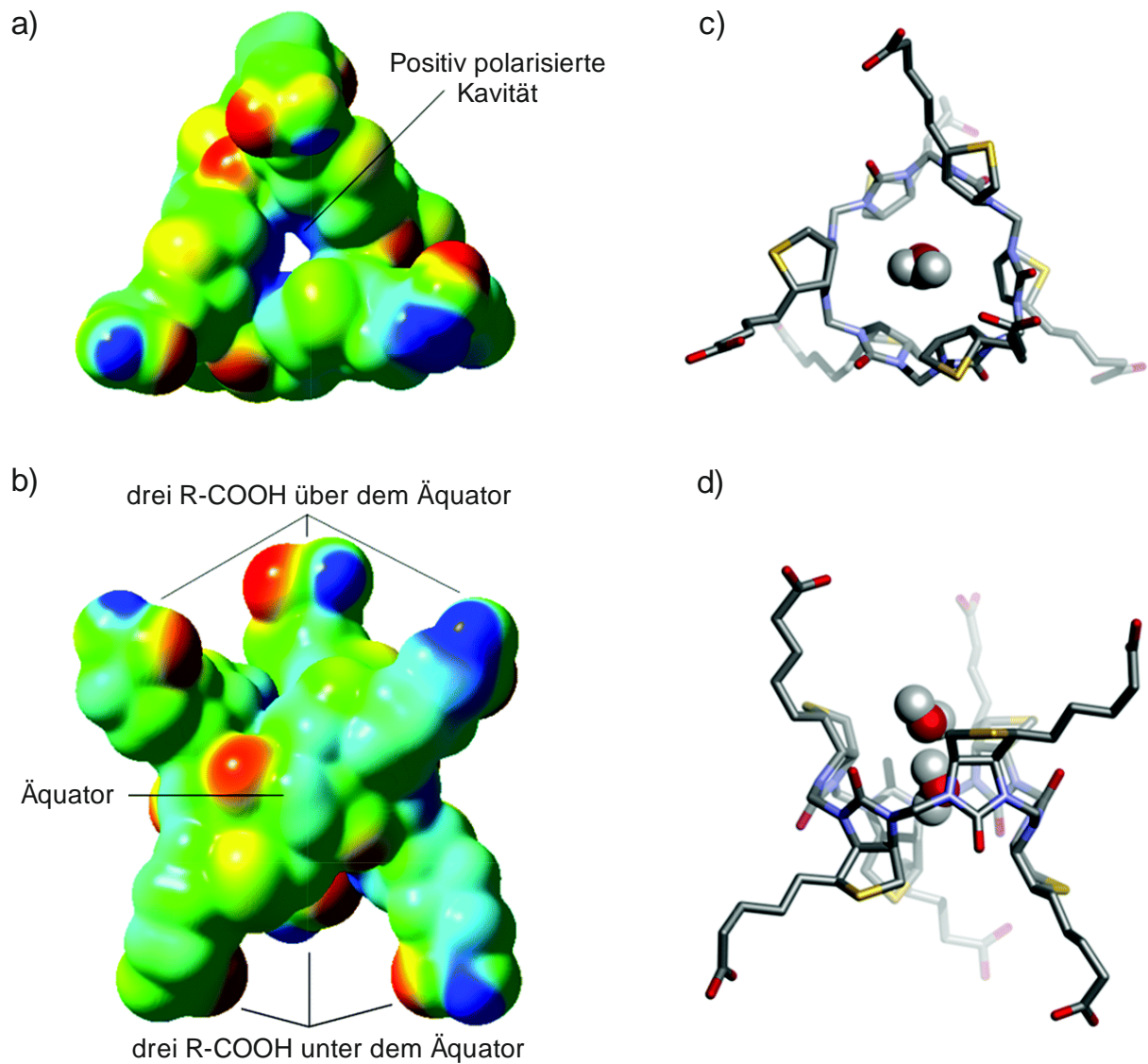


Abbildung 8 Elektrostatisches Potential a) von oben b) von der Seite von **6**; Kristallstruktur c) von oben d) von der Seite von **6**. Reprinted (adapted) with permission from M. Lisbjerg, B. E. Nielsen, B. O. Milhøj, S. P. A. Sauer, M. Pittelkow, *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 369–373 - Published by The Royal Society of Chemistry.

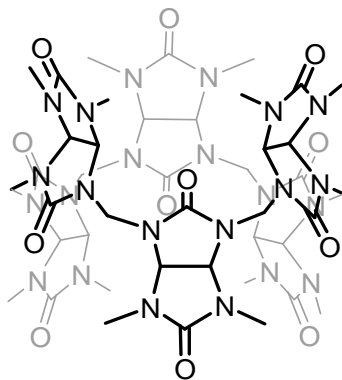


Abbildung 9 Beispiel eines von Sindelar et al. vorgestellten Bambus[n]urils mit $n = 6$.

1 EINLEITUNG

So ist das elektrostatische Potential im Inneren der Kavität, der Bindungsstelle für Anionen, positiv. Im Gegensatz dazu sieht man, dass in den äußeren sauerstoffhaltigen Regionen sowie den Regionen mit den Harnstoff-Carbonylgruppen das Potential negativ ist. Die Schwefelatome führen an den entsprechenden Stellen ebenfalls zu einem leicht negativen elektrostatischen Potential. Eine Wechselwirkung mit Kationen tritt in der Peripherie des Rezeptors laut den Autoren aufgrund der alternierenden Anordnung der Harnstoffcarbonyle entlang des Äquators nicht auf.

Wie in den Kristallstrukturen zu sehen ist (Abbildung 8c) + d)), befinden sich in der Kavität des Rezeptors **6** zwei Wassermoleküle, die untereinander H-Brücken ausbilden. Die beobachtete vorteilhafte Enthalpie bei Komplexbildung kommt durch das Entlassen der High-Energy Wassermoleküle aus der hydrophoben Kavität zustande (nicht-klassischer HE).

Die Gruppe um Jolliffe beschrieb Rezeptoren im Gebiet der Cyclopeptide mit ebenfalls interessanten Bindungseigenschaften. In Abbildung 10 ist ein von dieser Gruppe beschriebenes cyclisches Tripeptid, aufgebaut aus Oxazolinheiten, gezeigt, welches in den Seitenketten *p*-Trifluormethylphenylgruppen-substituierte Thioharnstoffgruppen trägt.^[20] Von diesem Rezeptor wird SO_4^{2-} effektiv in 25 Vol% $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$ mit einer Bindungskonstante $>10^4 \text{ M}^{-1}$ gebunden. Analoge Rezeptoren ohne die aromatischen Substituenten zeigen im gleichen Lösungsmittelgemisch eine signifikant geringere Affinität. Die Autoren erklären dieses Ergebnis mit hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Seitenketten, die nur in dem Rezeptor mit Trifluormethylphenylgruppen vorhanden sind und die bei Komplexbildung in räumliche Nähe gelangen.

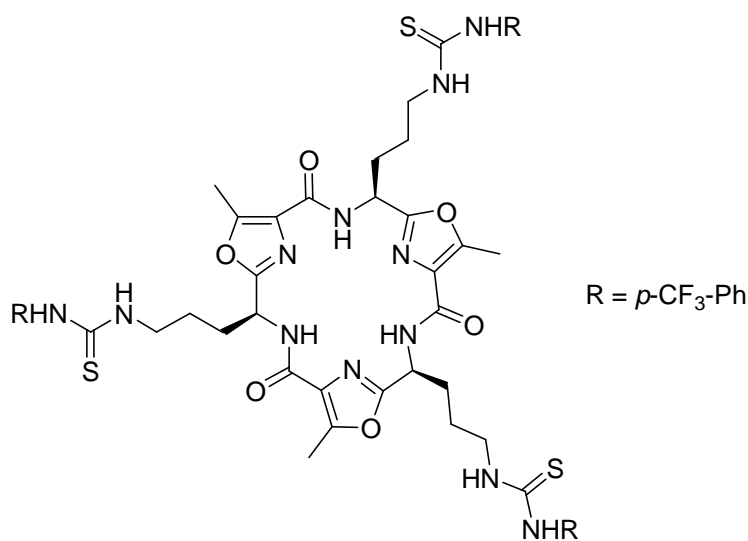


Abbildung 10 Tripodaler Rezeptor von Jolliffe.

2 Bis(cyclopeptide) zur Anionenerkennung in wässrigen Medien

2.1 Kenntnisstand

2.1.1 Cyclopeptide zur Anionenerkennung

Von S. Kubik wurde 2001 das Cyclopeptid (CP) **7**, aufgebaut aus einer alternierenden Abfolge von L-Prolin- und 6-Aminopicolinsäureeinheiten, beschrieben, das eine Affinität für Anionen in wässrigen Lösungsmittelgemischen aufweist.^[21] Dieses CP ist im Gegensatz zu Analoga mit Aminobenzoesäureeinheiten^[22,23] anstelle der Aminopicolinsäureeinheiten (Abbildung 11a)) besser für die Anionenbindung vororganisiert, da die drei NH-Gruppen ins Innere des makrocyclischen Hohlraums gerichtet sind. Diese Vororganisation ist auf die freien Elektronenpaare an den Ringstickstoffatomen zurückzuführen, die Konformationen der Amidgruppen in 6-Position destabilisieren, in denen die Carbonylgruppen in Richtung der Ringstickstoffatome ausgerichtet sind (Abbildung 11b)).

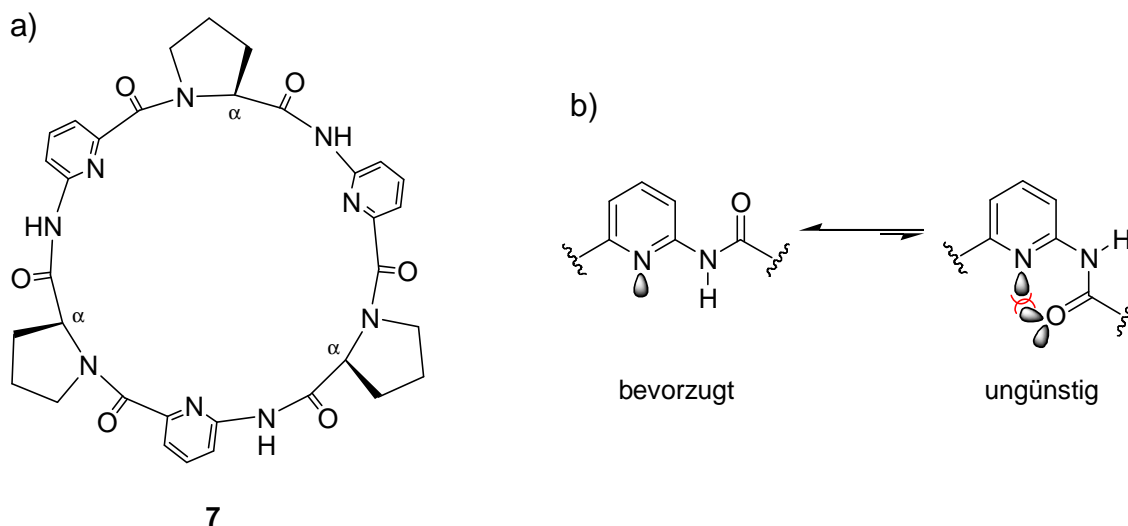


Abbildung 11 a) Struktur von CP **7** aufgebaut aus L-Prolin und 6-Aminopicolinsäure; b) bevorzugte Orientierung der Carbonylgruppe in 6-Position der Aminopicolinsäureeinheit.

CP **7** wurde in kompetitiven Lösungsmittelgemischen mit bis zu 80 Vol% Wasseranteil hinsichtlich seiner Bindungsaffinität zu diversen Anionen untersucht.^[21,24] Die NMR-spektroskopischen Bindungsstudien profitierten von der Beobachtung, dass die C_{α} -Protonen der Prolinuntereinheiten bei Komplexbildung eines Anions entschirmt werden und

deren Signale dadurch eine Tieffeldverschiebung in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erfahren. Diese Entschirmung kommt dadurch zustande, dass die C_α -Protonen wie die Amidprotonen in Richtung der Kavität weisen und somit im Komplex in die Nähe des gebundenen Anions gelangen.

Es zeigte sich, dass schwach koordinierende oder protonierte Anionen, wie HCO_3^- , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , NO_3^- und AcO^- , mit sehr geringer Affinität von **7** gebunden werden.^[21] Dagegen wechselwirken die Halogenide und SO_4^{2-} stark mit **7**. Diese Anionen leiten sich von starken Säuren ab und liegen daher bei pH 7 vollständig deprotoniert vor. Dies hat den Vorteil, dass Bindungsstudien ohne Anwesenheit eines Puffersystems durchgeführt werden können. Statt der erwarteten 1:1-Komplexe werden alle diese Anionen aber von zwei CPs unter Bildung Sandwich-artiger 2:1-Komplexe gebunden. In Abbildung 12 ist als Beispiel die Kristallstruktur des Iodidkomplexes von **7** gezeigt. Darin ist zu sehen, wie das Anion über insgesamt sechs H-Brückenbindungen zwischen den Amidprotonen der beiden Cyclopeptidringe und dem Iodidanion in der Kavität fixiert und vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt wird.

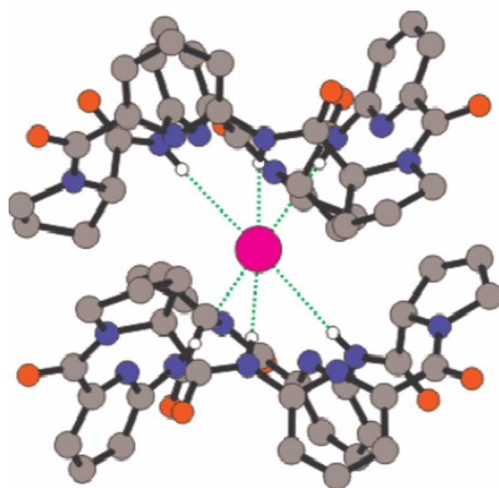


Abbildung 12 Kristallstruktur des 2:1 Sandwich-Komplexes von **7** mit I^- . I^- rosa; Stickstoff blau; Sauerstoff rot; Kohlenstoff grau; Wasserstoff weiß. Reprinted (adapted) with permission from S. Kubik, R. Goddard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99, 5127–5132 – Copyright 2002 National Academy of Sciences.

Die durch die NMR-Titrations erhaltenen Bindungskonstanten zeigen, dass die Stabilitäten der untersuchten Anionenkomplexe etwa 10^5 M^{-2} betragen und somit alle in der gleichen Größenordnung liegen (Tabelle 1). Weiter ist zu erkennen, dass der initiale Bindungsschritt, der mit der Bildung des 1:1-Komplexes verbunden ist, mit einer wesentlich

kleineren Gleichgewichtskonstante K_1 verbunden ist, als der zweite Schritt (K_2), also der Bildung des 2:1-Komplexes aus dem 1:1-Komplex.

Tabelle 1 Mittels $^1\text{H-NMR}$ Bindungsstudien ermittelte Bindungskonstanten K_1 , K_2 und K_a von **7** mit verschiedenen Anionen in 80 Vol% $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ mit Angabe der Anionenradien.^{a)}

Anion		$K^{[24]}$	Anionenradius ^[13]
Cl^-	K_1	5	181
	K_2	6770	
	K_a	0.34×10^5	
Br^-	K_1	16	196
	K_2	6820	
	K_a	1.09×10^5	
Γ	K_1	22	220
	K_2	7380	
	K_a	1.60×10^5	
SO_4^{2-}	K_1	96	230
	K_2	1270	
	K_a	1.22×10^5	

a) $T = 298\text{ K}$; Anionen jeweils als Natriumsalze; K_1 sowie K_2 in M^{-1} , K_a in M^{-2} ; Anionenradien in pm.

Aufschlüsse über die Ursache für diese Kooperativität lieferte die Charakterisierung der Lösungsmittelabhängigkeit der Anionenaffinität eines Bis(cyclopeptids) (siehe Kapitel 2.1.2). Die beobachtete Zunahme der Stabilität der Halogenidkomplexe in der Reihenfolge $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \Gamma$ lässt sich durch die Größe und der damit verbundenen Komplementarität der Anionen zur Rezeptorkavität erklären. Das Iodidanion ist gerade so groß, dass es ideal in die Kavität hineinpasst. Die kleineren Anionen Br^- und Cl^- sind für eine gleichzeitige effiziente Wechselwirkung mit allen sechs NH-Gruppen der beiden Cyclopeptidringe etwas zu klein. SO_4^{2-} weist einen ähnlich großen Ionenradius wie Γ auf und passt daher auch gut in die Kavität. Sehr großen Anionen, wie Benzolsulfonat, passen nicht zwischen zwei Cyclopeptidringe. Benzolsulfonat bildet entsprechend einen 1:1-Komplex mit **7**, dessen Stabilität mit einem $K_a = 44\text{ M}^{-1}$ etwa so groß ist wie die 1:1-Komplexe der anderen Anionen.^[21]

2.1.2 Bis(cyclopeptide)

Ausgehend von der Beobachtung, dass CPs mit der Grundstruktur von **7** (Abbildung 11a)) in wässrigen Lösungsmittelgemischen bevorzugt 2:1-Komplexe bilden, wurde in weiterführenden Arbeiten nach einem Weg gesucht, diese Komplexe in 1:1-Komplexe zu

überführen. Hierzu wurden zwei Cyclopeptidringe durch geeignete Linker kovalent miteinander verknüpft und so entsprechende Bis(cyclopeptide) (BCPs) erhalten.

Passende Linkerstrukturen wurden basierend auf der Kristallstruktur des Iodidkomplexes von **7** (Abbildung 12) beispielsweise mittels Kraftrechnungen identifiziert. In diesem Zusammenhang wurde das BCP **8a** (Abbildung 13) synthetisiert, in dem zwei Cyclopeptidringe mit jeweils einer (4*S*, 2*S*)-4-Aminoprolinereinheit über eine Adipinsäuregruppe miteinander verbunden sind.^[25]

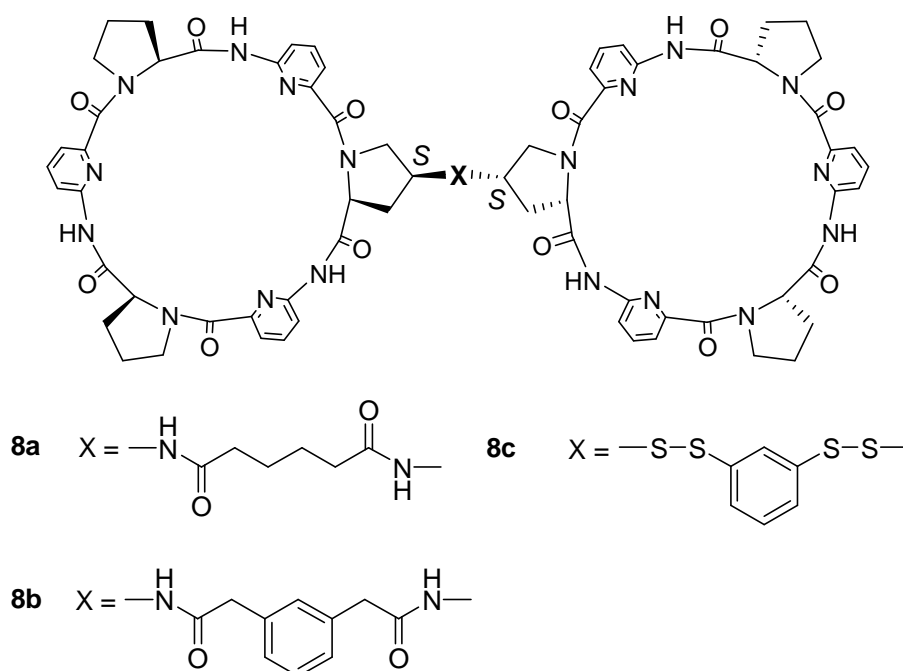


Abbildung 13 BCPs **8a-c** mit unterschiedlichen Linkerstrukturen.

Die berechnete Struktur des Iodidkomplexes von **8a** ist in Abbildung 14 gezeigt. Zu sehen ist, dass diese Struktur eine große Ähnlichkeit mit der Kristallstruktur des Iodidkomplexes von **7** (Abbildung 12) besitzt. Auch hier weisen alle sechs H-Brücken Donorstellen von **8a** in Richtung der Kavität. Des Weiteren können sich die Prolinereinheiten wieder nahe kommen, was stabilisierende hydrophobe Wechselwirkungen möglich macht.

Später wurde das BCP **8b**, dessen Linker ebenfalls durch Kraftrechnungen ermittelt wurde, synthetisiert (Abbildung 13).^[26] Durch dynamische kombinatorische Chemie unter Ausnutzung des Disulfidaustauschs als reversible Reaktion wurde außerdem BCP **8c** als effizienter Anionenrezeptor identifiziert.^[27] Die aromatischen Einheiten in den Linkern von

8b und **8c** sollten die Rigidität der BCPs erhöhen, was einen günstigen Einfluss auf die Komplexbildungsentropie haben könnte.

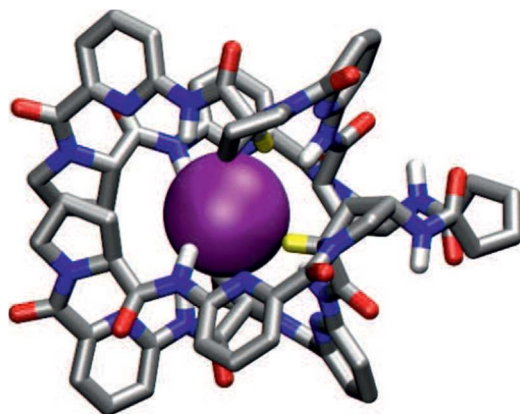


Abbildung 14 Berechnete Struktur des Iodidkomplexes von **8a**. I lila; Stickstoff blau; Sauerstoff rot; Kohlenstoff grau; Wasserstoff weiß; C α -Wasserstoffe der Proline gelb. Reprinted (adapted) with permission from S. Kubik, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 12752–12760. Copyright 2002 American Chemical Society.

Alle BCPs erwiesen sich als etwas schlechter wasserlöslich als **7**, sodass die Bindungseigenschaften in Lösungsmittelgemischen mit geringeren Wasseranteilen durchgeführt werden mussten. Die Rezeptoren **8a** und **8b** wurden in 50 Vol% Wasser/Methanol charakterisiert, während Rezeptor **8c** in 33 Vol% Wasser/Acetonitril bezüglich seiner Affinität für Anionen untersucht wurde. Die Eigenschaften von **8a** und **8b** können daher nicht direkt mit denen von **8c** verglichen werden. In Tabelle 2 sind die Anionenaffinitäten der BCPs inklusive der thermodynamischen Parameter ΔG , ΔH sowie $T\Delta S$ aufgeführt. Die Bindung von **8c** an die Halogenide Br $^-$ und Cl $^-$ wurde nicht untersucht, weshalb diesbezüglich keine Daten vorliegen.

Die Bildung fast aller Komplexe ist enthalpie- sowie entropiegetrieben. Nur bei der Bindung von SO $_4^{2-}$ an **8c** wurde in Wasser/Acetonitril eine endotherme Komplexbildung festgestellt, die Bindung ist in diesem Fall also nur auf den hohen vorteilhaften Entropieterm von $T\Delta S = 42.7$ kJ/mol zurückzuführen. Typischerweise beobachtet man die erwartete Abnahme der Komplexstabilität für die BCPs **8a** und **8b** von SO $_4^{2-}$ mit $\log K_a = 5.28$ bis 5.97 als am besten gebundenes Substrat über I $^-$ ($\log K_a = 3.79$ bis 4.43) und Br $^-$ ($\log K_a = 3.45$ bis 4.01) zu Cl $^-$ ($\log K_a = 2.51$ bis 3.39).

Tabelle 2 Mittels ITC bestimmte Bindungskonstanten $\log K_a$, freie Komplexbildungsenthalpien ΔG , -enthalpien ΔH und -entropien $T\Delta S$ der Komplexbildung der BCPs **8a-c** mit unterschiedlichen Anionen.^{a)}

Anion		8a ^{b)[25]}	8b ^{b)[26]}	8c ^{c)[27]}
SO ₄ ²⁻	$\log K_a$	5.28	5.97	6.83
	ΔG	-30.2	-34.1	-39.0
	ΔH	-15.5	-13.2	3.7
	$T\Delta S$	14.7	20.9	42.7
Γ	$\log K_a$	3.79	4.43	4.75
	ΔG	-21.6	-25.2	-27.1
	ΔH	-13.2	-15.4	-13.4
	$T\Delta S$	8.4	9.8	13.7
Br ⁻	$\log K_a$	3.45	4.01	
	ΔG	-19.7	-22.9	n. g. ^{d)}
	ΔH	-11.2	-12.1	
	$T\Delta S$	8.5	10.8	
Cl ⁻	$\log K_a$	2.51	3.39	
	ΔG	-14.2	-19.3	n. g. ^{d)}
	ΔH	-10.5	-4.1	
	$T\Delta S$	3.8	15.2	

a) $T = 298\text{ K}$, Energien in kJ/mol; b) Anionen als Natriumsalze; Messung in 50 Vol% Wasser/Methanol; c) Anionen als Kaliumsalze; Messung in 33 Vol% Wasser/Acetonitril; d) n. g. = nicht gemessen.

Der bessere Rezeptor der in 50 Vol% Wasser/Methanol untersuchten BCPs stellt **8b** dar.^[26] Die Komplexierungen von SO₄²⁻, Γ sowie Br⁻ sind im Vergleich mit **8a** mit um ca. eine halbe Größenordnung höheren Bindungskonstanten verbunden, der Chloridkomplex ist sogar um eine ganze Größenordnung stabiler. Für alle untersuchten Anionen ist die Komplexierungsentropie günstiger als die von **8a**. Bemerkenswert ist hier, dass für Cl⁻ ein Anstieg von $T\Delta S$ um ca. 11 kJ/mol beobachtet wird. Auch im Fall von SO₄²⁻ wird eine hohe Zunahme des Entropieterms um ca. 6 kJ/mol beobachtet. Für Γ sowie Br⁻ ist der Anstieg mit ca. 1–2 kJ/mol moderat. Bei SO₄²⁻ und Cl⁻ kommt es außerdem zu einer Enthalpie/Entropie-Kompensation, das heißt der günstigere Entropieterm der Komplexierung von **8b** wird durch einen etwas ungünstigeren Enthalpieterm im Vergleich zu **8a** ausgeglichen, sodass die Zunahme der Komplexstabilität beim Übergang von **8a** zu **8b** geringer ausfällt als der Entropieterm erwarten lässt. Die Komplexierung von Γ und Br⁻ durch **8b** ist allerdings nicht nur entropisch sondern auch enthalpisch günstiger als bei **8a**.

Der Rezeptor **8c**, welcher mittels dynamischer kombinatorischer Chemie erhalten wurde, zeigt, wenn auch in einem Lösungsmittel mit geringerem Wassergehalt, mit einem $\log K_a$ von 6.83 eine sehr hohe Affinität zu SO₄²⁻.^[27] Hier wird der ungünstige enthalpische Term der Komplexbildung durch eine hohe günstige Komplexierungsentropie von

42.7 kJ/mol überkompensiert, wodurch die hohe Sulfataffinität resultiert. Für Γ^- wird ebenfalls eine höhere Affinität als für **8a** und **8b** beobachtet, wenn auch in einem geringeren Maße als bei SO_4^{2-} . Hier liefern Entropie und Enthalpie einen gleichen Beitrag zur Gesamtstabilität von je ca. 13 kJ/mol. Wie zuvor erwähnt, ist ein exakter Vergleich zu **8a** und **8b** aufgrund des unterschiedlichen Lösungsmittelgemisches aber nicht möglich.

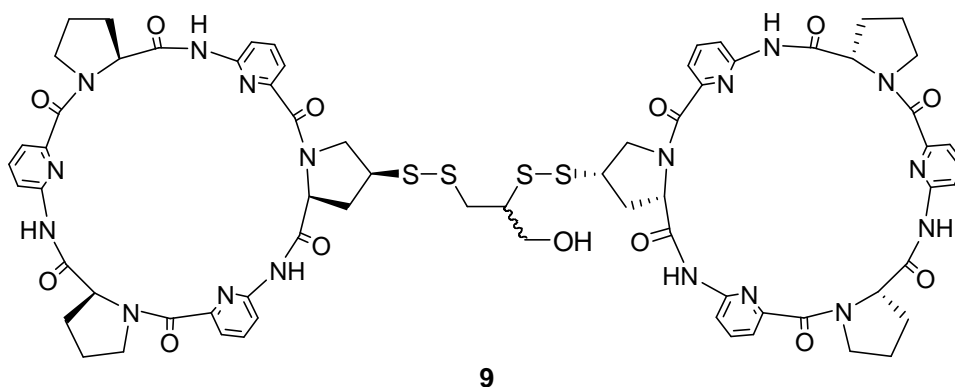


Abbildung 15 Struktur von 9.

Vom Sulfatkomplex des BCP **9**^[27] (Abbildung 15) konnte außerdem eine Kristallstruktur erhalten werden.^[28] Diese ist in Abbildung 16 gezeigt. Man kann erkennen, dass die beiden Cyclopeptidringe sich sehr nahe kommen, besonders im Bereich der Prolineinheiten. Dies deutet auf nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Prolinuntereinheiten hin. Die Prolinringe schirmen das Sulfatanion also nicht nur von dem umgebenden Lösungsmittel ab, sie tragen möglicherweise zur Gesamtstabilität des Komplexes bei.

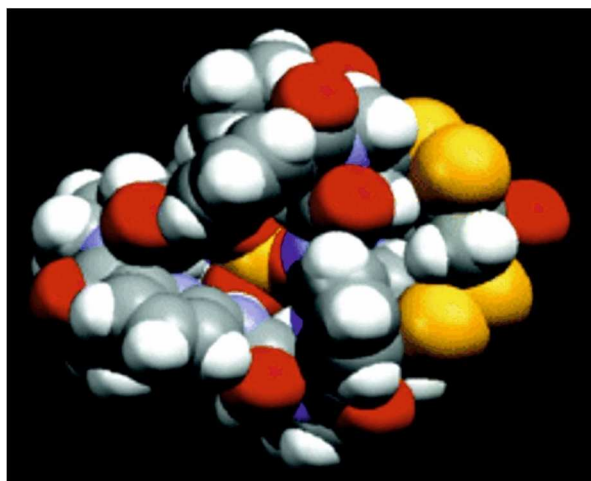


Abbildung 16 Raumfüllendes Modell der Kristallstruktur von **9** mit $(\text{NBu}_4)_2\text{SO}_4$. Reprinted (adapted) with permission from Z. Rodriguez-Docampo, S. I. Pascu, S. Kubik, S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 11206–11210. Copyright 2006 American Chemical Society.

Hinweise auf diese hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Prolineinheiten der BCPs wurde durch die Untersuchung der Anionenaffinität von **8c** in Wasser/Acetonitril-Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung erhalten. Es wurde gezeigt, dass die Iodidaffinität von **8c** bei Erhöhung des Wassergehalts des Lösungsmittelgemisches wesentlich weniger stark abfällt, als aufgrund der Solvatisierungsenergie von Γ^- im entsprechenden Gemisch zu erwarten wäre. So ist der Transfer von Γ^- von Wasser in Wasser/Acetonitril-Gemische mit einer umso höheren freien Transferenthalpie verbunden, je höher der Acetonitrilanteil ist.^[29] Entsprechend ist die Desolvatation von Γ^- umso leichter, je weniger Wasser das Lösungsmittelgemisch enthält. Auf Basis dieser ΔG -Werte sollte man erwarten, dass beim Übergang von 49 zu 80 mol% Wasser/Acetonitril die Stabilität des Iodidkomplexes von **8c** um das 11-fache sinken sollte. Tatsächlich wurde experimentell aber nur ein Abfall um das 2.2-fache von $9.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ zu $4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ gefunden. Die Stabilität des Iodidkomplexes sinkt also weniger stark als zu erwarten wäre. Dies wurde auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Prolinringen in den Anionenkomplexen des BCP zurückgeführt, die diese Komplexe mit zunehmendem Wasseranteil des Lösungsmittelgemisches mehr und mehr stabilisieren. Diese HEs kompensieren also die allein aufgrund der Anionensolvatation zu erwartende Abnahme der Komplexstabilität.

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung dieser HEs ist die hohe Kooperativität der Anionenbindung von **7**, die zeigt, dass der maßgebliche Beitrag zur Stabilität der Sandwichkomplexe dieses CPs von der Zusammenlagerung der beiden Cyclopeptidringe stammt. Ein weiteres Indiz ist, dass ein Analogon von **7** mit (4*R*, 2*S*)-4-

Hydroxyprolineinheiten anstelle der Prolineinheiten nur 1:1-Komplexe bildet.^[24] Die starke Solvation der polaren Hydroxyprolineinheiten in diesem CP führt also dazu, dass der HE bei der Bildung der Sandwichkomplexe nicht in ausreichendem Umfang wirksam werden kann.

Aufgrund der Löslichkeit der BCPs **8a-c** konnten die Einflüsse des HEs auf die Anionenaffinität nicht in Lösungsmittelgemischen mit hohem Wasseranteil oder in reinem Wasser untersucht werden. Daher wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit das besser wasserlösliche Derivat **10** synthetisiert (Abbildung 17).^[30] Dieses enthält Triethylglycol-einheiten in den 4-Positionen der aromatischen Aminosäureeinheiten. Die Positionen der Substituenten ergab sich aufgrund der Kristallstruktur von **7** (Abbildung 12)^[24] sowie der berechneten Struktur von **8a** (Abbildung 14),^[25] in denen zu sehen ist, dass die 4-Positionen der 6-Aminopicolinsäureeinheiten weg von der Bindungsstelle weisen und die Anionenaffinität nicht beeinflussen sollten.

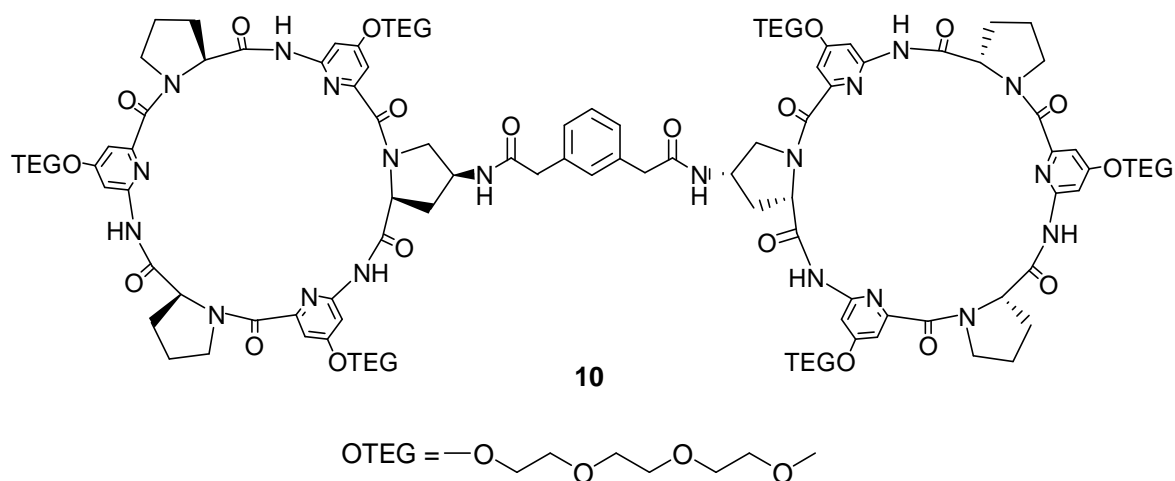


Abbildung 17 BCP **10**, welches zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit Triethylglycol-einheiten an den aromatischen Aminosäureuntereinheiten enthält.

Es zeigte sich, dass die Löslichkeit von **10** in wässrigen Medien im Vergleich zu den BCPs **8a-c** und **9** deutlich höher ist, was Bindungsstudien in Lösungsmittelgemischen mit bis zu 90 Vol% Wasseranteil ermöglichte. Die Ergebnisse der im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführten Bindungsstudien sind in Tabelle 3 zusammengefasst. In dieser Studie zeigte sich wie erwartet, dass die zusätzlichen Gruppen in **10** die Bindungsaffinität im Vergleich zu **8b** nicht wesentlich beeinflussen, was die jeweils nahezu identischen Enthalpie- und Entropiebeiträge der Bindung von I^- , Br^- und SO_4^{2-} an **10** bzw. **8b** und die entsprechend jeweils identischen $\log K_a$ -Werte dieser Komplexe belegen.

Tabelle 3 Mittels ITC bestimmte Bindungskonstanten $\log K_a$, freie Komplexbildungsenthalpien ΔG , -enthalpien ΔH und -entropien $T\Delta S$ der Komplexbildung von **10** in 50 und 90 Vol% Wasser/Methanol und von **8b** in 50 Vol% Wasser/Methanol.^{a)}

Anion		8b ^{b)[26]}	10 ^{b)[30]}	10 ^{c)[30]}
SO ₄ ²⁻	$\log K_a$	5.97	5.95	
	ΔG	-34.1	-34.0	n. d. ^{d)}
	ΔH	-13.2	-14.5	
	$T\Delta S$	20.9	19.5	
I ⁻	$\log K_a$	4.43	4.63	3.80
	ΔG	-25.2	-26.4	-21.7
	ΔH	-15.4	-16.6	-10.1
	$T\Delta S$	9.8	9.8	11.6
Br ⁻	$\log K_a$	4.01	4.11	
	ΔG	-22.9	-23.5	n. d. ^{d)}
	ΔH	-12.1	-7.9	
	$T\Delta S$	10.8	15.6	

a) $T = 298$ K, Energien in kJ/mol, Anionen als Natriumsalze; b) Messung in 50 Vol% Wasser/Methanol; c) Messung in 90 Vol% Wasser/Methanol; d) n. d. = nicht detektierbar bzw. keine eindeutige Aussage möglich.

Beim Übergang zu dem kompetitiveren Lösungsmittelgemisch 90 Vol% Wasser/Methanol, wurde keine Bindung von Br⁻ beobachtet (sehr schwache Wärmetönung). Auch die Wärmetönung von der Sulfatbindung war sehr klein, was auf einen Übergang von exothermer zu endothermer Komplexierung zurückgeführt wurde. Im Rahmen der Diplomarbeit konnte also bezüglich der Bindung von SO₄²⁻ an **10** in 90 Vol% Wasser/Methanol keine zuverlässige Aussage getroffen werden. Die Komplexierung von I⁻ verläuft mit einer im Vergleich zu 50 Vol% Wasser/Methanol um ca. eine Größenordnung geringere Bindungskonstante. Dies geht hauptsächlich auf den enthalpischen Term zurück, der um ca. 6 kJ/mol im Vergleich zu 50 Vol% Wasser/Methanol ungünstiger ist, während der entropische Term ca. 2 kJ/mol günstiger ist. Die Verringerung des Enthalpieterms der Komplexbildung lässt sich dadurch erklären, dass in dem kompetitiveren Gemisch die direkten Rezeptor-Anion-Wechselwirkungen geschwächt sind und das Iodidanion gleichzeitig stärker solvatisiert ist. Der Entropieterm steigt vermutlich wegen der größeren Bedeutung des HEs in den kompetitiveren Lösungsmittelgemischen an.

Trotz der deutlich verbesserten Löslichkeit von **10** ist es vor Beginn dieser Promotion nicht gelungen, die Anionenaffinität solcher BCPs in Lösungsmittelgemischen mit mehr als 90 Vol% Wasseranteil bzw. reinem Wasser zu quantifizieren und die thermodynamischen Beiträge zur Komplexbildung genauer aufzuschlüsseln. Mit

2 BIS(CYCLOPEPTIDE) ZUR ANIONENERKENNUNG IN WÄSSRIGEN MEDIEN

Untersuchungen in diesen Zusammenhängen habe ich mich entsprechend im Rahmen meiner Promotion beschäftigt.

2.2 Charakterisierung der Anionenaffinität von BCP1 in Wasser/Methanol-Gemischen^[31]

2.2.1 Aufgabenstellung

Als Ziel dieses Teils der Arbeit sollte zunächst das BCP 10, im Folgenden als **BCP1** (Abbildung 18) bezeichnet, erneut dargestellt und die Synthese wenn möglich optimiert werden. Anschließend sollte die Anionenaffinität von **BCP1** in unterschiedlichen kompetitiven Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen mittels ITC charakterisiert werden. Diese Methode bietet den Vorteil, dass mit nur einer Messung die vollständige energetische Signatur der Komplexbildung zugänglich ist.^[32] Als Lösungsmittel sollten zunächst Wasser/Methanol-Gemische eingesetzt werden. Auf diese Weise sollte ein genauer Einblick in die Thermodynamik der Komplexbildung in diesen Medien erhalten werden. Diese Daten sollten Informationen liefern, in welchem Umfang die Desolvatisierung von Anion und/oder Rezeptor, die hydrophoben Wechselwirkungen und mögliche weitere Beiträge die Komplexbildung beeinflussen.

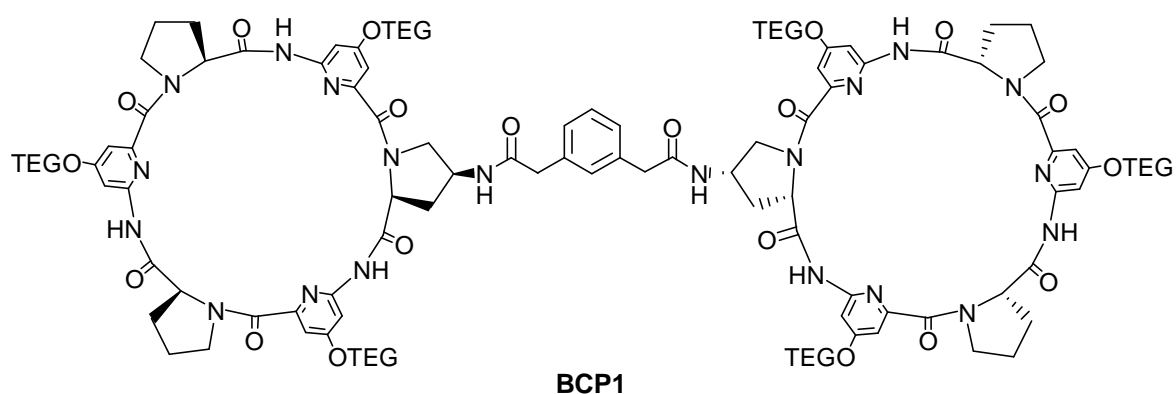
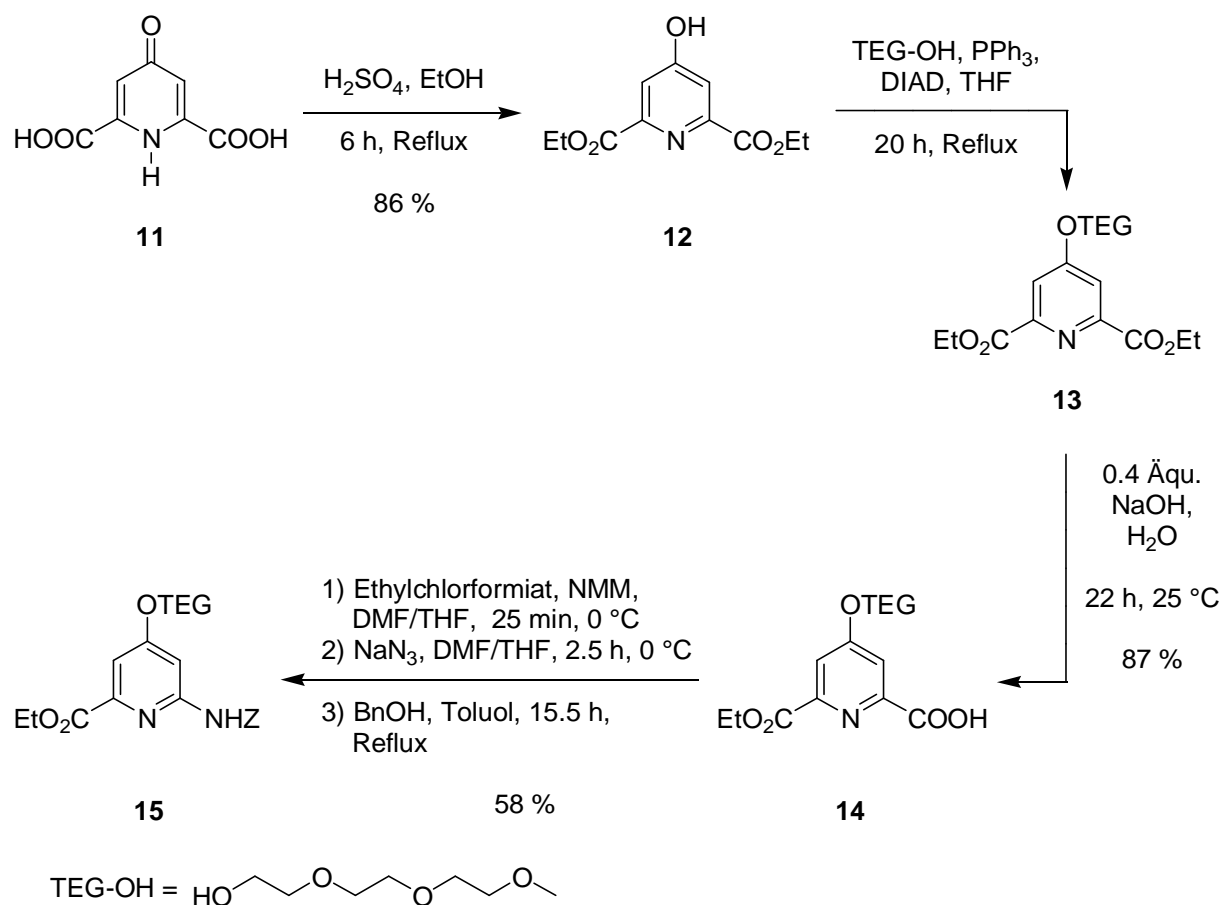


Abbildung 18 Struktur von BCP1.

2.2.2 Synthese von BCP1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die bereits etablierte Synthese^[30] von **BCP1** zunächst wiederholt und verbessert (Schema 1).



Schema 1 Syntheseroute zur Darstellung von 15.

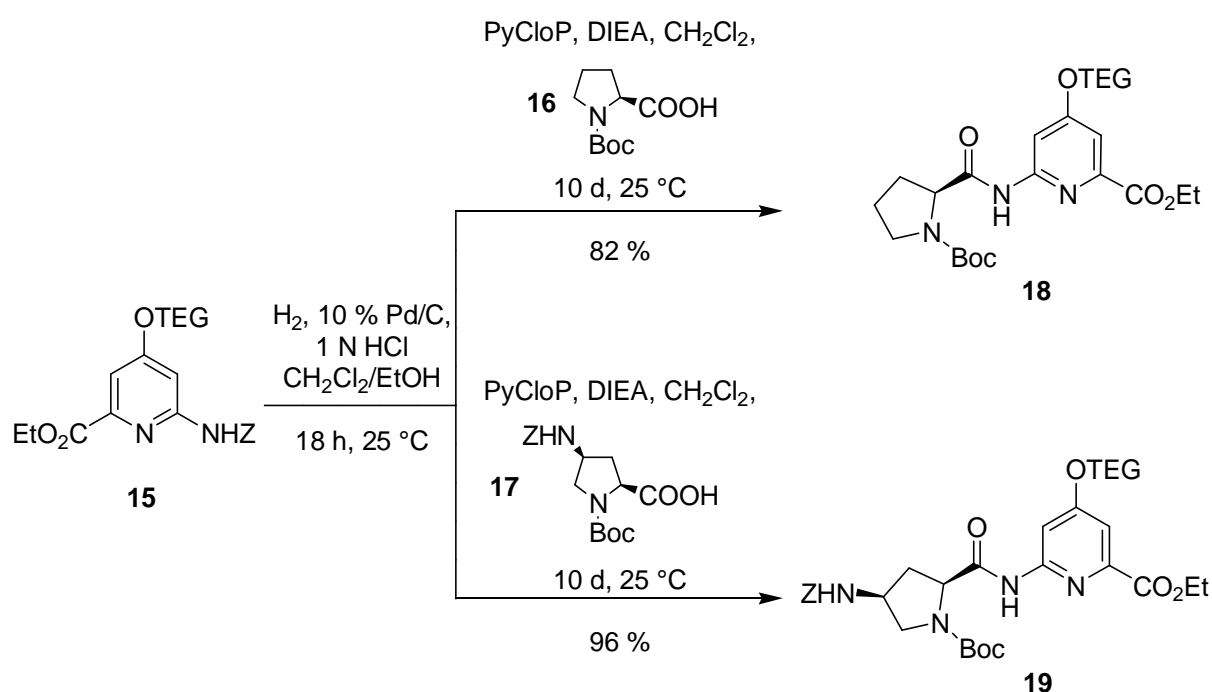
Die Darstellung von **BCP1** startete mit der Synthese des Pyridinbausteins **15**, ausgehend von der kommerziell erh\u00e4ltlichen Chelidams\u00e4ure **11**. Diese wurde zun\u00e4chst an beiden Carboxylatgruppen verestert und das Produkt **12** dann mit der Triethylenglycolseitenkette versehen.^[33]

Das Produkt **13** wurde hierbei verunreinigt mit nicht umgesetztem Triethylenglycolmonomethylether erhalten, welcher erfahrungsgem\u00e4\u00df allerdings die folgende Reaktion nicht st\u00f6rt und bei der n\u00e4chsten Aufreinigung problemlos abgetrennt werden kann. Daher wurde auf eine aufw\u00e4ndige Aufreinigung an dieser Stelle verzichtet und die Ausbeute nur abgesch\u00e4tzt. Die anschließende einseitige Verseifung wurde mit 0.4 \u00c4quivalenten NaOH in verd\u00fcnnter w\u00e4ssriger L\u00f6sung ($c \approx 7.85\text{ mM}$) in guter Ausbeute durchgef\u00fchrt.^[33] Die erhaltene

2 BIS(CYCLOPEPTIDE) ZUR ANIONENERKENNUNG IN WÄSSRIGEN MEDIEN

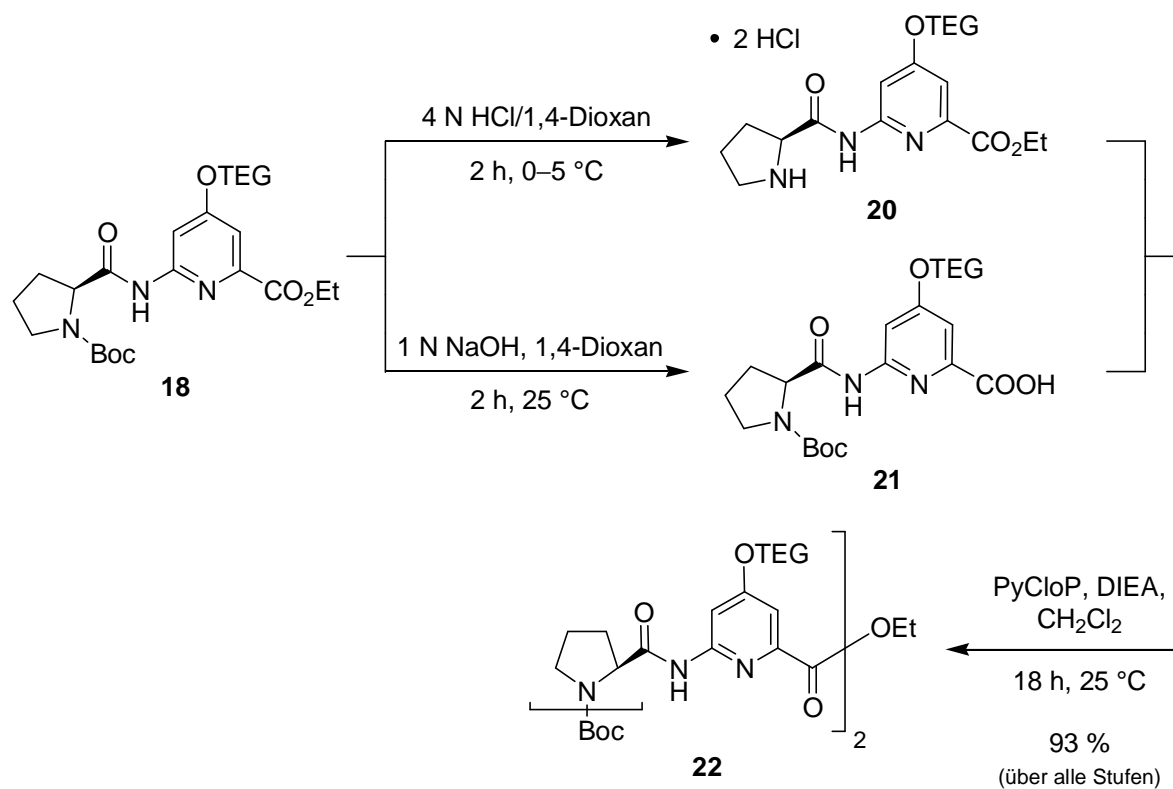
Monocarbonsäure **14** wurde anschließend in einer dreistufigen Sequenz deren dritter Schritt eine Curtius-Umlagerung beinhaltet, in akzeptabler Ausbeute von 58 % zu **15** umgesetzt.^[30]

Im Folgenden wurde **15** verwendet, um die Dipeptide **18** und **19** aus unterschiedlichen L-Prolin-Derivaten darzustellen (Schema 2).^[31] Dafür wurde **15** mit einem etablierten Verfahren am *N*-Terminus entschützt und das so erhaltene Amin anschließend mit **16** bzw. **17** unter Standardbedingungen zu **18** bzw. **19** in sehr guten Ausbeuten von 82 % bzw. 96 % über beide Schritte gekuppelt. Das benötigte Prolinderivat **17** wurde auf einem literaturbekannten Weg in sechs Stufen in üblichen Ausbeuten dargestellt.^[34,35]



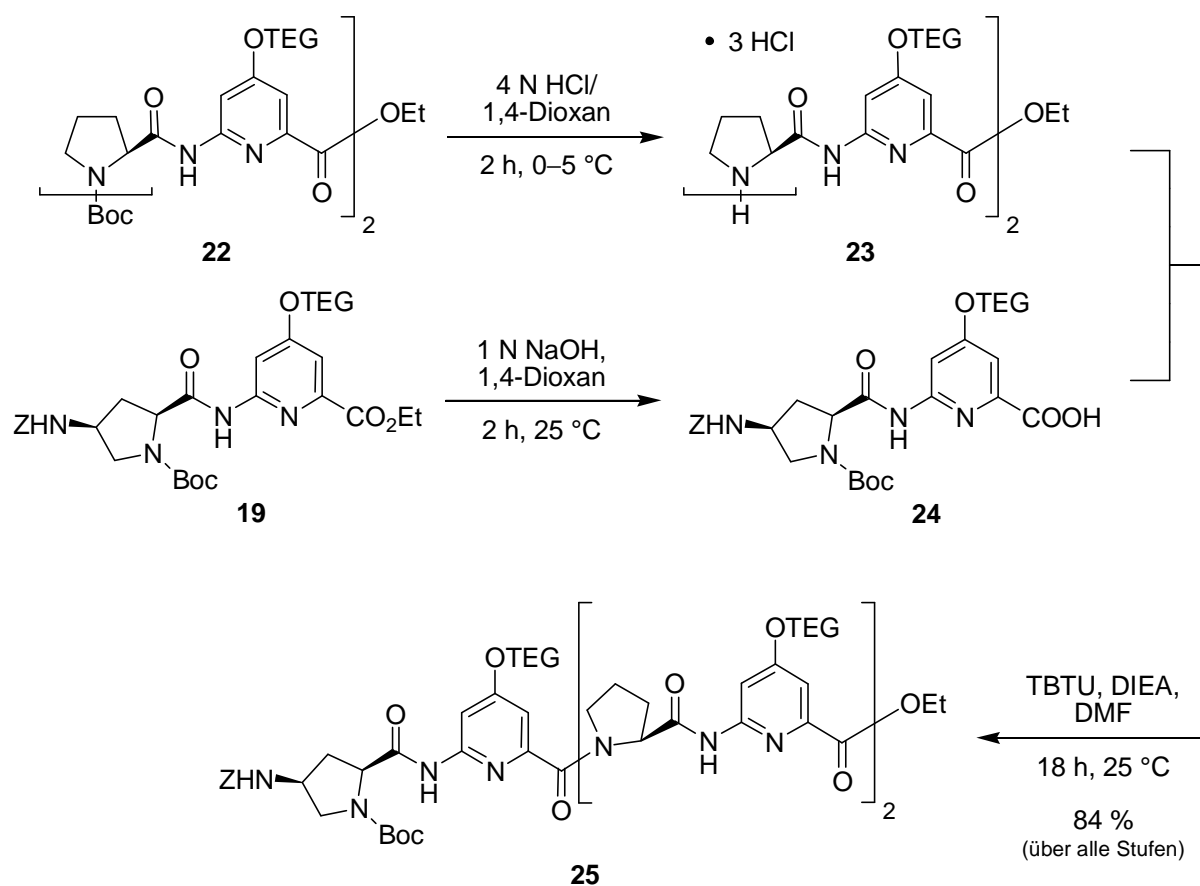
Schema 2 Synthese der Dipeptide **18** und **19**.

Aus **18** wurde anschließend das Tetrapeptid **22** erhalten (Schema 3).^[31] Dafür wurde ein Äquivalent **18** am *N*-Terminus und ein weiteres am *C*-Terminus entschützt. Die so erhaltenen teilgeschützten Dipeptide wurden nun unter Standardbedingungen mit PyCloP als Kupplungsreagenz zum Tetrapeptid **22** gekuppelt.



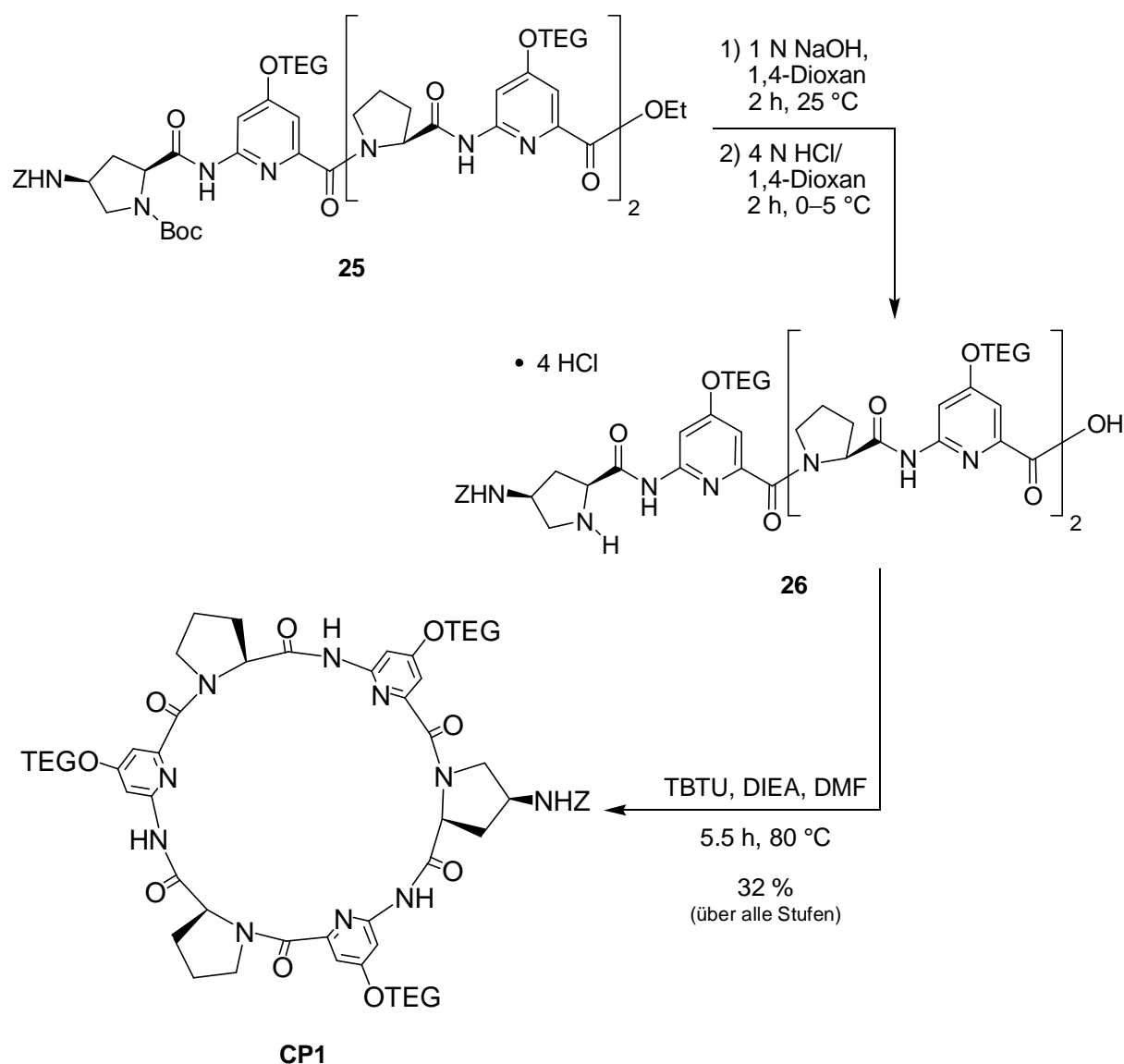
Schema 3 Synthese des Tetrapeptids **22**.

Um das lineare Hexapeptid **25** zu erhalten, wurde **22** am *N*-Terminus und **19** am *C*-Terminus entschützt. Die Produkte wurden mit TBTU als Kupplungsreagenz mit guter Ausbeute umgesetzt (Schema 4).^[31]



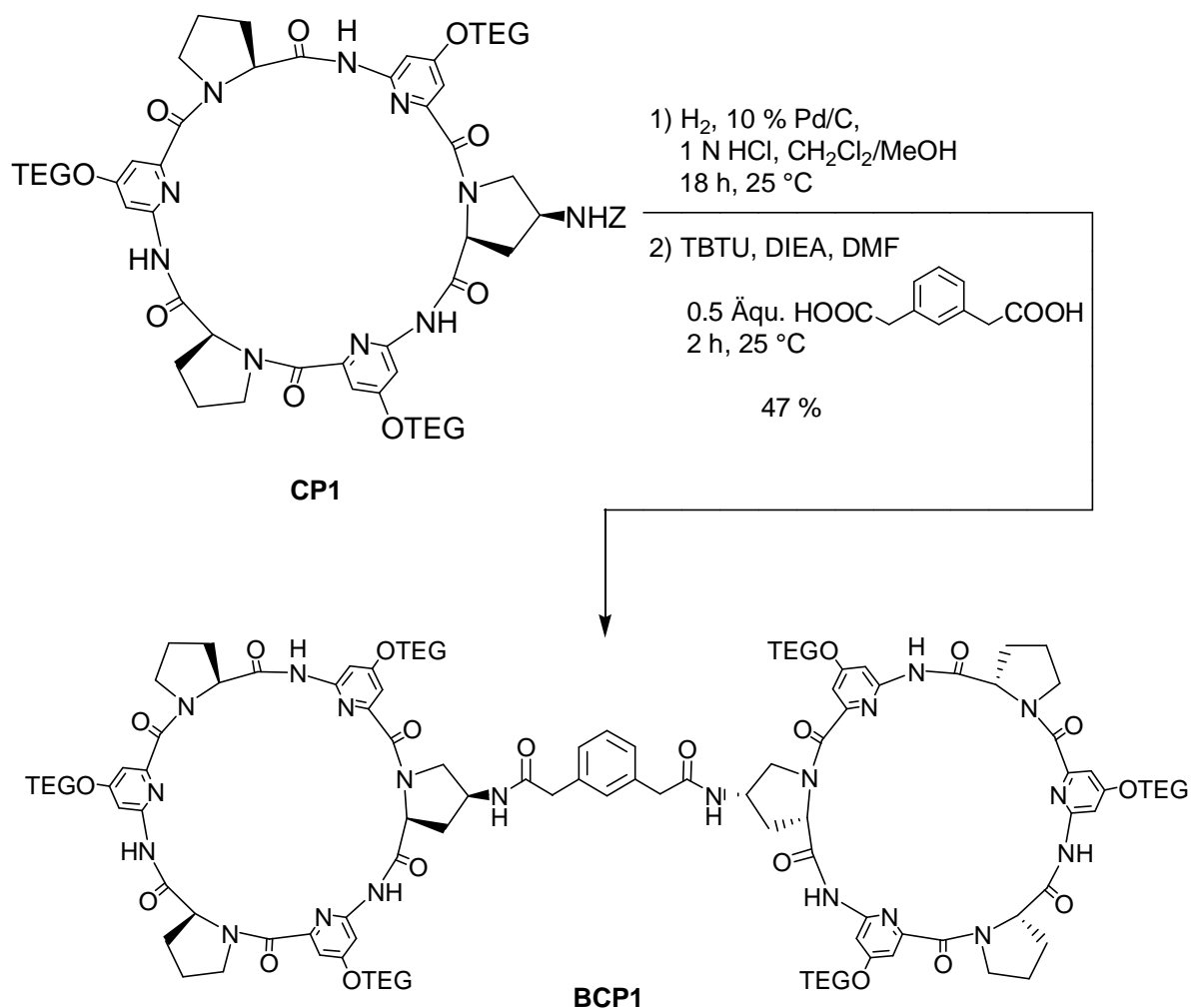
Schema 4 Synthese des linearen Hexapeptids **25**.

Das Hexapeptid **25** wurde zuerst am C-Terminus und anschließend am N-Terminus entschützt und das erhaltene **26** unter etablierten Bedingungen bei hoher Verdünnung cyclisiert, wobei das Cyclopeptid **CP1** in einer üblichen Ausbeute von 32 % erhalten wurde (Schema 5).^[31]



Schema 5 Cyclisierung des linearen Hexapeptids **25** zu **CP1**.

Das so erhaltene **CP1** wurde anschließend an der Aminofunktion der substituierten Prolineinheit geschützt und mit einem halben Äquivalent der kommerziell erhältlichen 1,3-Phenylendiessigsäure als Linker zu **BCP1** gekuppelt (Schema 6).^[31] Das erhaltene analysenreine **BCP1** wurde für die anschließenden Bindungsstudien verwendet, welche in Kapitel 2.2.3 beschrieben sind.



Schema 6 Synthese von **BCP1** aus **CP1**.

Im Rahmen der hier beschriebenen Synthese von **BCP1** konnten insbesondere die Synthese und Reinigung des in 4-Position substituierten Pyridinbaustein **15** im Vergleich zur in der Diplomarbeit erarbeiteten Syntheseroute^[30] verbessert werden. Die Veresterung zu **12** verläuft mit 17 % höherer Ausbeute und die vereinfachte Aufreinigung von **13** spart signifikant Arbeitszeit sowie Chemikalien. Die Ausbeute während der Verseifung zu **14** konnte durchschnittlich um 8 % gesteigert werden und auch der letzte Schritt zu **15** konnte um ca. 6 % verbessert werden. Die Synthesen der Di-, Tetra- und Hexapeptide (**18**, **19**, **22**, **25**) weisen analoge Ausbeuten auf, verlaufen stets mit sehr guten bis nahezu quantitativen Ausbeuten. Die Synthese von **CP1** und **BCP1** zeigen ebenfalls analoge Ausbeuten, hier wurden kleinere Anpassungen in der Aufreinigung durchgeführt.

2.2.3 Bindungsstudien mit BCP1

Die Anionenaffinität von **BCP1** wurde mittels ITC in einer Auswahl von Wasser/Methanol-Gemischen untersucht. Als Substrate dienten stellvertretend für stark koordinierende Anionen SO_4^{2-} und repräsentativ für schwach koordinierende Anionen Γ^- . Da diese Anionen die korrespondierenden Basen starker Säuren sind, ist es möglich, in ungepufferten Systemen zu arbeiten, da ein Protonierungsgleichgewicht auszuschließen ist. Weiterer Vorteil dieser Anionen ist, dass sie üblicherweise mit CPs und BCPs (einer ähnlichen Grundstruktur wie **BCP1**) stabile Komplexe bilden und somit auch in kompetitiven Lösungsmitteln messbare Anionenaffinitäten erwartet werden können. Während die Bindungsstudien mit Γ^- im Bereich von 20 Vol% bis 95 Vol% Wasser/Methanol möglich waren, limitierte die Löslichkeit des verwendeten Natriumsalzes von SO_4^{2-} den Bereich auf 30 Vol% bis 95 Vol% Wassergehalt des Lösungsmittelgemisches. Aufgrund der geringen Wärmetönung in 90 Vol% Wasser/Methanol für die Titration von SO_4^{2-} konnten in diesem Gemisch keine verlässlichen Daten erhalten werden.

In Abbildung 19 sind die erhaltenen Ergebnisse der Bindungsstudien von **BCP1** mit SO_4^{2-} und Γ^- in den untersuchten Wasser/Methanol-Gemischen grafisch gezeigt. In Abbildung 19a) und b) ist zu erkennen, dass die Affinitäten für SO_4^{2-} und Γ^- wie erwartet mit steigendem Wassergehalt abnehmen. Dabei ist die Abhängigkeit in dem untersuchten Lösungsmittelbereich annähernd linear, wobei die Affinität von **BCP1** für SO_4^{2-} signifikant schneller abnimmt als die für Γ^- . Dies kann auf die stärkere Solvatisierung von SO_4^{2-} im Vergleich zu Γ^- in Lösungsmittelgemischen mit höherem Wasseranteil zurückgeführt werden. Während Γ^- eine freie Hydratisierungsenergie von $\Delta G_{\text{hydr}} = -283 \text{ kJ/mol}$ aufweist, ist die freie Hydratisierungsenergie von SO_4^{2-} mit $\Delta G_{\text{hydr}} = -1090 \text{ kJ/mol}$ wesentlich höher.^[13]

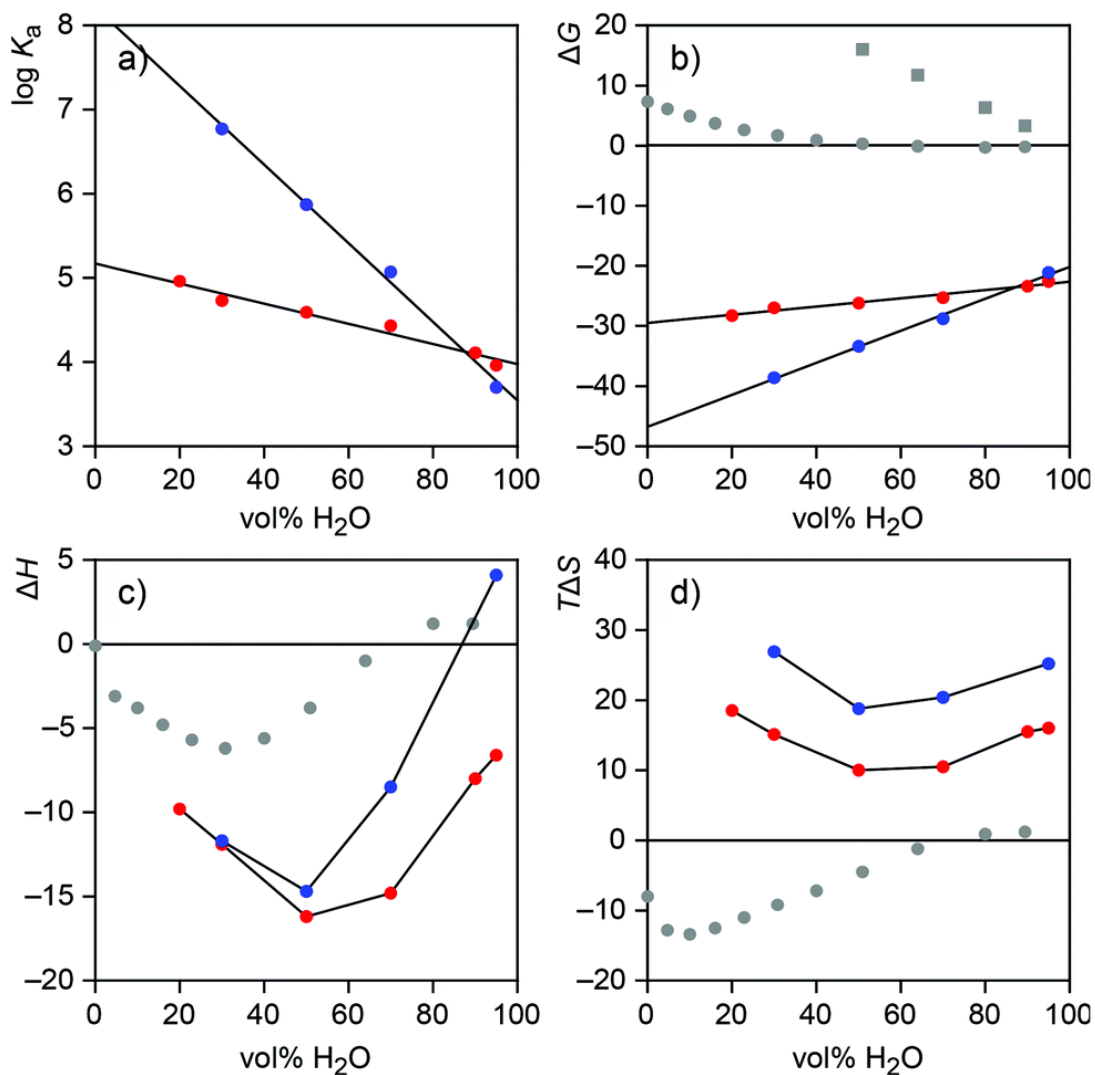


Abbildung 19 Grafische Darstellung der Abhängigkeit von a) $\log K_a$, b) ΔG , c) ΔH , d) $T\Delta S$ der Komplexbildung von **BPCI** mit SO_4^{2-} (blau) und Γ^- (rot) von der Lösungsmittelzusammensetzung in Wasser/Methanol.^[31] Eingezeichnet sind zudem die Energien für den Transfer von Γ^- (graue Punkte) und SO_4^{2-} (graue Vierecke) von Wasser in die entsprechenden Wasser/Methanol-Gemische.^[29,36]

Informationen zur Abhängigkeit der freien Hydratisierungsenthalpie von der Zusammensetzung der Wasser/Methanol-Gemische kann aus den literaturbekannten freien Enthalpien für den Transfer des jeweiligen Anions von Wasser in das entsprechende Lösungsmittelgemisch abgeleitet werden.^[36] Diese Daten sind in Abbildung 19b) grau eingezeichnet und zeigen, dass mit steigendem Methanolgehalt der Transfer der Anionen von Wasser zu Wasser/Methanol zunehmend endergonisch wird. Folglich wird die Desolvatisierung der Anionen mit steigendem Gehalt des organischen Lösungsmittels zunehmend leichter. Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt für SO_4^{2-} , da dieses stark koordinierende Anion von Wasser effizienter solvatisiert wird als Γ^- . Daher profitiert die

Affinität von **BCP1** für SO_4^{2-} mehr von einem ansteigenden Methanolgehalt als die Affinität für Γ^- .

Die unterschiedlich ausgeprägten Abhängigkeiten der $\log K_a$ -Werte für den Iodid- und Sulfatkomplex von **BCP1** von der Lösungsmittelzusammensetzung führen dazu, dass sich die Selektivität von **BCP1** für die beiden Anionen bei ca. 90 Vol% Wasser/Methanol umkehrt. In Lösungsmittelgemischen mit höherem Wassergehalt wird Γ^- leicht stärker komplexiert als SO_4^{2-} . Dies ist wiederum auf die stärkere Solvatisierung von SO_4^{2-} in den kompetitiven Lösungsmittelgemischen zurückzuführen. Die Gesamtstabilität des Komplexes ergibt sich aus der Balance von direkter Anion-Rezeptor-Wechselwirkung und der Anionendesolvatation. In Gemischen mit höherem Wassergehalt fällt diese Balance zugunsten des eigentlich schwächer koordinierenden Γ^- aus, da dieses leichter zu desolvatisieren ist. SO_4^{2-} bindet zwar intrinsisch stärker an **BCP1**, ist aber in stärker kompetitiven Lösungsmitteln schwerer desolvatisierbar, sodass als Ergebnis eine geringere Stabilität des entsprechenden Komplexes resultiert. Im Einklang mit dieser Interpretation ist die Sulfatkomplexierung in Gemischen mit einem Wassergehalt >90 Vol% endotherm. Diese Affinitätsinversion wurde bisher bei keinem anderen BCP beobachtet, da Untersuchungen in Lösungsmittelgemischen mit ähnlich hohen Wasseranteilen bisher nicht möglich waren.

Übereinstimmend mit früheren Studien^[28] ist die Abnahme der Stabilität des Sulfatkomplexes von **BCP1** mit zunehmendem Wasseranteil (2.7 kJ/mol pro 10 Vol% Wasseranteilerhöhung) geringer als man auf Basis der Lösungsmittelabhängigkeit der Transferenergien von SO_4^{2-} in Wasser/Methanol-Gemische erwarten würde (3.3 kJ/mol pro 10 Vol% Wasseranteilerhöhung). Dies spricht wiederum dafür, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Prolineinheiten der beiden Cyclopeptidringe von **BCP1** die Anionenkomplexierung in stärker kompetitiven Lösungsmittelgemischen günstig beeinflussen. Eine analoge Betrachtung für die Komplexierung von Γ^- ist nicht möglich, da die Transferenergien von Γ^- nicht linear von der Lösungsmittelzusammensetzung abhängt (Abbildung 19b)).

Im Gegensatz zu den $\log K_a$ bzw. den ΔG -Werten korreliert die Komplexbildungsenthalpie und -entropie nicht linear mit der Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches (Abbildung 19c) und d)). In 50 Vol% Wasser/Methanol wird unabhängig von dem Anion ein Minimum für Enthalpie und Entropie beobachtet. Bei höheren und niedrigeren Wasseranteilen wird die Komplexierung von SO_4^{2-} und Γ^- enthalpisch ungünstiger und entropisch günstiger.

Die Kompensation dieser gegenläufigen Trends führt dazu, dass die freien Komplexbildungsenthalpien für beide Anionen im untersuchten Bereich praktisch linear von der Lösungsmittelzusammensetzung abhängen.

Die in Abbildung 19a) und Abbildung 19b) ersichtliche deutlich stärkere Abhängigkeit der Sulfataffinität von **BCP1** von der Lösungsmittelzusammensetzung im Vergleich zur Iodidaffinität ist laut Abbildung 19c) auf den Verlauf der Komplexbildungsenthalpie zurückzuführen. Diese wird bei Abnahme des Wassergehaltes bei der Sulfatkomplexierung in deutlich stärkerem Maße günstiger als bei der Iodidkomplexierung. Die beiden Kurven des Verlaufs der Komplexbildungsentropie verlaufen über den untersuchten Lösungsmittelbereich dagegen praktisch parallel.

Eine Korrelation der kurvenförmigen Abhängigkeit der Komplexbildungsenthalpie von enthalpischen Parametern, die die Solvatation der Anionen in Wasser/Methanol-Gemischen beschreiben, gelingt nicht. Informationen über die Solvatation von Γ^- in solchen Lösungsmittelgemischen können wiederum aus den Transferenthalpien abgeleitet werden, die mit der Überführung von Γ^- von Wasser in Wasser/Methanol-Gemische verbunden sind. Entsprechende Werte für SO_4^{2-} sind nicht beschrieben. Die grauen Punkte in Abbildung 19c) zeigen, dass die mit dem Iodidtransfer verbundene Enthalpie ebenfalls nicht linear von der Lösungsmittelzusammensetzung abhängt. Ab einem Wassergehalt von ca. 70 Vol% und darunter ist der Iodidtransfer in Wasser/Methanol aber exotherm. Das heißt in diesen Lösungsmittelgemischen ist Γ^- besser solvatisiert als in reinem Wasser. Dieser Effekt sollte das mit der Komplexbildung verbundene ΔH ungünstig beeinflussen. Tatsächlich wird die Komplexbildungsenthalpie zwischen 95 und 50 Vol% Wasser/Methanol aber günstiger. Außerdem fällt das Minimum der Kurven von $\Delta H_{\text{Transfer}}$ und Komplexbildungsenthalpie nicht zusammen. Effekte von Ionenpaarung auf die Komplexbildungsenthalpie in Lösungsmittelgemischen mit hohem Anteil des organischen Lösungsmittels konnten ausgeschlossen werden, nachdem Titrations mit Iodidsalzen mit unterschiedlichen Gegenionen praktisch dieselben Ergebnisse lieferten.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde der Verlauf der Komplexbildungsenthalpie von der Lösungsmittelzusammensetzung zunächst qualitativ interpretiert. So wurde die Abnahme der Komplexbildungsenthalpie in Lösungsmittelgemischen mit >50 Vol% Wasser/Methanol auf die Schwächung der direkten Anion-Rezeptor-Wechselwirkungen in den kompetitiveren Lösungsmittelgemischen zurückgeführt. In Lösungsmittelgemischen mit <50 Vol% Wasseranteil nimmt die Komplexbildungsenthalpie dagegen ab, weil die

2 BIS(CYCLOPEPTIDE) ZUR ANIONENERKENNUNG IN WÄSSRIGEN MEDIEN

Desolvation des Rezeptors, die vermutlich bevorzugt auf der Wechselwirkung von Wassermolekülen mit den NH-Gruppen zurückzuführen ist, zunehmend schwieriger wird.

Diese Ergebnisse sind im Detail in der in Kapitel 2.2.4 abgedruckten Publikation beschrieben.

2.2.4 Forschungsartikel: Anion binding of a neutral bis(cyclopeptide) in water-methanol mixtures containing up to 95 % water

In diesem Artikel werden die Synthesen von **CP1** und **BCP1** beschrieben. Außerdem werden die Ergebnisse der Bindungsstudien mit **BCP1** in verschiedenen Wasser/Methanol-Gemischen bis zu 95 Vol% Wasseranteil zusammengefasst, wobei als Anionen Γ^- und SO_4^{2-} verwendet wurden.

Die Supporting Information in Kapitel 6.1 enthält die synthetischen Details, die Spektren der Verbindungen, die experimentellen Vorgehensweisen bei den Bindungsstudien und die Zusammenfassung der dabei erhaltenen Ergebnisse. [F. Sommer, S. Kubik, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8851–8860]. Urheberrecht bei *The Royal Society of Chemistry (RSC)*. Nachdruck mit Genehmigung.

Im Rahmen dieser Publikation bestand meine Aufgabe in der Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der benötigten Verbindungen sowie der Durchführung der Bindungsstudien und deren Auswertung. Herr Prof. Dr. S. Kubik war als Projektleiter mit der wissenschaftlichen Betreuung und Interpretation betraut.



Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 8851

Anion binding of a neutral bis(cyclopeptide) in water–methanol mixtures containing up to 95% water†

Fabian Sommer and Stefan Kubik*

Anion receptor **2b** was designed and synthesized, which was structurally derived from a previously described bis(cyclopeptide) **2a** comprising two covalently linked cyclic hexapeptide rings with alternating L-proline and 6-aminopicolinic acid subunits. Solubilizing groups attached to the aromatic cyclopeptide subunits of **2b** cause a substantial improvement of water solubility with respect to **2a**, but have negligible effects on anion binding properties. Thus, anion affinity of **2b** could be evaluated in aqueous solvent mixtures in which **2a** is not sufficiently soluble, namely in water–methanol with a water content of up to 95 vol%. The solvent-dependent characterization of anion binding showed that the log K_a values of the iodide and sulfate complexes of **2b** decrease linearly with increasing water content while the individual contributions of complexation enthalpy and entropy correlate with the solvent composition in a more complex manner. The obtained results provide insight into the factors that control anion affinity and selectivity of these neutral receptors in aqueous media. In addition, they show that substantial anion affinity can be expected even in 100% water.

Received 16th July 2014,
Accepted 8th September 2014

DOI: 10.1039/c4ob01497a

www.rsc.org/obc

Introduction

Molecular recognition phenomena such as the interaction of a synthetic receptor with its substrate are very sensitive to the medium in which they take place.¹ While polar binding partners generally like to associate in non-polar solvents where interactions are strong and solvation is weak, the strength of interactions generally significantly drops upon increasing solvent polarity. Polar solvents not only reduce the strength of direct non-covalent interactions, they usually also solvate the binding partners more efficiently than non-polar ones, causing complex stability to suffer from an increasing enthalpic penalty associated with the desolvating receptor and/or substrate. Desolvating binding partners in polar solvents, particularly in water, can also become the driving force of complex formation, however, if it involves the release of high-energy water,² which results in an enthalpic advantage of binding, or leads to overall higher disorder, which is entropically favourable.³

Solvent-dependent evaluation of the binding properties of a synthetic receptor can shed light on the subtle interplay of the

factors that control receptor affinity and selectivity. Such investigations were performed, for example, to characterize glucose affinity of a synthetic carbohydrate receptor in chloroform–methanol and water–methanol mixtures.⁴ A more recent investigation has addressed anion binding to diols in acetonitrile–chloroform mixtures revealing a non-linear correlation between complex stability and solvent composition.⁵ In the area of anion coordination chemistry⁶ solvent-dependent binding studies are routinely performed if a receptor turns out to possess an anion affinity in a specific solvent that is too high to be evaluated. If binding is too strong in DMSO, for example, more competitive water–DMSO mixtures are often used in which complex stability is lower and can thus be quantified.⁷ The maximum amount of water in the solvent mixture is determined by receptor solubility and is usually chosen so as to not lower complex stability below the detection limit. The increase of the water content of the solvent mixture sometimes also simplified the receptor's mode of interaction, for example, from the formation of higher to well defined 1:1 complexes,^{7e,f,h} but the consequences of changing the solvent composition on the thermodynamics of binding have not often been considered.

Here, we describe a bis(cyclopeptide) whose solubility allowed a detailed thermodynamic characterization of anion binding properties in a wide range of water–methanol mixtures. Such bis(cyclopeptides) were previously shown by us to interact with halides or sulfate anions in aqueous solvent mixtures.⁸ They derive from cyclopeptide **1** whose mode of

Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie – Organische Chemie, Erwin-Schrödinger-Straße, D-67663 Kaiserslautern, Germany.

E-mail: kubik@chemie.uni-kl.de

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthetic details for the chain elongation of dipeptides **4** and **5**, NMR and mass spectra of compounds **4**, **5**, **6**, and **2b**, and thermograms of selected ITC titrations. See DOI: 10.1039/c4ob01497a

binding involves sandwiching an inorganic anion between two cyclopeptide rings.⁹ These 2 : 1 complexes could be converted into 1 : 1 complexes by covalently connecting two cyclopeptides *via* appropriate linking units. While anion binding of **1** could be evaluated in water–methanol mixtures containing up to 80% of water, the respective bis(cyclopeptides) are, unfortunately, considerably less soluble so that the water content of the mixture used to study the properties of, for example, **2a** could not exceed 50%.^{8c} Other bis(cyclopeptides) allowed binding studies in water–acetonitrile mixtures containing up to 75% of water.^{8e} The respective investigations indicated that hydrophobic interactions between the two cyclopeptide rings not involving direct receptor/substrate interactions contribute to the overall stability of the complexes formed. To what extent anion affinity of these receptors is retained in 100% water remained an open question, however.

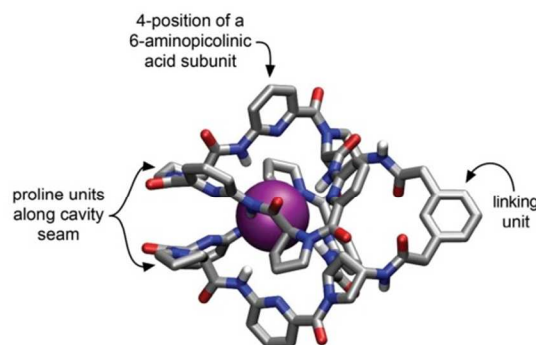
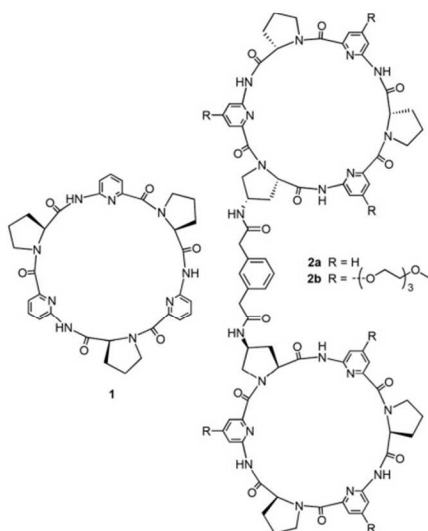


Fig. 1 Calculated geometry of the iodide complex of **2a** obtained with the MMFF94 force field as implemented in PCModel, Serena Software, Inc. Hydrogen atoms at the carbon atoms of the receptor have been omitted for clarity.^{8c}



Further work involving these bis(cyclopeptides) therefore had to address improving their water solubility to allow binding studies in more competitive solvent mixtures. In this context, bis(cyclopeptide) **2b** containing solubilizing triethylene glycol residues was designed and synthesized. The evaluation of the anion affinity of **2b** by isothermal titration calorimetry (ITC) in a range of different solvent mixtures provided information about the factors influencing the affinity and selectivity of anion binding. Understanding these factors could eventually be helpful when targeting practical applications for such receptors, for example, in environmental monitoring, where systems should best work in water.¹⁰

Results and discussion

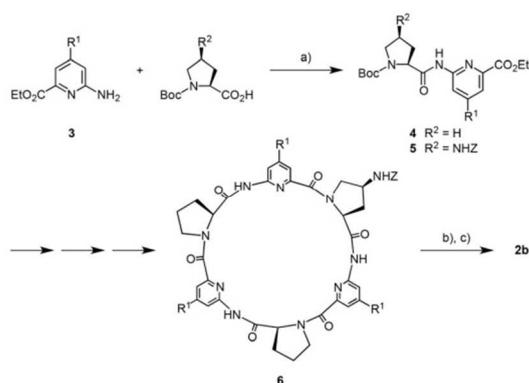
Structural design and synthesis

Our approach to improving the water solubility of **2a** without compromising binding properties relied on the introduction

of solubilizing groups into positions of the receptor in which their impact on binding properties was expected to be minimal. The corresponding structural considerations were based on the previously reported calculated structure of the iodide complex of **2a** as shown in Fig. 1.^{8c}

This structure indicates that additional substituents on the bis(cyclopeptide) proline residues would be oriented close to the seam of the cavity where the two cyclopeptide moieties approach each other. Substituents in these positions were therefore expected to affect complex formation by steric effects. The phenylene moiety of the linker is oriented away from the cavity and would therefore make a better modification site. The number of groups that could be introduced here is limited, however, and it was therefore decided to incorporate the solubilizing groups into the 4-positions of the aminopicolinic acid subunits. This strategy allowed introduction of overall six additional groups expected to exhibit no strong effect on anion affinity because they all diverge from the receptor cavity. Triethylene glycol residues were chosen as solubilizing groups, which should increase water solubility without introducing charges so that competing effects on anion binding of other negatively charged species in solution could be avoided.

The 4-substituted 6-aminopicolinic acid derivative **3** required for the synthesis of **2b** was obtained from the commercially available chelidamic acid according to a reported procedure.¹¹ This amine was coupled to (2*S*)-1-(*tert*-butyloxycarbonyl) proline and (2*S*,4*S*)-4-(benzyloxycarbonylamino)-1-(*tert*-butyloxycarbonyl)proline¹² using PyCloP as a coupling reagent to yield, respectively, the dipeptides **4** and **5** required for the synthesis of the cyclopeptide moieties of **2b** (Scheme 1). Appropriate chain elongation of these dipeptides afforded the linear cyclopeptide precursor, which was deprotected at both ends and cyclized by following established protocols.^{8a,13} The resulting cyclopeptide **6**, containing one *Z*-protected 4-aminoproline unit, was subjected to hydrogenation and then reacted with 2,2'-(1,3-phenylene)diacetic acid in the presence of TBTU.^{8c} The coupling product **2b** was obtained



Scheme 1 Synthesis of bis(cyclopeptide) **2b** (R¹ = (OCH₂CH₂)₃OCH₃). (a) Chlorotripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyCloP), *N,N*-diisopropylethylamine, CH₂Cl₂, 25 °C, 10 d, **4** 82%, **5** 96%; (b) H₂, 1.2 equiv. HCl, 10% Pd/C, CH₂Cl₂-CH₃OH, 1 : 1 (v/v), 25 °C, 18 h; (c) 2,2'-(1,3-phenylene)diacetic acid, 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (TBTU), *N,N*-diisopropylethylamine, dimethylformamide, 25 °C, 2 h, 47% over 2 steps. Z = benzyloxy carbonyl, Boc = *tert*-butoxy carbonyl.

after chromatographic purification in analytically pure form and in sufficient amounts for the following binding studies.

Qualitative binding studies

Qualitative information about the binding properties of **2b** was derived from ESI mass spectrometric and NMR spectroscopic investigations. Because the water solubility of **2b**, although considerably improved by the presence of the six triethylene glycol residues, unfortunately turned out to be still insufficient to allow binding studies in 100% water, these experiments were performed in 90% water-methanol. In addition, measurements in 50% water-methanol mixtures were carried out to compare the properties of **2b** with those of **2a**. These binding studies concentrated on sulfate and iodide as substrates because both anions generally exhibit strongest interactions with our bis(cyclopeptides) and represent prototypes of strongly and weakly coordinating anions, respectively.^{8,13}

Fig. 2 shows the ESI-TOF MS spectra of **2b** in the presence of sodium iodide or sulfate. In all spectra, the most prominent peak is that of the 1 : 1 complex between the bis(cyclopeptide) and the respective anion ($[M + I]^- = 2590.0$, $[M + SO_4]^{2-} = 1279.5$). Minor additional peaks could be assigned to the chloride complex ($[M + Cl]^- = 2498.1$). Mass spectrometry thus indicated that **2b** binds to iodide and sulfate anions independent of the composition of the solvent mixture. Moreover, the major complex species are 1 : 1 complexes as in the case of other structurally related bis(cyclopeptides).⁸

Additional evidence for the ability of **2b** to interact with anions in 90% water-methanol came from NMR spectroscopy. Fig. 3 shows the effect of sulfate anions on the ¹H NMR spectra of **2b** in 50% D₂O-CD₃OD and 90% D₂O-CD₃OD. In the absence of sulfate anions the H(α) protons on the proline residues of **2b** absorb between 5.60 and 5.76 ppm in 50%

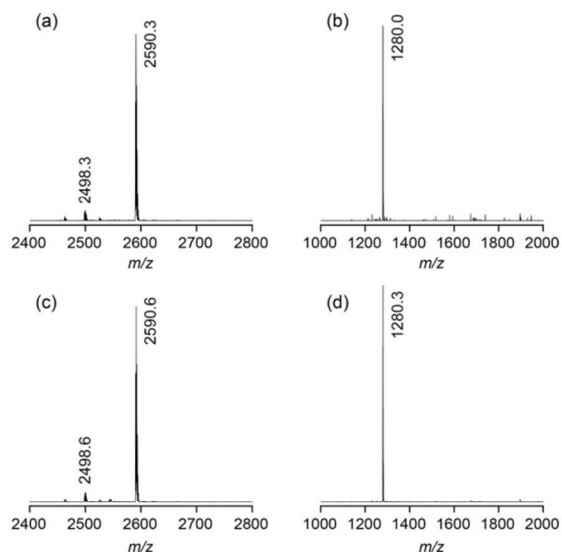


Fig. 2 ESI-TOF MS spectra (negative mode) of **2b** (1 mM) in the presence of 1 equiv. of NaI (a) or Na₂SO₄ (b) in 50% water-methanol and 1 equiv. of NaI (c) or Na₂SO₄ (d) in 90% water-methanol.

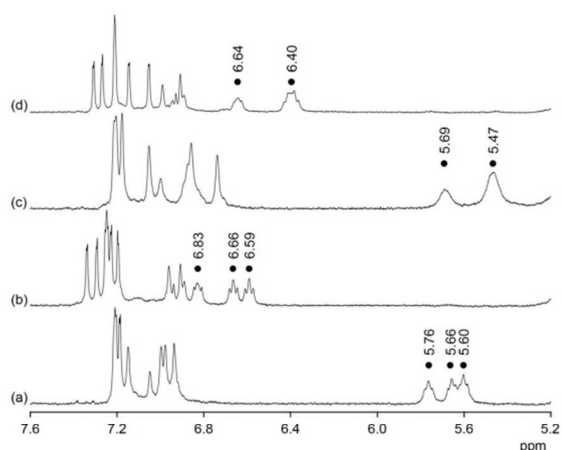


Fig. 3 ¹H NMR spectra of **2b** (1.8 mM) prior (a) and after (b) the addition of 2 equiv. of Na₂SO₄ in 50% D₂O-CD₃OD and of **2b** (1.0 mM) prior (c) and after (d) the addition of 2 equiv. of Na₂SO₄ in 90% D₂O-CD₃OD. The dots indicate the signals of the H(α) protons on the proline residues of **2b**.

D₂O-CD₃OD. In 90% D₂O-CD₃OD these signals are slightly shifted upfield and those of the unsubstituted proline rings collapse into one. Addition of sulfate causes a substantial downfield shift of the proline H(α) signals in both solvents by ca. 1 ppm. In addition, spreading out of the signals in the aromatic region of the spectra is observed. Both effects are characteristic features of all anion binding bis(cyclopeptides) studied so far.^{8,13} The shifts of the proline H(α) signals, for example, are due to the spatial proximity of the corresponding protons

to the anion once it is included into the bis(cyclopeptide) cavity. NMR spectroscopy thus indicates that the mode of anion binding of **2b** does not differ from that of structurally related receptors and that it is independent of solvent composition. Analogous albeit slightly smaller shifts of the proline H (α) signals were observed in the ^1H NMR spectra of **2b** after addition of iodide anions in both solvent mixtures, consistent with the more weakly coordinating nature of the halide in comparison with sulfate anions (see ESI†).

Quantitative binding studies

Anion binding of **2b** was quantified by isothermal titration calorimetry (ITC).¹⁴ Initial investigations addressed the question if and to what extent anion affinity of **2b** is affected by the presence of the triethylene glycol units. To this end, binding of **2b** to iodide and sulfate was evaluated in a solvent mixture, in which quantitative information about the properties of **2a** is available, namely in 50% water–methanol. The obtained results together with the ones previously reported for bis(cyclopeptide) **2a** are summarized in Table 1.

Table 1 shows that iodide and sulfate affinity of **2b** in 50% water–methanol is practically indistinguishable from that of **2a**. Moreover, no major differences are apparent within the error limits in the thermodynamics of complex formation. The conclusion that can be drawn from this result is that, in accordance with the design strategy, the impact of the triethylene glycol residues in **2b** on anion affinity is negligible. Compound **2b** can thus be expected to behave like previously described bis(cyclopeptides) with the important advantage that it allows anion recognition to be followed in much more competitive media.

Anion binding of **2b** was subsequently studied in a range of different water–methanol mixtures. While iodide recognition could be evaluated in mixtures containing between 20% and 95% of water, solubility problems prevented titrations with sodium sulfate in mixtures containing less than 30% of water. In addition, no reliable results could be derived from the titration with sodium sulfate in 90% water–methanol because the enthalpy of sulfate complexation changes sign close to this solvent composition. The results of all measurements are summarized in Table 2 and depicted graphically in Fig. 4. The stoichiometric factors n deriving from these titrations support the 1 : 1 stoichiometry of both anion complexes of **2b**.

Fig. 4a and 4b show that, as expected, iodide and sulfate affinity of **2b** decrease upon increasing the water content of the solvent. For both anions the correlation is linear ($r^2 > 0.97$), with a more pronounced drop observed for sulfate binding. The different slopes of the lines cause an inversion of anion affinity from sulfate as the better substrate across the major range of solvent compositions to iodide in mixtures containing more than 90% of water. Thus, the intrinsically less strongly coordinating anion forms the more stable complex in the most competitive solvent mixtures. Assuming that the observed linear correlation between complex stability and solvent composition extends to 100%, an iodide affinity $\log K_a$ of 4.0 can be expected for **2b** in water and a sulfate affinity of 3.5.

While the reduction of complex stability in the more competitive solvent mixtures has several reasons, one being the weakened receptor/anion interactions, the different extents to which sulfate and iodide affinity of **2b** decrease with increasing water content of the solvent are likely partially due to the

Table 1 Association constants, enthalpies, and entropies of binding of Na_2SO_4 and NaI to bis(cyclopeptides) **2a** and **2b**^a

	Sulfate			Iodide		
	$\log K_a$	ΔH	$T\Delta S$	$\log K_a$	ΔH	$T\Delta S$
2a ^{8c}	5.97 ± 0.02	-13.2 ± 1.1	20.9 ± 1.2	4.43 ± 0.11	-15.4 ± 0.7	9.8 ± 1.2
2b	5.87 ± 0.02	-14.7 ± 0.8	18.8 ± 0.8	4.59 ± 0.01	-16.2 ± 0.8	10.0 ± 0.7

^a Recorded in 50% water–methanol at 298 K; energies in kJ mol^{-1} ; the values are means of at least three independent measurements with the standard deviations specified.

Table 2 Association constants, enthalpies, entropies, and stoichiometric factors for the binding of Na_2SO_4 and NaI to bis(cyclopeptide) **2b** in different solvent mixtures^a

Vol% ^b	Sulfate				Iodide			
	$\log K_a$	ΔH	$T\Delta S$	n	$\log K_a$	ΔH	$T\Delta S$	n
20	n.d. ^c	n.d.	n.d.	n.d.	4.96 ± 0.02	-9.8 ± 0.3	18.5 ± 0.3	1.01
30	6.77 ± 0.10	-11.7 ± 0.2	26.9 ± 0.7	0.93	4.73 ± 0.01	-11.9 ± 0.2	15.1 ± 0.2	0.99
50	5.87 ± 0.02	-14.7 ± 0.8	18.8 ± 0.8	0.93	4.59 ± 0.01	-16.2 ± 0.8	10.0 ± 0.7	1.03
70	5.07 ± 0.02	-8.5 ± 0.3	20.4 ± 0.4	0.93	4.43 ± 0.02	-14.8 ± 0.2	10.5 ± 0.3	1.03
90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.12 ± 0.02	-8.0 ± 0.4	15.5 ± 0.5	1.08
95	3.70 ± 0.05	4.1 ± 0.8	25.2 ± 0.5	0.77	3.96 ± 0.03	-6.6 ± 0.3	16.0 ± 0.5	1.18

^a Recorded at 298 K; energies in kJ mol^{-1} ; the values are means of at least three independent measurements with the standard deviations specified. ^b Vol% of water in the water–methanol mixture. ^c Not determined.

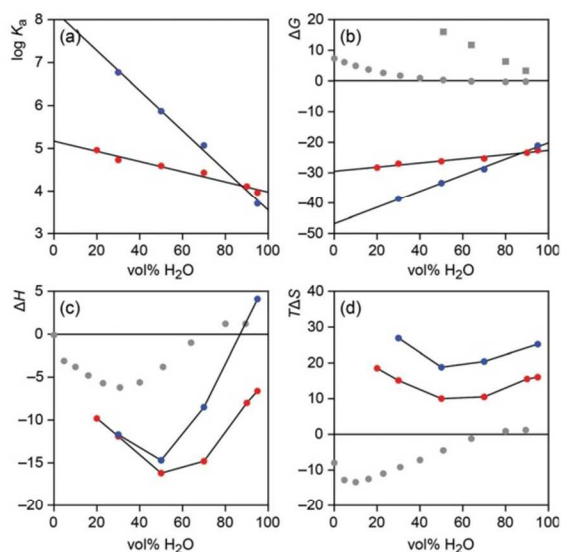


Fig. 4 Solvent dependence of the stability (a), Gibbs free energy of formation (b), formation enthalpy (c), and formation entropy (d) of the iodide (red) and sulfate (blue) complexes of **2b**. In addition, b–d contain data about the Gibbs energy (b), enthalpy (c), and entropy (d) of the transfer of iodide (grey dots) and sulfate (grey squares) anions from water to water–methanol mixtures.¹⁶ All energies in kJ mol^{-1} .

different nature of both anions, reflected in the ease with which they are desolvated. With a free energy of hydration ΔG_{hydr} of $-1090 \text{ kJ mol}^{-1}$, sulfate anions are significantly more strongly solvated in water than iodide anions whose free energy of hydration amounts to -283 kJ mol^{-1} .¹⁵ Information about how these values change in water–methanol mixtures can be derived from the literature known Gibbs energies required for transferring the respective anion from water into a water–methanol mixture.¹⁶ The corresponding data, included in Fig. 4b, show that transferring iodide or sulfate anions from water to water–methanol mixtures becomes increasingly endergonic as the methanol content of the solution rises. Thus, desolvating both anions becomes easier in terms of ΔG in less polar media, where interactions can also be assumed to be stronger. Not surprisingly, this effect is more pronounced for the strongly coordinating, doubly charged sulfate anion, which is consistent with the stronger dependence of sulfate affinity on solvent composition. Thus, sulfate affinity of **2b** presumably benefits stronger than iodide affinity from the increasingly more facile anion desolvation as the methanol content of the solvent rises. Conversely, in the high water content solvents, anion desolvation has a stronger detrimental effect on complex stability in the case of sulfate. In these solvents, the free energy required for desolvating the sulfate anion seems to compensate sulfate/receptor interactions to such an extent that the overall $\log K_a$ of the sulfate complex approaches or even falls behind that of the complex with the intrinsically weaker bound but less efficiently hydrated iodide anion.

In this context it is worth noting that the stability of the sulfate complex of **2b** drops less steeply with increasing water content of the solvent mixture than expected on the basis of the solvent dependence of the Gibbs energy of sulfate desolvation. Specifically, one would expect sulfate affinity of **2b** to drop by 3.3 kJ mol^{-1} with every 10% increase of water based on the extent to which the Gibbs energy of the transfer of sulfate anions changes with solvent composition, yet the observed decrease of the complex stability only amounts to 2.7 kJ mol^{-1} . This result is consistent with previous results obtained for iodide complexation of another bis(cyclopeptide) in water–acetonitrile mixtures, and supports the notion that hydrophobic interactions between the apolar subunits of the cyclopeptide moieties of these bis(cyclopeptides) contribute to complex stability in solvents with a high water content.^{8e} These hydrophobic interactions reinforce complex stability beyond the strength of the direct receptor/substrate interactions.^{17a} Unfortunately, analogous considerations for iodide complexation are less clear because the Gibbs energy of the transfer of iodide anions from water to water–methanol mixtures does not change linearly with solvent composition (Fig. 4b).

Further insights into the solvent-dependent thermodynamics of anion binding to **2b** were obtained by considering the enthalpic and entropic contributions independently. Interestingly, it turned out that the complexation enthalpy and entropy do not correlate with solvent composition in a linear fashion (Fig. 4c and 4d). Both thermodynamic parameters exhibit U-shaped curves with minima at 50% water–methanol independent of the anion. In mixtures containing more or less water, complex formation is enthalpically less favourable and entropically more favourable. These opposing enthalpic and entropic terms produce an overall monotonous decrease of the absolute values of the Gibbs energies of complex formation across the whole investigated solvent range.^{17b}

Comparing the curves in Fig. 4b and 4c shows that the more pronounced drop of the sulfate affinity of **2b** upon increasing the water content of the solvent is mainly enthalpic in origin. While the difference in the complexation entropy of sulfate and iodide binding remains relatively constant over the range of solvent mixtures studied, sulfate binding becomes enthalpically significantly less favourable in more competitive media than iodide binding, eventually causing sulfate complexation to become endothermic in 95% water–methanol. To relate this effect to the desolvation enthalpies of iodide and sulfate anions is not straightforward, however.

In water, desolvating the more strongly coordinating doubly charged sulfate anion requires more energy than dehydrating iodide ($\Delta H_{\text{hydr}}(\text{SO}_4^{2-}) = -1035 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H_{\text{hydr}}(\text{I}^-) = -291 \text{ kJ mol}^{-1}$). Conversely, dehydration of sulfate is entropically more favourable ($\Delta S_{\text{hydr}}(\text{SO}_4^{2-}) = -200 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, $\Delta S_{\text{hydr}}(\text{I}^-) = -36 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).¹⁵ Assuming that these trends hold over the whole range of solvent mixtures studied, they are consistent with the generally less favourable enthalpy and more favourable entropy of sulfate over the iodide binding observed for **2b**. Exact information about the dependence of the thermodyna-

mics of anion desolvation on solvent composition can again be derived from the enthalpies and entropies associated with transferring an anion from water to water–methanol mixtures. These values are reported for iodide and have been included in Fig. 4c and 4d.^{16a} Respective thermodynamic data for sulfate are not available.

Interestingly, Fig. 4c and 4d show that the enthalpy and entropy of transferring iodide from water into water–methanol mixture also do not correlate linearly with solvent composition. Transferring iodide into a mixture with higher water content is slightly endothermic. At *ca.* 70% water content desolvation enthalpy changes sign and the exothermicity of desolvation reaches a maximum in *ca.* 30% water–methanol. Thus, desolvating iodide is more difficult in water–methanol mixtures than in 100% water below a water content of 70%. This trend is clearly not reflected in the observed enthalpic contribution to iodide complexation of **2b**, which is most favourable in 50% water–methanol. A correlation of the enthalpy of iodide binding and desolvation is therefore not directly evident. In addition, due to the lack of respective data for sulfate anions a comparison of how desolvation enthalpies of the two anions differ when varying the solvent composition cannot be made.

One also has to consider that ITC titrations yield a global picture of complex formation involving several contributions, which makes it problematic to attribute an observed effect to a single cause. Besides anion desolvation, the thermodynamics of forming a complex such as the one shown in Fig. 1 are also affected by desolvation of parts of the receptor and by direct receptor/substrate interactions. In addition, binding of the anion could require separating an ion pair, particularly in less polar media, which could have an additional impact on the overall thermodynamic signature of complex formation.

It can be expected that direct interactions between an anion and **2b** are favoured by enthalpy. The increase of the water content of the solvent should diminish this favourable term while desolvation of the binding partners should produce a favourable entropic term for complex formation. These qualitative trends are indeed visible in solvents containing more than 50% of water (Fig. 4c and 4d), but to explain the increasingly unfavourable enthalpy of binding and the increasingly favourable entropy of binding in solvent mixtures with a high methanol content other factors have to be considered. One could relate to ion pairing, which could make it more difficult to bind the anion in less polar media. To test this assumption, iodide complexation was also characterized in the least polar solvent mixture by using sodium iodide in the presence of an excess of 15-crown-5 and tetramethylammonium iodide. Should ion pairing have an effect of iodide binding, changing the nature of the cation was expected to result in characteristic changes in the thermodynamic signature of iodide complexation. Interestingly, it turned out that the interactions between **2b** and iodide anions are practically independent of the counterion (Table 3), which strongly suggests that ion pairing is not responsible for the reduction of the enthalpic contribution to complex formation observed in solvent mixtures containing more than 50% of methanol.

Table 3 Association constants, enthalpies, and entropies of binding of the iodide anion to bis(cyclopeptide) **2b** in the presence of different counterions^a

Counterion	log K_a	ΔH	$T\Delta S$
Sodium	4.96	−9.8	18.5
Sodium + 15-crown-5	4.92	−10.1	18.0
Tetramethylammonium	5.02	−10.7	17.9

^a Recorded at 298 K; energies in kJ mol^{−1}.

An indirect indication that the solvent-dependent changes of complexation enthalpy and entropy are not only related to the properties of the anions or the salts is the fact that these trends are relatively anion independent. Complexation enthalpy is the best and entropy the worst in 50% water–methanol for both anions, in spite of their significantly different properties, suggesting that the reasons for the U-shapes of the curves in Fig. 4c and 4d lie also with the receptor.

Based on these arguments, we attribute the observed reduction of the favourable binding enthalpies at high methanol content to receptor desolvation, specifically the release of solvent molecules that surround the NH groups inside the binding site of **2b**. Assuming that the binding site of **2b** is preferentially solvated by water molecules, releasing these molecules upon anion binding should become enthalpically more difficult (and entropically more favourable) as the methanol content of the solvent mixture rises. That receptor desolvation has indeed a pronounced effect on the anion binding of our bis(cyclopeptides) has been shown previously. The endothermicity of sulfate complexation of a triply-linked bis(cyclopeptide) has, for example, been partly ascribed to the enthalpically difficult desolvation of the efficiently hydrated binding site of this receptor¹³ and the highly favourable binding entropy of this and related doubly-linked bis(cyclopeptides)^{8f} to the associated entropic advantage.

The solvent-dependence of binding enthalpy observed for **2b** can thus best be rationalized by strong binding site hydration at high methanol content and weakened receptor/substrate interactions at high water content combined with the effects of anion desolvation in the more competitive solvent mixtures.‡ This interpretation is consistent with the observed trends in complexation entropy. Binding becomes entropically more favourable in solvents with a high water content because anion desolvation and hydrophobic interactions within the anion complexes of **2b** contribute favourably to complex formation while the release of water molecules from the binding site of the receptor explains the favourable entropic term in solvents containing an excess of methanol.

‡ Additional contributions could come from effects of solvent composition on receptor preorganization, which are, however, difficult to assess, although the effects of solvent composition on the NMR spectra of **2b** (Fig. 2) indicate that receptor conformation is affected by the solvent.

One additionally has to consider that enthalpy and entropy generally correlate with enthalpic improvements of complex stability being associated with negative effects on complexation entropy and *vice versa*.^{17b} This correlation, which can be rationalized in terms of entropic disadvantages resulting from the tightening of receptor/substrate interactions, is also evident when comparing the influence of solvent composition on the enthalpy and the entropy of anion binding of **2b**. Changes in solvent composition that lead to a more favourable binding enthalpy evidently have a negative influence on the entropy of binding.

Conclusions

In conclusion, by introducing solubilizing groups into the 6-aminopicolinic acid subunits of **2a** considerable progress has been made in improving the water solubility of these bis(cyclopeptides). While solubility in 100% water could not be achieved, the corresponding bis(cyclopeptide) **2b** allowed anion binding to be quantified in water-methanol mixtures containing up to 95% water. These investigations revealed subtle effects of the composition of the solvent mixture on the thermodynamics of binding. The obtained results provide insight into the factors that influence the interactions of these neutral receptors with anions in aqueous media, demonstrating, for example, the importance of solvation effects for complex formation, which could cause a weakly coordinating anion to bind more strongly to a receptor in competitive aqueous media than a strongly coordinating one.

Moreover, extrapolation of the binding properties of **2b** to 100% water suggested substantial iodide and sulfate affinity even in water. With a $\log K_a$ of *ca.* 4, the expected iodide affinity of these bis(cyclopeptides) in water is of the same order, potentially even higher than that of other previously described neutral anion receptors such as the bambusurils or related analogues. The next generation of water-soluble bis(cyclopeptides) is now required to confirm these results. These receptors will likely feature other solubilizing groups in the aminopicolinic acid subunits or additional groups in the linker. Work in both directions is currently in progress.

Experimental

General details

Analyses were carried out as follows: melting points, Müller SPM-X 300; NMR, Bruker DPX 600, Bruker DPX 400 (peak assignments were confirmed by using H,H-COSY and HMQC spectra, spectra of Boc-protected linear peptides were measured at 100 °C in *d*₆-DMSO because the hindered rotation around the bond between the Boc group and the proline nitro-

gen atom complicates the spectra at 25 °C); MALDI-TOF-MS, Bruker Ultraflex TOF/TOF; ESI-MS, Bruker Esquire 6000; elemental analysis, Elementar vario Micro cube; optical rotation, Perkin Elmer 241 MC digital polarimeter (*d* = 10 cm); RP chromatography, MERCK LiChrorep RP-8 (40–63 μm) pre-packed column size B (310-25); preparative HPLC, Dionex Ultimate 3000 (column, Supelco, Ascentis C18, 250 × 21.2 mm, 5 μm particle size; flow, 10 mL min⁻¹; eluent, aqueous: water, organic: acetonitrile; the following gradients were used for the isolation of **6** and **2b**: **6**: 0 min, 25% organic; 0–38 min, linear increase to 45% organic; 38–40 min, linear increase to 50% organic; 40–42 min, 50% organic; 42–45 min, linear decrease to 25% organic; 45–50 min, 25% organic; **2b**: 0 min, 25% organic; 0–35 min, linear increase to 40% organic; 35–48 min, 40% organic; 48–50 min, linear decrease to 25% organic; 50–55 min, 25% organic); ITC, Microcal VP-ITC.

The following abbreviations are used: Boc, *tert*-butoxy carbonyl; Z, benzyloxy carbonyl; DIEA, *N*-ethyl-diisopropylamine; PyCloP, chlorotripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate; TBTU, *O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate; Pro, L-proline; Apro, (4*S*)-4-amino-L-proline; Pda, 2,2'-(1,3-phenylene)diacetic acid, Mapa, 4-[2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]-2-aminopyridine-6-carboxylic acid; Teg, triethylene glycol.

Materials

All solvents were dried according to standard procedures prior to use. DMF p.a. was purchased and used without further purification. PyCloP was prepared according to the literature procedures while TBTU was purchased.

Dipeptide Boc-Pro-Mapa-OEt **4**. Amine **3**¹¹ (0.82 g, 2.5 mmol) and (2*S*)-1-(*tert*-butyloxycarbonyl)proline (0.65 g, 3.0 mmol) were dissolved in dry dichloromethane (50 mL). To this solution PyCloP (1.26 g, 3.0 mmol) and DIEA (1.04 mL, 6.0 mmol) were added. The mixture was stirred at 25 °C for 10 d. Afterwards the solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by column chromatography (SiO₂, ethyl acetate). Yield 1.08 g (82%), colourless solid; m.p. 44–48 °C; $[\alpha]_D^{25} = -33.3$ (*c* = 1, chloroform); ¹H NMR (600 MHz, 100 °C, [D₆]DMSO): δ = 10.10 (s, 1H, NH), 7.86 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, MapaH(3)), 7.29 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, MapaH(5)), 4.47–4.49 (m, 1H, ProH(α)), 4.36 (q, ³*J* = 7.0 Hz, 2H, ethyl-CH₂), 4.27 (t, ³*J* = 4.8 Hz, 2H, TegCH₂), 3.81 (t, ³*J* = 4.8 Hz, 2H, TegCH₂), 3.54–3.63 (m, 6H, TegCH₂), 3.36–3.46 (m, 4H, ProH(δ)/TegCH₂), 3.27 (s, 3H, TegCH₃), 2.19–2.25 (m, 1H, ProH(β)), 1.89–1.98 (m, 2H, ProH(γ)/ProH(β)), 1.81–1.85 (m, 1H, ProH(γ)), 1.38 + 1.41 (2s, 9H, Boc-H), 1.35 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 3H, ethyl-CH₃) ppm; ¹³C NMR (151 MHz, 100 °C, [D₆]DMSO): δ = 171.8 (Pro-CO), 166.4 (MapaC(4)), 163.8 (COOEt), 152.8 + 153.0 (MapaC(2)/Boc-CO), 147.5 (MapaC(6)), 107.4 (MapaC(5)), 101.9 (MapaC(3)), 78.3 (Boc-C), 67.6 + 68.1 + 69.2 + 69.3 + 69.6 + 70.8 (TegC), 60.5 (ethyl-CH₂), 59.7 (ProC(α)), 57.3 (TegCH₃), 46.1 (ProC(δ)), 29.7 (ProC(β)), 27.5 (Boc-CH₃), 22.8 (ProC(γ)), 13.3 (ethyl-CH₃) ppm; MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 526.3 (100) [M + H]⁺, 548.3 (75) [M + Na]⁺, 564.3 (13) [M + K]⁺; elemental

§The $\log K_a$ of the iodide complex of bambus[6]juril in acetonitrile-water 1:1 amounts to 5.9^{19a} and that of biotin[6]juril in carbonate buffer at pH 10.8 to 3.3.^{19b}

analysis calcd (%) for $C_{25}H_{39}N_3O_9 \cdot H_2O$: C 55.24, H 7.60, N 7.73; found C 55.42, H 7.38, N 7.36.

Dipeptide Boc-(4Z-Apro)-Mapa-OEt 5. Amine **3** (1.1 mmol) and (2S,4S)-4-(benzyloxycarbonylamino)-1-(*tert*-butyloxycarbonyl)proline (0.66 g, 1.8 mmol) were dissolved in dry dichloromethane (40 mL). To this solution PyCloP (0.76 g, 1.8 mmol) and DIEA (0.76 mL, 4.4 mmol) were added. The mixture was stirred at 25 °C for 10 d. Afterwards the solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by column chromatography (SiO₂, ethyl acetate). Yield 1.09 g (96%), colourless solid; m.p. 74–77 °C; $[\alpha]_D^{22} = -16.7$ ($c = 1$, chloroform); ¹H NMR (600 MHz, 100 °C, [D₆]DMSO): $\delta = 10.28$ (s, 1H, NH), 7.85 (d, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, MapaH(3)), 7.29–7.35 (m, 6H, MapaH(5)/PhH), 6.91 (d, ³J = 6.1, 1H, Z-NH), 5.07 (d, ²J = 12.7 Hz, 1H, Z-CH₂), 5.04 (d, ²J = 12.7 Hz, 1H, Z-CH₂), 4.49–4.51 (m, 1H, AproH(α)), 4.36 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H, ethyl-CH₂), 4.26 (t, ³J = 4.8 Hz, TegCH₂), 4.08–4.12 (m, 1H, AproH(γ)), 3.81 (t, ³J = 4.8 Hz, 2H, TegCH₂), 3.72–3.75 (m, 1H, AproH(δ)), 3.61–3.63 (m, 2H, TegCH₂), 3.54–3.58 (m, 4H, TegCH₂), 3.44–3.46 (m, 2H, TegCH₂), 3.25–3.28 (m, 4H, AproH(δ)/TegCH₃), 2.53–2.58 (m, 1H, AproH(β)), 1.91–1.96 (m, 1H, AproH(β)), 1.37 + 1.40 (2s, 9H, Boc-H), 1.35 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, ethyl-CH₃) ppm; ¹³C NMR (151 MHz, 100 °C, [D₆]DMSO): $\delta = 171.7$ (Apro-CO), 166.4 (MapaC(4)), 163.7 (COOEt), 154.9 (Z-CO), 152.6 + 152.8 (MapaC(2)/Boc-CO), 147.5 (MapaC(6)), 136.5 (PhC(1)), 127.6 (PhC(3)), 127.0 (PhC(4)), 126.8 (PhC(2)), 107.5 (MapaC(5)), 102.1 (MapaC(3)), 78.7 (Boc-C), 67.6 + 68.1 + 69.2 + 69.3 + 69.6 + 70.8 (TegC), 65.0 (Z-CH₂), 60.5 (ethyl-CH₂), 58.6 (AproC(α)), 57.3 (TegCH₃), 51.4 (AproC(δ)), 48.9 (AproC(γ)), 35.2 (AproC(β)), 27.5 (Boc-CH₃), 13.3 (ethyl-CH₃) ppm; MS (MALDI-TOF) m/z (%) 675.5 (100%) [M + H]⁺, 697.5 (60) [M + Na]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₃₃H₄₆N₄O₁₁: C 58.74, H 6.87, N 8.30; found C 58.65, H 6.93, N 8.04.

cyclo[(4Z-Apro)-Mapa-(Pro-Mapa)₂] 6. The linear precursor of **6**, hexapeptide H-(4Z-Apro)-Mapa-(Pro-MAPA)₂-OH·4HCl (see ESI† for the synthesis from **4** and **5**) (1.45 g, 1 mmol) was dissolved in a mixture of degassed DMF (30 mL) and DIEA (0.77 mL, 4.4 mmol). The resulting solution was added dropwise to a solution of TBTU (1.28 g, 4.0 mmol) and DIEA (0.35 mL, 2.0 mmol) in degassed DMF (140 mL) at 80 °C over a period of 4 h. Afterwards the mixture was stirred at 80 °C for another 1.5 h. The solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by column chromatography. An initial purification step was carried out using a silica gel column (acetone). The material recovered was further purified on an RP-8 column. For this, it was dissolved in a small amount of DMF and applied to a column conditioned with 1,4-dioxane–H₂O, 1 : 10. The eluent composition was gradually changed until the pure product eluted (1,4-dioxane–H₂O, 1 : 1). Analytically pure product was obtained by preparative HPLC. Yield 0.41 g (32%), colourless solid. m.p. 63–66 °C; $[\alpha]_D^{22} = -228.9$ ($c = 3$, methanol); ¹H NMR (600 MHz, 25 °C, [D₄]MeOD–D₂O, 1 : 1 (v/v)): $\delta = 7.00$ –7.26 (m, 11H, MapaH(3)/MapaH(5)/PhH), 5.79–5.87 (m, 1H, AproH(α)), 5.63–5.72 (m, 2H, ProH(α)), 4.94 (d, ²J = 12.5 Hz, 1H, Z-CH₂), 4.90 (d, ²J = 12.4 Hz, 1H, Z-CH₂), 4.24–4.29 (m, 1H, AproH(γ)), 3.95–4.12 (m, 7H, TegCH₂/AproH(δ)), 3.69–3.81

(m, 11H, TegCH₂/ProH(δ)/AproH(δ)), 3.57–3.67 (m, 18H, TegCH₂), 3.48–3.53 (m, 6H, TegCH₂), 3.29 (s, 6H, TegCH₃), 3.28 (s, 3H, TegCH₃), 2.85–2.94 (m, 1H, AproH(β)), 2.58–2.67 (m, 2H, ProH(β)), 2.16–2.23 (m, 1H, AproH(β)), 2.02–2.12 (m, 2H, ProH(β)), 1.83–1.99 (m, 4H, ProH(γ)) ppm; ¹³C NMR (151 MHz, 25 °C, [D₄]MeOD–D₂O, 1 : 1 (v/v)): $\delta = 172.5$ + 173.1 + 173.2 (Pro-CO/Apro-CO), 168.1 + 168.2 + 168.3 + 168.4 (MapaC(4)/Mapa-CO), 158.2 (Z-CO), 153.4 + 154.0 + 154.1 (MapaC(2)), 151.6 (MapaC(6)), 137.3 (PhC(1)), 129.4 (PhC(3)), 129.0 (PhC(4)), 128.4 (PhC(2)), 109.0 (MapaC(5)), 103.1 + 103.4 (MapaC(3)), 68.8 + 69.7 + 70.7 + 70.8 + 71.2 + 72.3 (TegC), 67.6 (Z-CH₂), 63.4 + 63.5 (ProC(α)), 62.1 (AproC(α)), 59.0 (TegCH₃), 53.9 (AproC(δ)), 50.0 (ProC(δ)), 49.1 (AproC(γ)), 38.6 (AproC(β)), 33.7 (ProC(β)), 23.4 (ProC(γ)) ppm; MS (ESI/TOF positive mode) m/z (%) 1287.4 (16%) [M + H]⁺, 1309.5 (100%) [M + Na]⁺, 1325.4 (50%) [M + K]⁺; MS (ESI/TOF negative mode) m/z (%) 1285.8 (50%) [M – H][–], 1321.9 (100%) [M + Cl][–]; elemental analysis calcd (%) for C₆₂H₈₂N₁₀O₂₀·2H₂O: C 56.27, H 6.55, N 10.58; found C 56.52, H 6.47, N 10.63.

{cyclo[Apro-Mapa-(Pro-Mapa)₂]}₂Pda 2b. Cyclopeptide **6** (335 mg, 0.26 mmol) was deprotected at the aminoproline residue by dissolving it in a mixture of dichloromethane–methanol, 1 : 1 (v/v) (10 mL). After the addition of 1 N aqueous HCl (1.2 equiv., 0.31 mL) and 10% palladium–charcoal (25 mg) the mixture was stirred under a hydrogen atmosphere at atmospheric pressure until full conversion, typically for 18 h. Afterwards, the catalyst was filtered off through a pad of celite and washed thoroughly with methanol. The filtrate was evaporated to dryness and the residue was used without further purification.

The deprotected cyclopeptide was dissolved in degassed DMF (20 mL). 2,2'-(1,3-Phenylene)diacetic acid (25 mg, 0.13 mmol), TBTU (99 mg, 0.31 mmol), and DIEA (0.14 mL, 0.80 mmol) were added and the mixture was stirred at 25 °C for 2 h. After evaporation of the solvent *in vacuo* the residue was purified by preparative HPLC. Yield 0.15 g (47%), colourless solid; m.p. 100–105 °C; $[\alpha]_D^{22} = -211.1$ ($c = 1.5$, methanol); ¹H NMR (600 MHz, 25 °C, [D₄]MeOD–D₂O, 1 : 1 (v/v)): $\delta = 7.09$ –7.19 (m, 9H, MapaH(5)/PdaH(4)/PdaH(5)/PdaH(6)), 6.89–7.01 (m, 7H, MapaH(3)/PdaH(2)), 5.65–5.74 (m, 4H, ProH(α)), 5.56–5.62 (m, 2H, AproH(α)), 4.36–4.44 (m, 2H, AproH(γ)), 4.00–4.14 (m, 12H, TegCH₂), 3.88–3.95 (m, 2H, AproH(δ)), 3.71–3.85 (m, 20H, TegCH₂/ProH(δ)), 3.55–3.68 (m, 38H, TegCH₂/AproH(δ)), 3.39–3.53 (m, 16H, TegCH₂/Pda-CH₂), 3.22–3.30 (m, 18H, TegCH₃), 2.70–2.78 (m, 2H, AproH(β)), 2.61–2.68 (m, 2H, ProH(β)), 2.51–2.59 (m, 2H, ProH(β)), 2.10–2.18 (m, 2H, AproH(β)), 2.00–2.09 (m, 4H, ProH(β)), 1.87–1.98 (m, 8H, ProH(γ)) ppm; ¹³C NMR (151 MHz, 25 °C, [D₄]MeOD–D₂O, 1 : 1 (v/v)): $\delta = 172.4$ + 173.0 + 174.7 (Pro-CO/Apro-CO), 168.1 + 168.2 + 168.5 + 168.6 (MapaC(4)/Mapa-CO), 153.0 + 154.0 (MapaC(2)), 151.5 + 151.7 (MapaC(6)), 136.5 (PdaC(1)/PdaC(3)), 129.9 (PdaC(2)), 128.6 (PdaC(5)), 128.5 (PdaC(4)/PdaC(6)), 108.8 + 108.9 + 109.0 (MapaC(5)), 102.9 + 103.2 + 103.3 + 103.4 + 103.5 (MapaC(3)), 68.8 + 69.7 + 70.7 + 70.8 + 71.2 + 72.3 (TegC), 63.4 + 63.5 (ProC(α)), 62.0 (AproC(α)), 59.0 (TegCH₃), 53.7 (AproC(δ)), 50.0 + 50.1 (ProC(δ)), 47.7 + 47.8 (AproC(γ)), 43.2 (Pda-CH₂), 37.9

(AproC(β)), 33.6 (ProC(β)), 23.5 (ProC(γ)) ppm; MS (ESI/TOF positive mode) m/z (%) 1244.0 (42%) $[M + H + Na]^{2+}$, 1255.0 (100%) $[M + 2Na]^{2+}$, 2464.9 (9%) $[M + H]^+$, 2486.9 (72%) $[M + Na]^+$, 2502.8 (7%) $[M + K]^+$; elemental analysis calcd (%) for $C_{118}H_{158}N_{20}O_{38} \cdot 5H_2O$: C 55.47, H 6.63, N 10.96; found C 55.47, H 6.55, N 10.91.

Qualitative NMR spectroscopic binding studies

For the measurements in 50% D_2O - CD_3OD , stock solutions of **2b** in CD_3OD (3.6 mM) and of NaI or Na_2SO_4 in D_2O (7.2 mM) were prepared. After adding 250 μ L of a salt solution to 250 μ L of the receptor solution in an NMR tube, the tube was thoroughly shaken, and the 1H NMR spectrum was recorded (25 $^\circ$ C, 16 scans). For the measurements in 90% D_2O - CD_3OD , stock solutions of **2b** in 20% CD_3OD - D_2O (2.0 mM) and of the salts in D_2O (4.0 mM) were used. Equal volumes (500 μ L) of the receptor solution and a salt solution were mixed in an NMR tube and the 1H NMR spectrum was recorded (25 $^\circ$ C, 128 scans). The spectra of pure receptor were obtained by mixing the respective stock solution of **2b** with the appropriate volume of D_2O .

ITC titrations

The ITC titrations were carried out in water-methanol mixtures of varying compositions. Solvent mixtures were not degassed. The anionic substrates as their sodium salts (Na_2SO_4 , NaI) and **2b** were weighed using an analytical precision balance, dissolved in known volumes of the respective solvent mixture, and loaded into the system for immediate analysis. Solutions involved in the same titration experiment were made up from the same batch of solvent mixture. For the concentrations of **2b** and the different salts used in the measurements, see ESI.[†]

A standard ITC experiment involved the titration of a solution of the salt into a solution of the receptor at 25 $^\circ$ C using 30 injections of 8 μ L, separated by an interval of 180 s, with the exception of the first injection, which was 2 μ L. Binding constants and enthalpies of binding were obtained by curve fitting of the titration data using the one-site binding model. Data processing involved initial optimisation of the raw thermogram with NITPIC^{18a} and subsequent non-linear regression of the binding isotherm with Sedphat.^{18b,c} The peak produced by the first injection was discarded prior to data processing.

Acknowledgements

The support of this work by COST action CM1005 is kindly acknowledged. We also thank Prof. Dr S. Keller, Molecular Biophysics, Technische Universität Kaiserslautern for helpful discussions.

Notes and references

- 1 M. Rekharsky and Y. Inoue, in *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, ed. P. A. Gale and

- J. W. Steed, Wiley-VCH, Chichester, 2012, vol. 1, pp. 117–134.
- (a) D. B. Smithrud, E. M. Sanford, I. Chao, S. B. Ferguson, D. R. Carcanague, J. D. Evanseck, K. N. Houk and F. Diederich, *Pure Appl. Chem.*, 1990, **62**, 2227–2236; (b) E. A. Meyer, R. K. Castellano and F. Diederich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 1210–1250; (c) F. Biedermann, M. Vendruscolo, O. A. Scherman, A. De Simone and W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 14879–14888; (d) F. Biedermann, W. M. Nau and H.-J. Schneider, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, DOI: 10.1002/anie.201310958.
- (a) W. Blokzijl and J. B. F. N. Engberts, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1993, **32**, 1545–1579; (b) D. Chandler, *Nature*, 2005, **437**, 640–647.
- E. Klein, Y. Ferrand, N. P. Barwell and A. P. Davis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 2693–2696.
- A. Shokri and S. R. Kass, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 11674–11676.
- (a) A. Bianchi, K. Bowman-James and E. García-España, *Supramolecular Chemistry of Anions*, Wiley-VCH, New York, 1997; (b) J. L. Sessler, P. A. Gale and W.-S. Cho, *Anion Receptor Chemistry*, RSC, Cambridge, 2006; (c) A. Bianchi, K. Bowman-James and E. García-España, *Anion Coordination Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
- (a) B. R. Linton, M. S. Goodman, E. Fan, S. A. van Arman and A. D. Hamilton, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 7313–7319; (b) I. E. D. Vega, S. Camiolo, P. A. Gale, M. B. Hursthouse and M. E. Light, *Chem. Commun.*, 2003, 1686–1687; (c) R. J. Fitzmaurice, F. Gaggini, N. Srinivasan and J. D. Kilburn, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 1706–1714; (d) C. Caltagirone, J. R. Hiscock, M. B. Hursthouse, M. E. Light and P. A. Gale, *Chem. – Eur. J.*, 2008, **14**, 10236–10243; (e) P. A. Gale, J. R. Hiscock, C. Z. Jie, M. B. Hursthouse and M. E. Light, *Chem. Sci.*, 2010, **1**, 215–220; V. J. Dungan, H. T. Ngo, P. G. Young and K. A. Jolliffe, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 264–266; (f) D. Curiel, G. Sánchez, C. Ramirez de Arellano, A. Tárraga and P. Molina, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 1896–1904; (g) G. Sanchez, A. Espinosa, D. Curiel, A. Tárraga and P. Molina, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 9725–9737; (h) R. B. P. Elmes, K. K. Y. Yuen and K. A. Jolliffe, *Chem. – Eur. J.*, 2014, **20**, 7373–7380.
- (a) S. Kubik, R. Kirchner, D. Nolting and J. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 12752–12760; (b) S. Otto and S. Kubik, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 7804–7805; (c) C. Reyheller, B. P. Hay and S. Kubik, *New J. Chem.*, 2007, **31**, 2095–2102; (d) C. Reyheller and S. Kubik, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 5271–5274; (e) Z. Rodriguez-Docampo, S. I. Pascu, S. Kubik and S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 11206–11210; (f) Z. Rodriguez-Docampo, E. Eugenieva-Ilieva, C. Reyheller, A. Belenguer, S. Kubik and S. Otto, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 9798–9800.
- (a) S. Kubik, R. Goddard, R. Kirchner, D. Nolting and J. Seidel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 2648–2651; (b) S. Kubik and R. Goddard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 5127–5132.

- 10 (a) G. V. Oshovsky, D. N. Reinhoudt and W. Verboom, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 2366–2393; (b) M. T. Albelda, J. C. Frías, E. García-España and H.-J. Schneider, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 3859–3877; (c) C. Warwick, A. Guerreiro and A. Soares, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **41**, 1–11.
- 11 (a) A.-S. Chauvin, S. Comby, B. Song, C. D. B. Vandevyver and J.-C. Bünzli, *Chem.–Eur. J.*, 2008, **14**, 1726–1739; (b) W. Q. Ong, H. Zhao, Z. Du, J. Z. Y. Yeh, C. Ren, L. Z. W. Tan, K. Zhang and H. Zeng, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 6416–6418.
- 12 A. Fisher, A. Mann, V. Verma, N. Thomas, R. K. Mishra and R. L. Johnson, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 307–317.
- 13 T. Fiehn, R. Goddard, R. W. Seidel and S. Kubik, *Chem. – Eur. J.*, 2010, **16**, 7241–7255.
- 14 F. P. Schmidtchen, in *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, ed. C. A. Schalley, Wiley-VCH, Weinheim, 2007, pp. 55–78.
- 15 Y. Marcus, *Ion Properties*, Marcel Dekker, New York, 1997.
- 16 (a) G. Hefter, Y. Marcus and W. E. Waghorne, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 2773–2836; (b) Y. Marcus, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 3880–3897.
- 17 (a) D. H. Williams, E. Stephens and M. Zhou, *Chem. Commun.*, 2003, 1973–1976; (b) D. H. Williams and M. S. Westwell, *Chem. Soc. Rev.*, 1998, **27**, 57–63.
- 18 (a) S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C. A. Brautigam and P. Schuck, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 5066–5073; (b) J. C. D. Houtman, P. H. Brown, B. Bowden, H. Yamaguchi, E. Appella, L. E. Samelson and P. Schuck, *Protein Sci.*, 2007, **16**, 30–42; (c) <http://www.analyticalultra-centrifugation.com/sedphat/download.htm>.
- 19 (a) J. Svec, M. Dusek, K. Fejfarova, P. Stacko, P. Klán, A. E. Kaifer, W. Li, E. Hudeckova and V. Sindelar, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 5605–5612; (b) M. Lisbjerg, B. M. Jessen, B. Rasmussen, B. E. Nielsen, A. Ø. Madsen and M. Pittelkow, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 2647–2650.

2.3 Charakterisierung der Anionenaffinität von BCP1 und BCP2 in Wasser und verschiedenen Lösungsmitteln^[37]

2.3.1 Aufgabenstellung

Da die mit **BCP1** durchgeführten Bindungsstudien gezeigt haben, dass dieses BCP nicht in für Bindungsstudien ausreichendem Maße in Wasser löslich ist, bestand das Ziel in der Synthese eines besser wasserlöslichen Derivats. Das entsprechende **BCP2** (Abbildung 20) sollte in dem Linker eine weitere Triethylglycoleinheit enthalten.

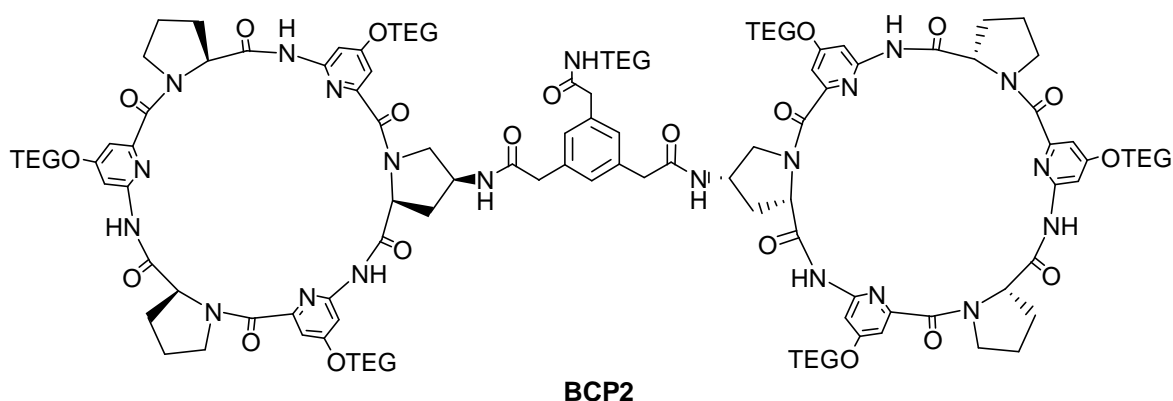


Abbildung 20 Struktur von **BCP2**.

Der Substituent im Linker sollte ebenfalls keine wesentlichen Einflüsse auf die Anionenaffinität haben, da, wie in der berechneten Struktur in Abbildung 21 zu erkennen, auch diese Position weg von der Kavität weist.

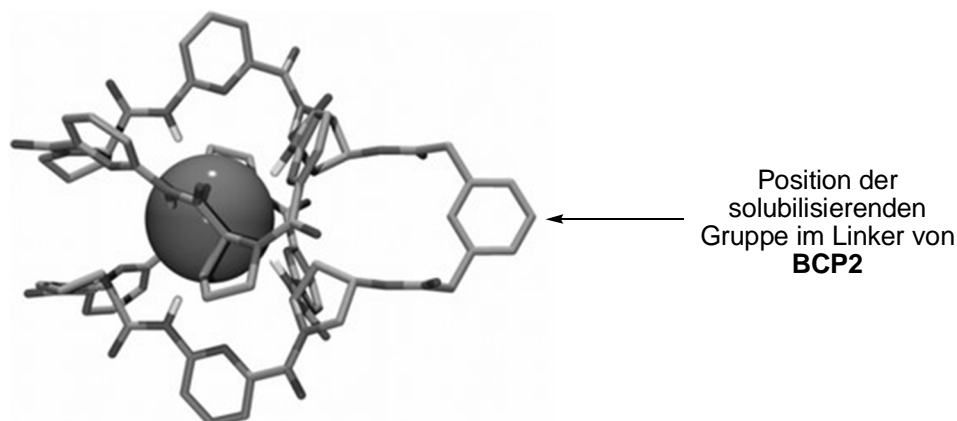


Abbildung 21 Berechnete Struktur des Iodidkomplexes von **8b**, in der die Position gekennzeichnet ist, in der sich die solubilisierende Gruppe im Linker von **BCP2** befinden soll. Reproduced (adapted) from Ref. [26] with permission from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and The Royal Society of Chemistry.

Außerdem zeigten die mit **BCP1** in Wasser/Methanol-Gemischen durchgeführten Bindungsstudien einen relativ komplexen und noch nicht vollständig verstandenen Zusammenhang zwischen Lösungsmittelzusammensetzung und Thermodynamik der Komplexbildung. Die Untersuchungen sollten daher auf andere Lösungsmittelgemische, auf reine Lösungsmittel und auf andere Anionen erweitert werden, um auf Basis eines größeren Umfangs an Datenmaterial ein besseres Verständnis der Parameter abzuleiten, die die Anionenkomplexierung dieser BCPs beeinflussen.

2.3.2 Synthese von BCP2

Um die Wasserlöslichkeit von **BCP1** zu erhöhen, wurde eine Syntheseroute für **BCP2** (Abbildung 22) ausgearbeitet.

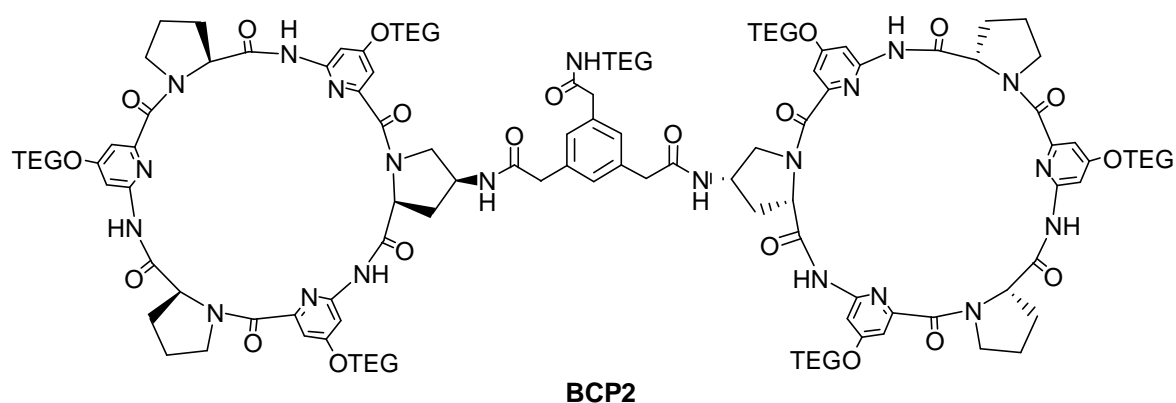
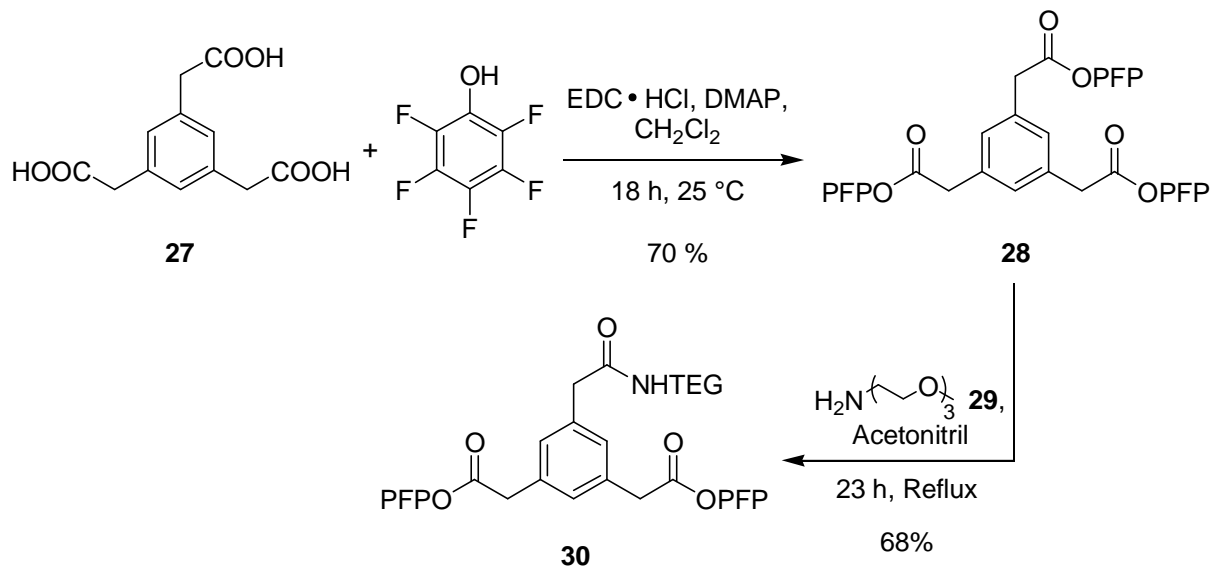


Abbildung 22 Struktur von **BCP2**.

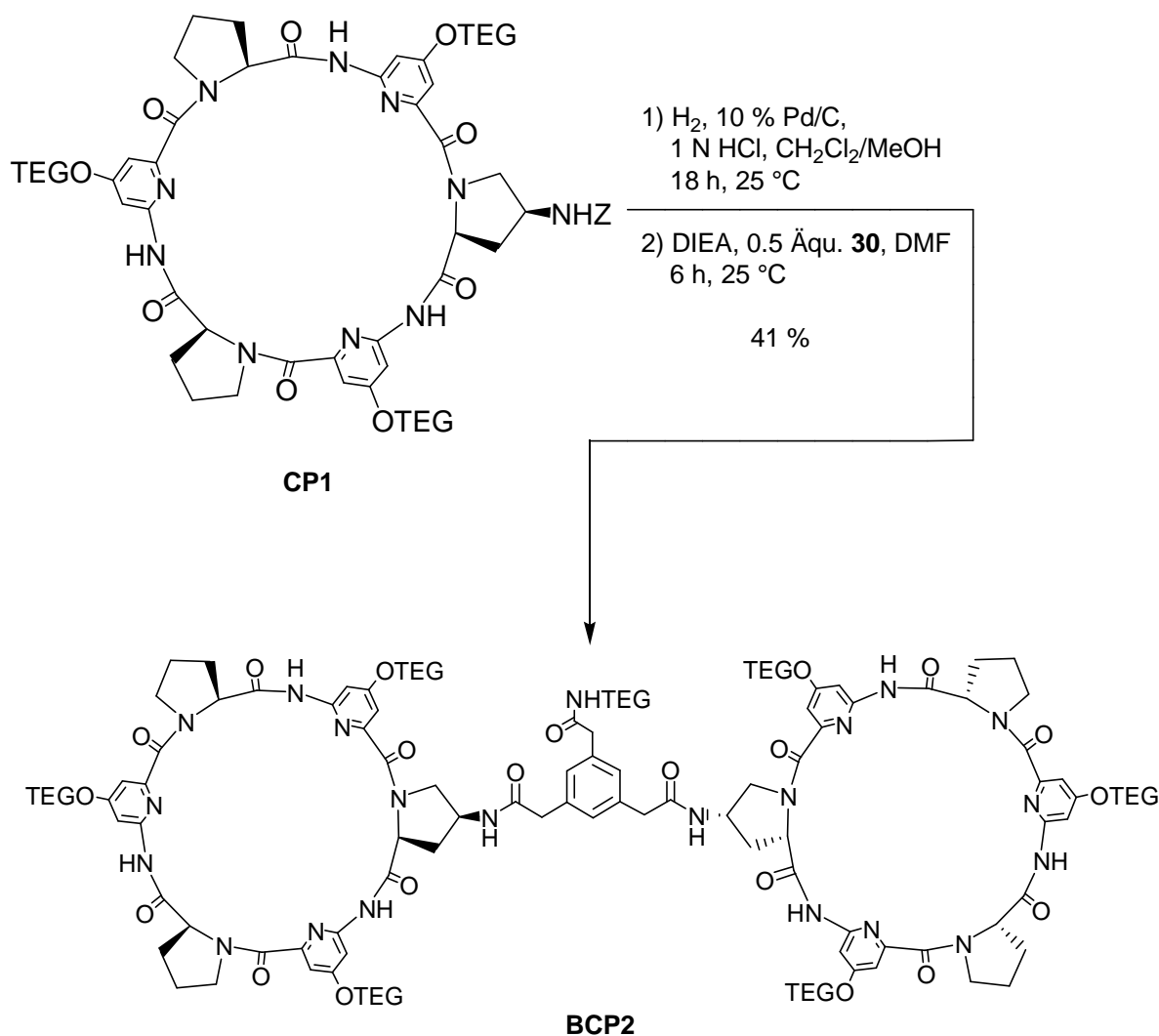
Für die Synthese des Linkers von **BCP2** wurde die kommerzielle 1,3,5-Benzoltriessigsäure **27** mit Pentafluorphenol und EDC als Kupplungsreagenz in den Triester **28** überführt (Schema 7). Im nächsten Schritt wurde in einer nucleophilen Substitution selektiv eine Pentafluorphenolgruppe gegen 2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)-ethanamin **29** substituiert. Das gewünschte Produkt **30** wurde erhalten, konnte aber nicht in analysenreiner Form isoliert werden.

2 BIS(CYCLOPEPTIDE) ZUR ANIONENERKENNUNG IN WÄSSRIGEN MEDIEN



Schema 7 Synthese des Linkerprecursors **30**.

CP1 wurde auf gleichem Wege wie für die Synthese von **BCP1** (Schema 6) entschützt und das so gebildete Monoamin unter basischen Bedingungen in DMF mit dem Aktivester **30** zum gewünschten **BCP2** mit einer Ausbeute von 41 % umgesetzt (Schema 8).



Schema 8 Kupplung von **CP1** mit **30** zu dem **BCP2**.

Nach Gefriertrocknung des analysenreinen Materials zeigte sich, dass der Rezeptor in Wasser bis zu einer Konzentration von 10 mM löslich ist. Dieser Rezeptor wurde anschließend in den Bindungsstudien verwendet, welche in Kapitel 2.3.3 beschrieben sind.

2.3.3 Bindungsstudien mit **BCP2** in Wasser

Die Affinität von **BCP2** für verschiedene Anionen in Wasser wurde mittels ITC untersucht. Als Anionen wurden Γ^- , Br^- , Cl^- , SO_4^{2-} , SeO_4^{2-} , NO_3^- , H_2PO_4^- und ClO_4^- verwendet, welche übliche Substrate für Affinitätsstudien mit Anionenrezeptoren darstellen. In den ITC-Experimenten mit SeO_4^{2-} , NO_3^- , H_2PO_4^- und ClO_4^- wurden kaum messbare Wärmetönungen beobachtet, weshalb keine Bindungskonstanten für Komplexe dieser Anionen ermittelt werden konnten. Bei NO_3^- und ClO_4^- handelt es sich um schwach

koordinierende Anionen, die gemäß der Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen nicht oder nur schwach mit CPs und BCPs in Wasser/Methanol-Gemischen wechselwirken.^[21,25] Daher ist anzunehmen, dass diese Anionen nicht an **BCP2** in Wasser binden oder dass die Wechselwirkung so schwach ist, dass keine Quantifizierung mittels ITC möglich ist. Ebenfalls wird keine oder nur eine schwache Wechselwirkung mit H_2PO_4^- erwartet, da dieses Anion über H-Brücken Donorstellen verfügt und sich in der Kavität von **BCP2** ausschließlich ebenfalls H-Brücken Donoren befinden. Daher treten bei einer potentiellen Bindung von H_2PO_4^- repulsive Wechselwirkungen auf, die den Komplex destabilisieren. Überraschend war eine ausbleibende Wärmetönung bei der Titration von **BCP2** mit SeO_4^{2-} , da dieses Anion bezüglich Größe und Härte eng mit SO_4^{2-} verwandt ist. In einer Titration von **BCP2** mit SeO_4^{2-} in 70 Vol% Wasser/Methanol konnte eine Bindungskonstante $\log K_a$ von 3.46 mit einer schwach exothermen Wärmetönung ($\Delta H = -5.1$ kJ/mol) beobachtet werden. Hieraus wurde geschlossen, dass die Komplexbildung von SeO_4^{2-} an **BCP2** in Wasser vermutlich nahezu athermisch verläuft, womit eine Auswertung in diesem Lösungsmittel nicht möglich ist. Die Ergebnisse der Titrations mit Anionen, die laut ITC in Wasser an **BCP2** binden, sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 Bindungskonstanten $\log K_a$, freie Komplexierungsenthalpien ΔG , -enthalpien ΔH und -entropien $T\Delta S$ von **BCP2** mit verschiedenen Anionen in Wasser.^{a)}

Anion	$\log K_a$	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
Γ^-	3.62 ± 0.06	-20.6 ± 0.4	-3.2 ± 0.4	17.4 ± 0.8
Br^-	3.23 ± 0.03	-18.4 ± 0.1	3.6 ± 0.1	22.0 ± 0.1
Cl^-	2.15 ± 0.11	-12.3 ± 0.6	10.1 ± 3.6	22.4 ± 3.0
SO_4^{2-}	3.31 ± 0.03	-18.9 ± 0.2	5.9 ± 0.3	24.8 ± 0.2

a) $T = 298$ K, Energien in kJ/mol, die Werte sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen mit den Standardabweichungen als Fehler, Anionen als Natriumsalze.

Die Stabilität der betreffenden Anionenkomplexe sinkt in der Reihenfolge $\Gamma^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$. In der Reihe der Halogenide wird die Komplexierungsenthalpie beim Übergang von Γ^- über Br^- zu Cl^- zunehmend ungünstiger, im Fall von Cl^- wird eine deutliche endotherme Reaktionsenthalpie ΔH von ca. 10 kJ/mol beobachtet. Der gleichzeitig in derselben Richtung günstiger werdende entropische Teil kann diesen ungünstigen enthalpischen Beitrag nicht komplett kompensieren, woraus eine bis zu einer Größenordnung geringere Stabilität des Chloridkomplexes im Vergleich zum Iodidkomplex resultiert. Die

Komplexierung von SO_4^{2-} ist ebenfalls endotherm, jedoch führt der hohe entropische Beitrag dazu, dass der Sulfatkomplex nur wenig instabiler ist als der Iodidkomplex.

Die beobachteten Trends der Anionenbindung von **BCP2** in Wasser können mit der Anionendesolvatisierung und der Stärke der direkten Rezeptor-Anion-Wechselwirkungen korreliert werden. Unter den Halogeniden koordiniert Br^- intrinsisch stärker als I^- und Cl^- am stärksten. In Wasser führt dieser Trend allerdings dazu, dass die Halogenide in der Reihe $\text{I}^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^-$ zunehmend stärker solvatisiert werden, was nachteilig für eine effektive Komplexbildung ist. Des Weiteren ist für eine starke direkte Wechselwirkung eine gute Paßgenauigkeit des Anions^[13] in der Rezeptorkavität von Vorteil. Darum ist die Wechselwirkung zwischen **BCP2** und I^- unter den Halogeniden am größten, da I^- am besten in die Kavität passt und am schwächsten solvatisiert wird.^[25,26] Das ebenfalls stark koordinierende SO_4^{2-} ist noch schwieriger zu desolvatisieren als Cl^- . Hier sind allerdings die Rezeptor-Anion-Wechselwirkungen stärker aufgrund der doppelten negativen Ladung des Anions und dem größeren Durchmesser. Daher ist die Komplexbildungsenthalpie von **BCP2** mit SO_4^{2-} um ca. 4 kJ/mol günstiger als die von Cl^- .

Die hier für **BCP2** gefundenen Selektivitäten unterscheiden sich grundsätzlich von denen anderer bisher beschriebener Rezeptoren, welche keine starken Coulombwechselwirkungen oder Koordination durch Metallzentren verwenden.^[16,17,38-40] So werden von Bambusurilen und Biotinurilen vornehmlich weiche, nicht koordinierende Anionen, zum Beispiel ClO_4^- , mit hohen Affinitäten komplexiert, die an **BCP2** nicht oder nur schwach binden. Dafür besitzen diese Rezeptoren keine Affinität für Sulfatanionen in Wasser. Ursache hierfür ist vermutlich, dass die Anionenbindung von Biotinurilen oder Bambusurilen auf eher weichen $\text{CH}\cdots\text{A}^-$ -Wechselwirkungen kombiniert mit Solvenseffekten beruht, sodass vorzugsweise weiche Anionen gebunden werden. Im Gegensatz dazu nutzt **BCP2** stärkere $\text{NH}\cdots\text{A}^-$ -Wechselwirkungen zur Anionenbindung, was die höhere Affinität für stärker koordinierende Anionen, wie SO_4^{2-} , erklären könnte.

2.3.4 Bindungsstudien mit **BCP1** in den reinen Lösungsmitteln

Die Bindung von I^- an **BCP1** in den organischen Lösungsmitteln Methanol, Acetonitril und DMSO wurde ebenfalls verglichen. Zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen hatte sich herausgestellt, dass **BCP1** in Wasser in für ITC-Studien ausreichend hohen Konzentrationen (0.25 mM) gelöst werden kann, wenn es am Ende der Synthese durch

Gefriertrocknen isoliert wird. Darum wurde die Iodidaffinität von **BCP1** auch in Wasser ermittelt. Im Rahmen des Fehlers unterscheidet sie sich nicht von der von **BCP2**, was zeigt, dass die Triethylenglycolgruppe im Linker dieses BCPs keinen Einfluss auf die Anionenaffinität besitzt. Da **BCP1** etwas leichter synthetisch zugänglich ist als **BCP2**, wurde es für diese und für die Untersuchungen in Lösungsmittelgemischen eingesetzt.

Für die Messung in Wasser wurde Natriumiodid verwendet und für die in den organischen Lösungsmitteln Tetramethylammoniumiodid. Referenzmessungen zeigten, dass das Kation des Salzes die Anionenaffinität von **BCP1** nicht signifikant beeinflusst. Wegen der geringen Löslichkeit von Natrium- und Tetramethylammoniumsulfat in organischen Lösungsmitteln, konnte die Bindung von **BCP1** an SO_4^{2-} unter diesen Bedingungen nicht untersucht werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

*Tabelle 5 Bindungskonstanten $\log K_a$, freie Komplexbildungsenthalpien ΔG , -enthalpien ΔH und -entropien $T\Delta S$ der Iodidkomplexierung von **BCP1** in verschiedenen Lösungsmitteln.^{a)}*

Lösungsmittel	$\log K_a$	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
Wasser ^{b)}	3.80 ± 0.03	-21.7 ± 0.2	-4.8 ± 0.1	16.9 ± 0.3
Methanol ^{c)}	6.38 ± 0.04	-36.4 ± 0.2	-34.2 ± 0.4	2.2 ± 0.5
Acetonitril ^{c)}	6.24 ± 0.02	-35.6 ± 0.1	-48.0 ± 0.2	-12.4 ± 0.1
DMSO ^{c)}	3.21 ± 0.05	-18.3 ± 0.3	7.1 ± 0.7	25.4 ± 0.5

a) $T = 298 \text{ K}$, Energien in kJ/mol , die Werte sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen mit den Standardabweichungen als Fehler; b) Anionen als Natriumsalze; c) Anionen als Tetramethylammoniumsalze.

Tabelle 5 zeigt die erwartete Affinitätssteigerung beim Übergang von Wasser zu Methanol oder Acetonitril, was hauptsächlich auf eine enthalpisch signifikant günstigere Komplexbildung zurückzuführen ist, während die Entropie im Sinne einer Enthalpie/Entropie-Kompensation ungünstiger wird. Der instabilste Iodidkomplex wird im Lösungsmittel DMSO gebildet, was zunächst nicht erwartet wurde.

Die einzelnen thermodynamischen Beiträge zu jedem Schritt der Komplexbildung (bspw. die Desolvatisierung von Rezeptor/Anion) können mittels ITC nicht aufgeschlüsselt werden. Dadurch geben die Daten nicht unmittelbar Aufschluss darüber, ob der Einfluss des Lösungsmittels (zum Beispiel auf die Bindungsenthalpie) auf die Desolvatation des Anions während der Komplexbildung oder die des Rezeptors oder auf andere thermodynamische Beiträge zur Komplexbildung zurückzuführen ist. Jedoch können die Ergebnisse mit lösungsmittelspezifischen Größen in Korrelation gestellt werden. Eine dieser Größen ist die freie Transferenthalpie $\Delta G_{\text{Transfer}}$, welche beschreibt, wieviel Energie nötig ist, um ein Anion

(hier Γ) von Wasser in ein organisches Lösungsmittel zu transferieren. Ein hoher endergonischer Betrag bedeutet, dass die Solvatisierung des Anions im organischen Lösungsmittel unvorteilhaft ist, woraus resultiert, dass die Desolvatisierung des Anions in dem organischen Lösungsmittel energetisch günstig ist. Eine weitere Größe ist die H-Brücken Donoracidität α , welche angibt, wie stark ein Lösungsmittel gelösten Spezies oder anderen Lösungsmittelmolekülen H-Brücken anbieten kann. Ein hoher Wert bedeutet, dass das Lösungsmittel als starker H-Brücken Donor fungieren kann. Dies ist zum Beispiel bei Methanol ($\alpha = 1.00$) oder Wasser ($\alpha = 1.17$) der Fall. Acetonitril ist dagegen ein deutlich schlechterer H-Brücken Donor ($\alpha = 0.25$) und DMSO besitzt ein α von Null, das heißt es besitzt keine H-Brücken Donoracidität. Ein analoger Parameter ist die H-Brücken Akzeptorbasizität β , welche beschreibt, wie bereitwillig ein Lösungsmittel von einer gelösten Spezies oder anderen Lösungsmittelmolekülen H-Brücken annimmt. Dieser Parameter ist wichtig im Zusammenhang mit der Rezeptordesolvatisierung. Dieser liegt umso effektiver solvatisiert vor, je höher die H-Brücken Akzeptorbasizität des Lösungsmittels ist, da die Moleküle solcher Lösungsmittel starke H-Brücken mit den BCP-Amidgruppen ausbilden können.

Mittels multiparametrischer Anpassung wurde ein Zusammenhang zwischen der beobachteten Komplexstabilität ΔG der Iodidkomplexierung von **BCP1** mit der freien Transferenthalpie $\Delta G_{\text{Transfer}}$ und der H-Brücken Donoracidität α des jeweiligen Lösungsmittels gefunden. In Tabelle 6 sind die genannten literaturbekannten Werte der verwendeten Lösungsmittel aufgelistet.

Tabelle 6 Freie Transferenthalpie $\Delta G_{\text{Transfer}}$ sowie H-Brücken Donoracidität α der verwendeten Lösungsmittel.

Lösungsmittel	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ ^{a)}	α ^[9]
Wasser	0.0	1.17
Methanol	7.3	1.00
Acetonitril	20.3	0.25
DMSO	14.1	0.00

a) Energien in kJ/mol.^[36]

Gleichung (1) beschreibt den gefundenen Zusammenhang zwischen ΔG und $\Delta G_{\text{Transfer}}$ sowie α .

$$\Delta G = -1.52 \Delta G_{\text{Transfer}} - 21.61 \alpha \quad (1)$$

Die Komplexstabilität steigt mit steigendem $\Delta G_{\text{Transfer}}$, also mit zudem zunehmend schwieriger werdenden Transfer von Γ^- aus der wässrigen in die organische Phase. Eine einfachere Anionendesolvatisierung führt also zu einer höheren Komplexstabilität, was ein plausibler Zusammenhang ist. Gleichsam folgt aus Gleichung (1), dass mit steigender H-Brücken Donoracidität des Lösungsmittels ebenfalls die Komplexstabilität steigt. Dies kann man mit einer Reorganisation der Lösungsmittelmoleküle in der Kavität bei Komplexbildung von **BCP1** mit Γ^- erklären. In Wasser ist die konkave Bindungsstelle in **BCP1** sehr wahrscheinlich mit Wassermolekülen besetzt, bevor eine Komplexbildung stattfindet. Aus früheren kristallografischen Arbeiten ist bekannt, dass das CP **9** als Trihydrat kristallisiert (Abbildung 23).^[21] Die drei Wassermoleküle befinden sich in der Kavität des CPs, wobei ein Wasserstoffatom jedes Wassermoleküls über eine H-Brücke an das Sauerstoffatom eines benachbarten Wassermoleküls bindet. Die drei Sauerstoffatome des cyclischen Wassertrimers bilden außerdem H-Brücken mit den Peptid NH-Gruppen. Ein Proton jedes Wassermoleküls ist nicht an der Bildung von H-Brücken beteiligt.

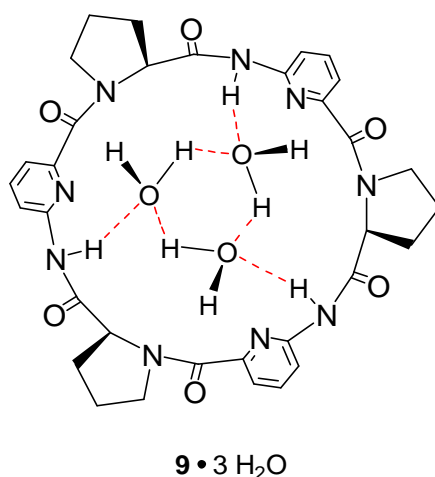


Abbildung 23 Schematische Darstellung der kristallografisch ermittelten Orientierung der drei Wassermoleküle in der Kavität des Trihydrats von CP **9**.

Insgesamt sind so die Wassermoleküle in dem solvatisierten Rezeptor in weniger H-Brücken eingebunden als in reinem Wasser. Nimmt man an, dass die Solvatisierung von **BCP1** in Wasser analog ist, führt die Komplexbildung und die dafür nötige Desolvatisierung der Bindungsstelle zu einem entropischen und vermutlich auch enthalpischen Gewinn, da die

in der Rezeptorkavität gebundenen Wassermoleküle freigesetzt werden und anschließend ihre H-Brücken Donor- und Akzeptorstellen vollständig absättigen können. Die beobachtete Abhängigkeit von ΔG von α kann somit mit der Stärke korreliert werden, mit der der HE in dem jeweiligen Lösungsmittel zur Komplexbildung beiträgt. In Lösungsmitteln mit wirksamen HEs (großes α) profitiert die Komplexstabilität. In Lösungsmitteln mit geringem α hat die Reorganisation von Solvensmolekülen dagegen keinen großen Einfluss auf die Komplexstabilität. In DMSO mit einem $\alpha = 0$ ist dieser Effekt am geringsten.

Auch wenn der HE in Methanol und Acetonitril weniger zur Komplexstabilisierung beiträgt, ist der Iodidkomplex von **BCP1** in diesen Lösungsmitteln aufgrund ihrer im Vergleich zu Wasser geringeren Polarität^[9] und dadurch stärkeren Rezeptor-Anion-Wechselwirkungen stabiler. Starke Rezeptor-Anion-Wechselwirkungen in Acetonitril und eine leichte Rezeptordesolvatisierung (geringere H-Brücken Akzeptorbasizität β ^[9] von Acetonitril im Vergleich zu DMSO) erklären die stark exotherme und gleichzeitig entropisch ungünstige Komplexbildung von **BCP1** mit Γ^- (Tabelle 5). In Methanol ist die Desolvatisierung des Anions einfacher als in Acetonitril oder DMSO, jedoch liegt der Rezeptor stärker solvatisiert vor (höheres β ^[9] von Methanol im Vergleich zu Acetonitril). Dieses gegenläufige Verhalten, sowie zu einem gewissen Teil vorhandene hydrophobe Wechselwirkungen in Methanol führen dazu, dass der Iodidkomplex in Acetonitril und in Methanol ähnlich stabil ist.

2.3.5 Bindungsstudien mit **BCP1** in Lösungsmittelgemischen

Die Komplexbildung von **BCP1** wurde außerdem in drei verschiedenen wässrigen Lösungsmittelgemischen untersucht. Diese waren Wasser/Methanol, Wasser/Acetonitril und Wasser/DMSO, wobei der Wasseranteil von 0 Vol% bis 100 Vol% variiert wurde. Die Anionen wurden vorzugsweise in Form der Natriumsalze verwendet. Nur in Gemischen mit höheren organischen Anteilen bedingte die Löslichkeit der Salze die Verwendung von Tetramethylammoniumsalzen. In Kontrolltitrationen wurde zuvor ein Einfluss der Kationen auf die Anionenaffinität ausgeschlossen.

Bei der Bestimmung der Iodidaffinität in Wasser/DMSO-Gemischen wurde in fast allen Titrationen eine sehr kleine Wärmetönung beobachtet, weshalb die Iodidaffinität in diesem Lösungsmittelgemisch nur bei 70 Vol% Wasseranteil bestimmt werden konnte. Natriumsulfat war lediglich in Gemischen zwischen 30 und 100 Vol% Wasseranteil

(Wasser/Methanol, Wasser/Acetonitril) bzw. 40 und 100 Vol% (Wasser/DMSO) in für die Messungen ausreichend hohen Konzentrationen löslich. Auch durch Verwendung anderer Sulfatsalze konnte der Bereich nicht auf Gemische mit geringerem Wasseranteil ausgeweitet werden, weshalb die Komplexierung von SO_4^{2-} nur im Bereich von 30 bis 100 Vol% (bzw. 40 bis 100 Vol%) untersucht wurde. Abbildung 24 zeigt grafisch die Abhängigkeit der freien Komplexierungsenthalpie vom Wasseranteil des jeweiligen Lösungsmittelgemisches. Dabei ist der Wasseranteil in mol% angegeben, da Lösungsmittelparameter üblicherweise in dieser Skala angegeben werden.^[9,29,36,41,42]

Abbildung 24a) zeigt die freien Komplexierungsenthalpien ΔG der Bindung von SO_4^{2-} an **BCPI** in den unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen. Es fällt auf, dass in den Wasser/DMSO-Gemischen ein steilerer Anstieg der Komplexstabilität mit Zunahme des organischen Anteils beobachtet wird als in Wasser/Methanol oder Wasser/Acetonitril. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass Wasser/DMSO-Gemische ein unvorteilhaftes Medium für das doppelt negativ geladene Sulfatanion sind (hohe $\Delta G_{\text{Transfer}}$ von Wasser zu Wasser/DMSO)^[42]. Bei Zunahme des DMSO-Gehaltes werden Sulfatanionen also leichter desolvatisiert als in anderen Lösungsmittelgemischen wodurch ein steilerer Anstieg der Komplexstabilität resultiert. Die Transferenthalpien $\Delta G_{\text{Transfer}}$ von Sulfatanionen von Wasser in Wasser/Methanol-Gemische^[36] nehmen weniger stark zu als die des Transfers in Wasser/DMSO, weshalb der Anstieg der Komplexstabilität mit Zunahme des Methanolanteils im Lösungsmittelgemisch weniger steil ausfällt. Transferenergien von SO_4^{2-} von Wasser in Wasser/Acetonitril-Gemische sind nicht verfügbar.

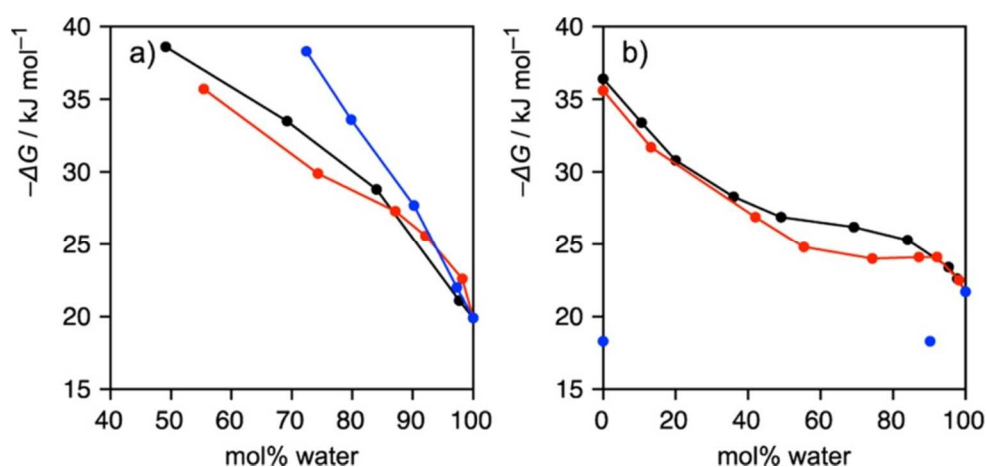


Abbildung 24 Abhängigkeit der freien Komplexierungsenthalpie ΔG der Bindung von a) SO_4^{2-} und b) Γ^- an **BCPI** von der Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches.^[37] Wasser/Methanol schwarz; Wasser/Acetonitril rot; Wasser/DMSO blau.

Die Abhängigkeit der Stabilität des Iodidkomplexes von der Lösungsmittelzusammensetzung ist in Abbildung 24b) gezeigt. Die Kurven für Wasser/Methanol- und Wasser/Acetonitril-Gemische verlaufen deutlich anders als die des Sulfatkomplexes. So bewirkt eine geringe Menge des organischen Lösungsmittels in Wasser/Methanol- und Wasser/Acetonitril-Gemischen zunächst eine Zunahme der Komplexstabilität gefolgt von einem eher moderaten Anstieg im Bereich von 10 bis 60 mol% des organischen Lösungsmittels. Erst ab über 60 mol% des organischen Lösungsmittels steigt dann die Komplexstabilität wieder stärker an.

Diese Kurven deuten darauf hin, dass die Stabilität des Iodidkomplexes nicht alleine von der Leichtigkeit der Anionendesolvatisierung abhängig ist, da die Transferenergien $\Delta G_{\text{Transfer}}$ von Γ nahezu linear mit dem Wasseranteil im Lösungsmittelgemisch korrelieren.^[36] Die beobachteten Plateauregionen, in denen die Komplexstabilität fast unabhängig von der Lösungsmittelzusammensetzung sind, sind dadurch nicht erklärbar.

Die zur Beschreibung der Abhängigkeit der Komplexstabilität von der Art des Lösungsmittels verwendete multiparametrische Analyse wurde daher auf die Lösungsmittelgemische erweitert, um zu überprüfen, ob ebenfalls eine Abhängigkeit der Komplexstabilität ΔG von $\Delta G_{\text{Transfer}}$ und α festzustellen ist. Hierfür wurden die experimentellen Daten von ΔG für alle Lösungsmittelgemische an die Gleichung (2) angepasst, für die Werte für $\Delta G_{\text{Transfer}}$ und α verfügbar waren.

$$\Delta G = g \cdot \Delta G_{\text{Transfer}} + a \cdot \alpha \quad (2)$$

In Tabelle 7 sind die jeweiligen Koeffizienten g und a sowie die Güte der Fits (R^2) angegeben. Berücksichtigt man, dass die Koeffizienten für verschiedene Anionen, Lösungsmittel und Lösungsmittelzusammensetzungen ermittelt wurden, ist ihre Übereinstimmung überraschend gut (Durchschnitt: $g = -1.26 \pm 0.44$; $a = -19.94 \pm 2.45$). Weiterhin erlauben die gemittelten Werte für g und a gemäß Gleichung (2) eine gute Vorhersage der experimentell bestimmten Stabilität des Iodidkomplexes in 70 Vol% Wasser/DMSO.

Diese Analyse verdeutlicht, dass die Anionenaffinität von **BCP1** in verschiedenen Lösungsmitteln maßgeblich von energetischen Beiträgen abhängt, die mit der

Anionendesolvatation in Zusammenhang stehen und von der H-Brücken Donoracidität α des Lösungsmittels.

Tabelle 7 Gefundene Koeffizienten g und a sowie R^2 für Gleichung (2) für die Bindung von Γ und/oder SO_4^{2-} an **BCPI** in Wasser/Methanol-, Wasser/Acetonitril- und Wasser/DMSO-Gemischen.

Lösungsmittel	Anion	g	a	R^2
Wasser/Acetonitril	Γ	-1.38	-18.19	0.9978
Wasser/Methanol	Γ	-1.75	-23.07	0.9949
Wasser/Methanol	SO_4^{2-}	-1.04	-17.05	0.9999
Wasser/DMSO	SO_4^{2-}	-0.62	-19.81	0.9899
Reine Lösungsmittel ^{a)}	Γ	-1.52	-21.61	0.9882

a) Koeffizienten erhalten durch Korrelation der Iodidaffinität mit $\Delta G_{Transfer}$ und α in Wasser, Methanol, Acetonitril und DMSO.

Die enthalpischen sowie entropischen Beiträge zur Bildung der Iodid- und Sulfatkomplexe von **BCPI** zeigen eine relativ komplexe Abhängigkeit von der Lösungsmittelzusammensetzung (Abbildung 25). Wie bei den Messungen in Wasser/Methanol zuvor schon beobachtet, ist auch in Wasser/Acetonitril ein kurvenförmiger Verlauf erkennbar, mit einem lokalen Minimum, in dem die Komplexbildungsenthalpie günstiger ist als in Lösungsmittelgemischen mit höherem und niedrigerem Wasseranteil und die Komplexbildungsentropie ungünstiger. Während dieses Minimum bei Wasser/Methanol bei ca. 70 mol% (bzw. 50 Vol%) Wasser liegt, beträgt der Wasseranteil in Wasser/Acetonitril 90 mol%.

In beiden Lösungsmittelgemischen beobachtet man, dass kleine Mengen der organischen Komponente die Komplexbildungsenthalpie günstig beeinflussen. Die Erhöhung des organischen Anteils bewirkt dann einen wieder ungünstiger werdenden Beitrag der Enthalpie und ab mehr als 80 mol% organischen Lösungsmittel wird die Iodidkomplexierung enthalpisch wieder günstig (die Sulfatkomplexierung konnte in diesen Lösungsmittelgemischen nicht untersucht werden). Die Entropie spiegelt diesen Trend im Wesentlichen wider, wobei günstig werdende Enthalpiebeiträge im Sinne einer Enthalpie/Entropie-Kompensation mit ungünstiger werdenden Entropiebeiträgen verbunden sind und umgekehrt. Eine Ausnahme stellt die Sulfatkomplexierung in Wasser/DMSO-Gemischen mit steigendem DMSO-Gehalt dar, die sowohl enthalpisch als auch entropisch günstiger wird. Die Ursache für dieses Verhalten ist unbekannt.

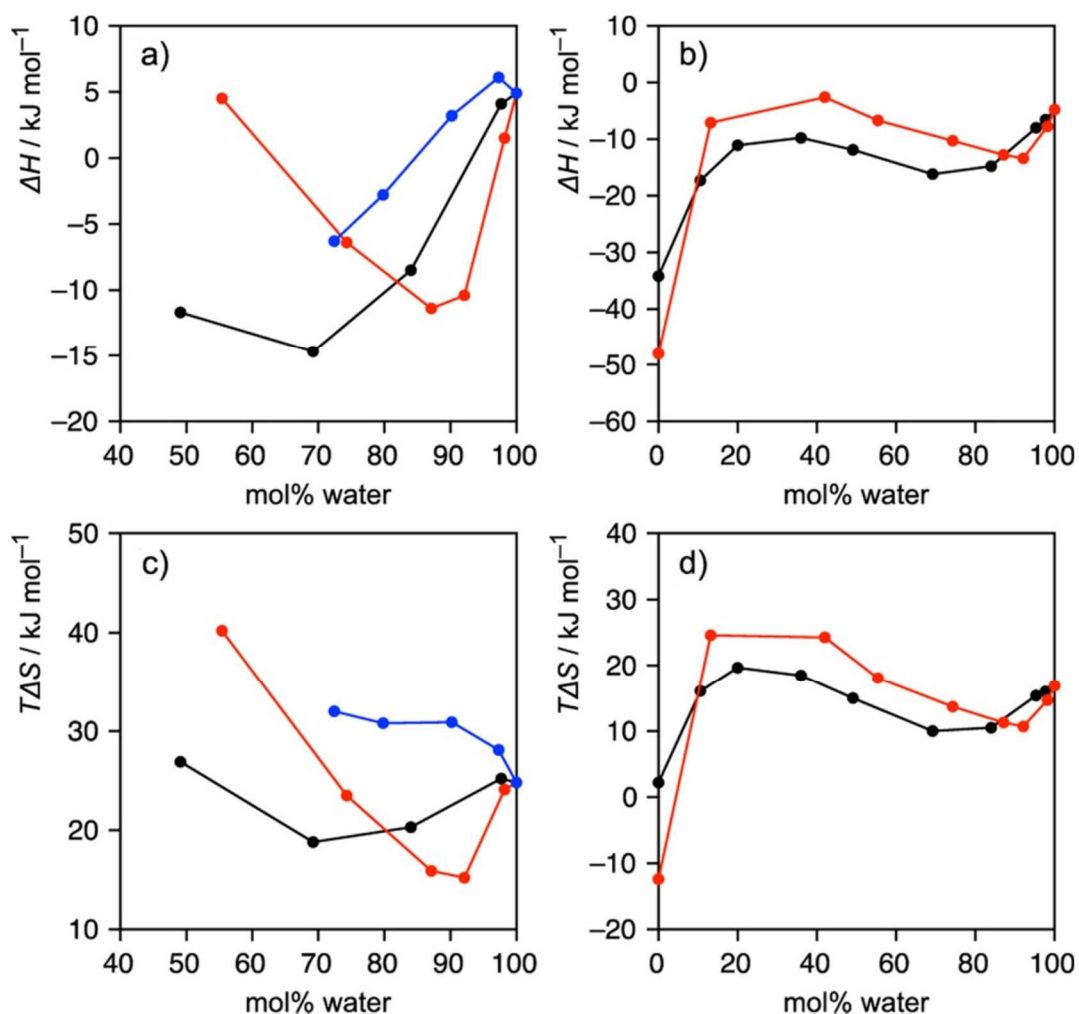


Abbildung 25 Abhängigkeit der Komplexbildungsenthalpie der Bindung von a) SO_4^{2-} und b) Γ sowie der Komplexbildungsentropie der Bindung von c) SO_4^{2-} und d) Γ an **BCPI** von der Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches.^[37] Wasser/Methanol schwarz; Wasser/Acetonitril rot; Wasser/DMSO blau.

Eine Anpassung dieser Kurven an Parameter, die für die Beschreibung der Abhängigkeit der Komplexstabilität von der Lösungsmittelzusammensetzung verwendet wurde, gelang nicht. Qualitativ wurde aber eine Korrelation mit Parametern gefunden, die die bevorzugte Solvatisierung von Γ in diesen Lösungsmittelgemischen beschreiben. Diese Parameter ergeben sich aus der „inverse Kirkwood-Buff integral“^[43] Methode für Wasser/Methanol- sowie Wasser/Acetonitril-Gemische und sind in Abbildung 26 zusammen mit den Enthalpieabhängigkeiten der Komplexbildung von **BCPI** mit Γ grafisch gezeigt.^[29] Negativere Werte von $\delta_{X,S}$, bedeuten, dass Γ bevorzugt von Wassermolekülen solvatisiert wird und positivere Werte, dass bevorzugt organische Lösungsmittelmoleküle das Anion umgeben.

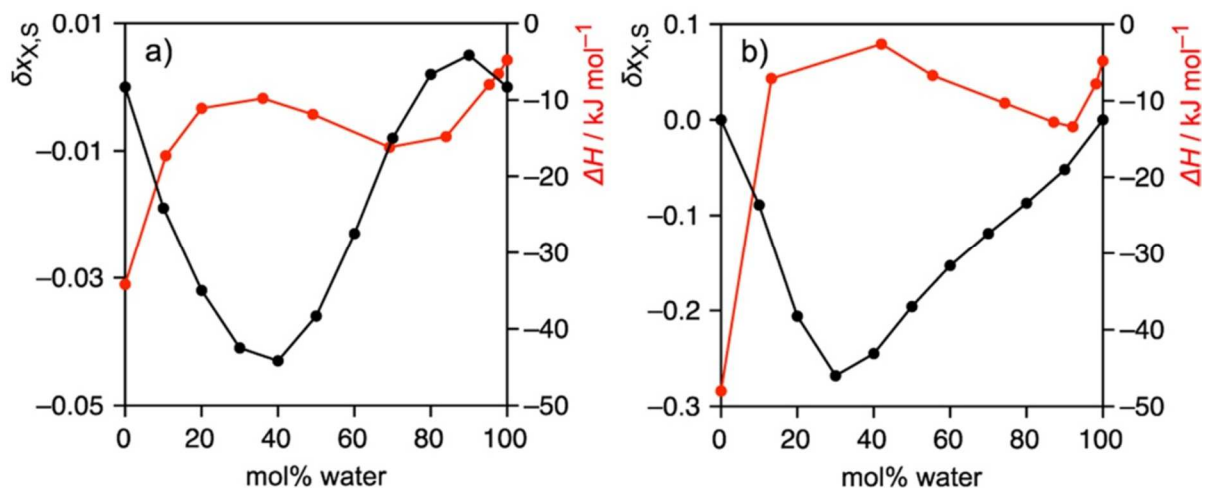


Abbildung 26 Abhängigkeit von $\delta x_{X,S}$ (schwarz) von der Lösungsmittelzusammensetzung für a) Wasser/Methanol und b) Wasser/Acetonitril. Zum Vergleich ist die Enthalpiabhängigkeit der Iodidkomplexierung von BCPI im jeweiligen Gemisch (rot) gezeigt.^[37]

Es lässt sich erkennen, dass immer dann, wenn $\delta x_{X,S}$ stark negativ ist (also Γ^- bevorzugt durch Wasser solvatisiert vorliegt) die entsprechende Komplexierungsenthalpie ungünstiger wird. Dies deutet an, dass eine bevorzugte Solvatisierung von Γ^- die Komplexbildungsenthalpie ungünstig beeinflusst. In Lösungsmittelgemischen, in denen die Anionendesolvatation weniger effektiv ist, ist die Komplexierung dagegen enthalpisch weniger nachteilig.

Es konnte hier qualitativ gezeigt werden, dass die Anionenkomplexierung, wie in den zuvor vorgestellten Arbeiten erwähnt (Kapitel 2.2), nicht alleine von der Anionen- und Rezeptordesolvatisierung und der Stärke der direkten Rezeptor-Anion-Wechselwirkung abhängt, sondern auch in welcher Form ein Anion in dem jeweiligen Lösungsmittelgemisch bevorzugt solvatisiert vorliegt. Das Verhalten der Anionen in den Lösungsmittelgemischen hat somit unmittelbare Auswirkungen auf die thermodynamische Signatur der Komplexierung der Anionen.

Diese Ergebnisse sind im Detail in der in Kapitel 2.3.6 abgedruckten Publikation beschrieben.

2.3.6 Forschungsartikel: Effects of Solvent Properties on the Anion-Binding of Neutral Water-Soluble Bis(cyclopeptides) in Water and Aqueous Solvent Mixtures

In diesem Artikel wird die Synthese von **BCP2** beschrieben und die Bindungseigenschaften von **BCP1** und **BCP2** in diversen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen. Als Anionen wurden neben SO_4^{2-} und I^- auch Br^- , Cl^- , SeO_4^{2-} , NO_3^- , H_2PO_4^- und ClO_4^- verwendet. Dieser Artikel beschreibt auch die Korrelation der in den Bindungsstudien erhaltenen thermodynamischen Daten mit Lösungsmittelparametern und die Erstellung der linearen freien Enthalpiebeziehung.

Kapitel 6.2 enthält die Supporting Information dieses Artikels mit den Synthesevorschriften, den Spektren neuer Verbindungen, den experimentellen Vorgehensweisen bei den Bindungsstudien und eine Zusammenfassung der dabei erhaltenen Ergebnisse. [F. Sommer, Y. Marcus, S. Kubik, *ACS Omega* **2017**, 2, 3669–3680]. Urheberrecht bei *The American Chemical Society (ACS)*. Nachdruck mit Genehmigung.

Im Rahmen dieser Publikation bestand meine Aufgabe in der Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der benötigten Verbindungen, sowie der Durchführung der Bindungsstudien und deren Auswertung. Herr Prof. Dr. Y. Marcus unterstützte uns bei der Interpretation und Schlussfolgerung der erhaltenen Daten in den Bindungsstudien. Herr Prof. Dr. S. Kubik war als Projektleiter mit der Koordination sowie der wissenschaftlichen Betreuung betraut.

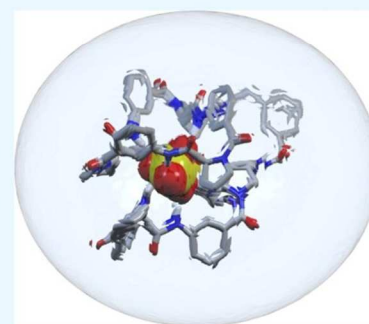


Effects of Solvent Properties on the Anion Binding of Neutral Water-Soluble Bis(cyclopeptides) in Water and Aqueous Solvent Mixtures

Fabian Sommer,[†] Yizhak Marcus,[‡] and Stefan Kubik^{*,†}[†]Fachbereich Chemie—Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße, 67663 Kaiserslautern, Germany[‡]Institute of Chemistry, The Hebrew University, Edmund Safra Campus, Givat Ram, Jerusalem 91904, Israel

Supporting Information

ABSTRACT: In this study, the anion-binding bis(cyclopeptide) **2** is introduced, which dissolves freely in water, affording up to 10 mM concentrations, thanks to triethylene glycol-derived substituents in the cyclopeptide subunits and the linker connecting them. Binding studies provided evidence that the anion affinity previously demonstrated for less-soluble analogs of this compound is retained under highly competitive aqueous conditions. The highest affinity in water was observed for iodide, closely followed by sulfate anions, whereas binding of soft and weakly coordinating anions could not be observed. The anion selectivity of **2** thus differs from that of other recently described receptors, which also do not require electrostatic or coordinative interactions for anion binding in water but typically fail to bind strongly coordinating sulfate anions. The ability of **2** to overcome sulfate hydration is attributed to the special mode of binding, combining direct N–H⋯A[−] interactions with the release of water molecules from the receptor cavity. The characterization of the anion binding of **2** and a related bis(cyclopeptide) in a variety of different solvents and aqueous solvent mixtures furthermore allowed the correlation of the binding properties with solvent parameters. These analyses provided qualitative and even quantitative insights into the solvent properties and solvation phenomena that mainly affect anion complexation.



INTRODUCTION

Solute–solute interactions are profoundly affected by the surrounding medium.¹ As a consequence, the affinity of two binding partners in solution does not only reflect their intrinsic structural complementarity but also the effects of the solvent on the efficacy of the interactions.

In host–guest chemistry, the choice of the solvent for binding studies is typically governed by the solubilities of the receptor and the substrate. In addition, the solvent is chosen such that effects complicating the quantification of affinity, such as a too high or too low complex stability or unspecific aggregation, are avoided. Only in rare cases can the solvent be regarded as an unstructured medium, whose influence on the binding strength solely depends on the relative permittivity, however. Most solvent molecules are more or less acidic or basic, and their interactions with hydrogen-bond donors or acceptors of the binding partners therefore compete with the actual binding event. In other words, the energy required to desolvate parts of the receptor and the substrate reduces the complex stability. The situation becomes particularly complicated in solvent mixtures in which complex formation is influenced by the effects of different solvent molecules and by the interactions of the solvent molecules with themselves.²

If the solvent is highly structured, as in the case of water, additional phenomena come into play. The most prominent one is the hydrophobic effect, which is usually associated with

the entropic gain resulting from the release of water molecules from the solvation shells of the binding partners when they come together.³ Moreover, complex formation in water can also have a strong enthalpic driving force if high-energy water molecules are released from the receptor cavity upon guest entry (nonclassical hydrophobic effect).^{1,3d} This effect has partly been made responsible for the extremely high affinity of cucurbiturils for organic guests.⁴ It is most pronounced for cucurbit[7]uril, where a particularly large number of hydrogen bonds are gained when releasing the cavity-bound water upon complex formation.⁵ Other host–guest complexes, such as those between γ -cyclodextrin and anions like dodecaborate clusters, feature a highly exothermic binding enthalpy that is accompanied by a pronounced loss of entropy.⁶ This thermodynamic signature of complex formation was rationalized by the chaotropic nature of the anions, whose solvation shell features a reduced number of hydrogen bonds per water molecule. The complexation of the dodecaborate anions thus leads to the structuring of water with a concomitant strengthening of hydrogen bonds.

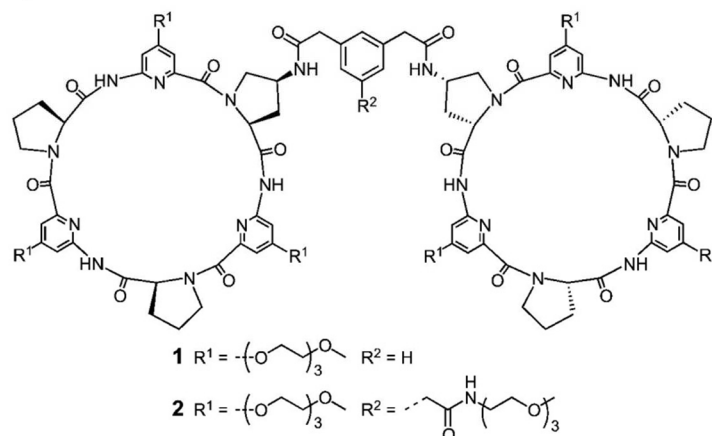
Water is therefore not necessarily a challenging medium that requires strong interactions for effective host–guest inter-

Received: June 26, 2017

Accepted: July 3, 2017

Published: July 17, 2017

Chart 1. Bis(cyclopeptides) 1 and 2



actions. If complex formation is accompanied by enthalpically and/or entropically favorable changes of the water structure, overall high complex stabilities can be achieved. Importantly, also inorganic anions, which are generally considered rather difficult substrates in water,⁷ can be bound with appropriate receptors even if the underlying binding modes are much weaker than the Coulombic or coordinative interactions typically employed for anion recognition.⁸ Examples are the above-mentioned dodecaborate clusters, which strongly bind to γ -cyclodextrin.⁵ Iodide anions have been shown to form complexes with α -cyclodextrin,⁹ whereas perchlorate binding was demonstrated for not only α -cyclodextrin¹⁰ but also a water-soluble octaanionic deep-cavity cavitand.¹¹ The currently most efficient anion receptors in water that do not employ Coulombic or coordinative interactions are Sindelar's bambusurils¹² and the structurally somewhat related biotinurils developed in the Pittelkow group.¹³ The affinity of bambus[6]uril for iodide and perchlorate anions, for example, exceeds a $\log K_a$ of 6 in aqueous phosphate buffer,^{12a} whereas the affinity of biotin[6]uril is highest for thiocyanate under comparable conditions, amounting to a $\log K_a$ of 4.5.^{13b}

Impressive anion affinities in water have thus been achieved with synthetic receptors. It is also evident, however, that the respective receptors preferentially bind soft and weakly coordinating anions. Anions that are classified as kosmotropes¹⁴ are bound only weakly (chloride), and the most strongly coordinating oxoanions, such as sulfate anions, are not bound at all. The reason could be that the relatively hydrophobic cavities of these receptors are unsuitable to host polar anions or do not feature appropriate binding sites to interact with them. In addition, the thermodynamics of complex formation (high negative binding enthalpy and unfavorable entropy) suggests that the intrinsic selectivity of these receptors for chaotropic anions could be mediated to some extent by solvent effects analogously as in the dodecaborate/ γ -cyclodextrin complexes. In the case of the cavitand developed by Gibbs, the negative binding entropy has also been associated with the incorporation of partially hydrated anions into the receptor cavity.¹⁵

The binding of strongly coordinating and therefore strongly hydrated anions in water by means of noncovalent interactions obviously requires different receptor architectures and possibly other types of interactions. Indeed, existing sulfate receptors active in aqueous media combine directed hydrogen-bond

donors, which often completely surround the anion, and Coulomb attraction.^{7,16} Examples are the polyammonium cages described by Delgado and Mateus,¹⁷ the coordination cages developed by Custelcean and Hay, which feature 12 urea NH groups converging toward the cavity,¹⁸ You's tetrakis(imidazolium)-derived receptor, which forms a sandwich-type 2:1 complex with sulfate anions, in which the anion is bound by eight C—H...O hydrogen bonds,¹⁹ and the pyrrole-based triazoliumphane described by Hay and Sessler.²⁰ Strong Coulombic interactions are, however, not necessarily required to complex sulfate or other anions in aqueous media, as demonstrated by the bis(cyclopeptides) developed in our group.^{21a,b} These bis(cyclopeptides), an example being compound 1 (Chart 1), feature two covalently linked cyclic hexapeptide units composed of alternating L-proline and 6-aminopicolinic acid subunits. Their interactions with anions involve the incorporation of the anion into the cavity between the two cyclopeptide rings, where it interacts with six NH groups from the two receptor subunits. To illustrate this arrangement, the calculated structure of the sulfate complex of a derivative of 1 lacking the substituents on the aromatic rings is shown in Figure 1. The 2,2'-(1,3-phenylene)diacetic acid-

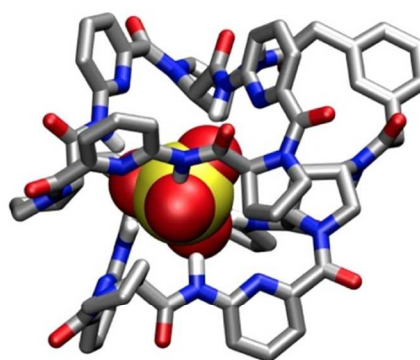
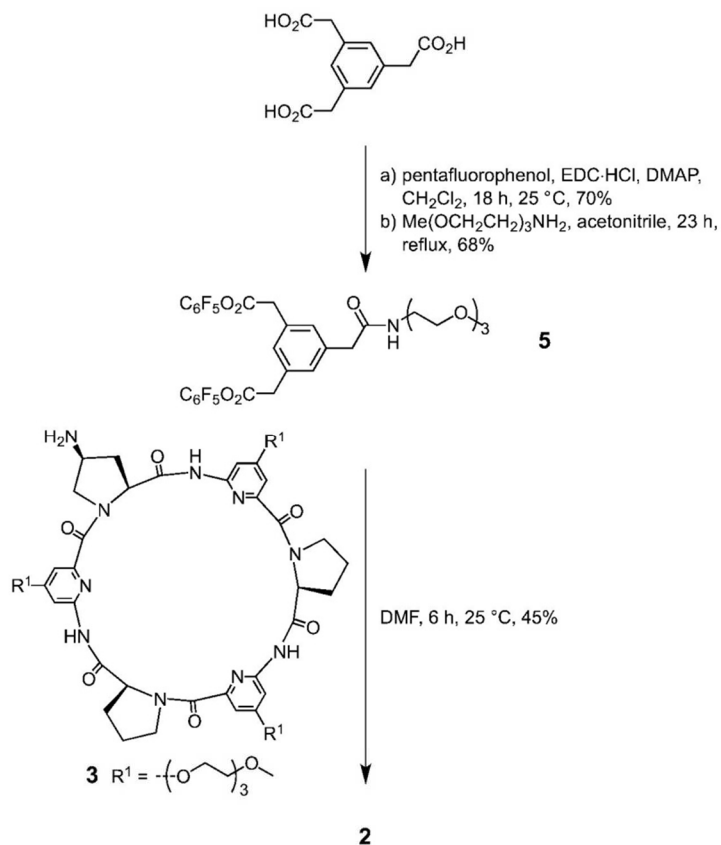


Figure 1. Calculated structure of the sulfate complex of a derivative of 1 with $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$. The geometry optimization was performed at the density functional theory (DFT) level using the B3LYP functional and the 6-31G* basis set as implemented in the Gaussian 09 program package. Nonacidic hydrogen atoms are omitted for clarity.

Scheme 1. Synthesis of 2



derived linker in this bis(cyclopeptide) induces an arrangement of the two cyclopeptide rings that allows their simultaneous interaction with the anion. The sulfate anion is bound by hydrogen-bonding interactions to the peptide NH groups of the two cyclopeptide rings. In the crystal structure of the sulfate complex of a structurally related bis(cyclopeptide),^{21c} nine hydrogen bonds were found between the receptor and the anion, with an overall similar arrangement of the cyclopeptide rings, for example. Such 1:1 complexes are entropically favored at millimolar concentrations of the binding partners over complexes in which anions link several bis(cyclopeptide) moieties, consistent with mass spectrometric results.^{21a–c}

We previously demonstrated that even a simple cyclic hexapeptide containing hydroxyproline and 6-aminopicolinic acid units forms a weakly stable 1:1 complex with sulfate in water.^{21d} The three well-preorganized NH groups flanked by the five-membered rings of the hydroxyproline units of this cyclopeptide therefore seem to produce a suitable environment for sulfate complexation even in highly competitive media. Cyclopeptides with proline rings typically prefer the formation of 2:1 complexes in aqueous solvents, structurally closely related to the one shown in Figure 1.^{21d} The underlying 2:1 equilibria are, however, difficult to analyze, which is why we mostly concentrate on the characterization of the binding properties of bis(cyclopeptides) that form 1:1 complexes.^{21a–c} Unfortunately, the derivatives investigated so far turned out to be not sufficiently soluble to allow binding studies in water. The compound with the so far highest water solubility is

bis(cyclopeptide) 1 (Chart 1), containing solubilizing groups on the six aminopicolinic acid units. This bis(cyclopeptide) binds sulfate anions in 95 vol % water/methanol with a $\log K_a$ of 3.7.^{21e}

Here, we show that bis(cyclopeptide) 2 containing an additional solubilizing triethylene glycol unit in the aromatic linker possesses a significantly higher water solubility. Binding studies provided evidence that anions are still bound under these conditions with a selectivity that is distinctly different from that of, for example, bambusuril. The notable sulfate affinity of 2 highlights, in particular, the complementary behavior of 2 with respect to other recently described anion receptors. The characterization of the anion affinity of 1 and 2 in different solvents furthermore revealed a correlation between the thermodynamics of the complex formation and the solvent properties, thus providing a deep insight into the solvent parameters that govern the anion affinity.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Qualitative Binding Studies. Bis(cyclopeptide) 2 was synthesized from the known cyclopeptide monoamine 3^{21e} and the active ester 5 (Scheme 1). The latter was obtained in a two-step sequence by first converting the commercial 2,2',2''-(benzene-1,3,5-triyl)triacetic acid into the respective tris(pentafluorophenyl) ester 4, followed by amidation of one ester group upon treatment with 1 equiv of 2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethanamine. Receptor 2 turned out to be soluble in water at concentrations up to 10 mM,

Table 1. Association Constants $\log K_a$, Enthalpies ΔH , and Entropies $T\Delta S$ of the Binding of Bis(cyclopeptide) **2** to Various Anions in Water^a

anion ^b	$\log K_a$	ΔG	ΔH	$T\Delta S$	n^d
iodide	3.62 ± 0.06	-20.6 ± 0.4	-3.2 ± 0.4	17.4 ± 0.8	1.23 ± 0.15
bromide	3.23 ± 0.03	-18.4 ± 0.1	3.6 ± 0.1	22.0 ± 0.1	0.79 ± 0.06
chloride	2.15 ± 0.11	-12.3 ± 0.6	10.1 ± 3.6	22.4 ± 3.0	1.00^e
sulfate	3.31 ± 0.03	-18.9 ± 0.2	5.9 ± 0.3	24.8 ± 0.2	0.73 ± 0.01
sulfate ^c	3.11 ± 0.01	-17.8 ± 0.1	6.8 ± 0.4	24.6 ± 0.3	0.81 ± 0.02

^aRecorded at 298 K; ΔG , ΔH , and $T\Delta S$ in kJ mol^{-1} ; the values are means of at least three independent measurements with the standard deviations specified. ^bCounterion: sodium. ^cMeasured in phosphate buffer (35 mM, pH 7.4); these measurements were performed only twice. ^dParameter correlating with the stoichiometry of the complexes, deviations from 1.00 result from fitting to the binding model and correct for deviations in the assumed cell concentration. ^e n fixed to 1.00.

clearly demonstrating the positive effect of the linker side chains on water solubility.

Qualitative ¹H NMR spectroscopic binding studies were initially performed to evaluate the mode of anion binding of **2**. These measurements revealed pronounced shifts of bis(cyclopeptide) signals in the ¹H NMR spectrum upon the addition of sodium iodide or sulfate to a solution of **2** in D₂O, all of which are characteristic of anion complexation (Figure S9).^{21a,e} Specifically, the signals corresponding to the proline H(α) protons of **2** shift downfield by ca. 1 ppm, whereas those of aromatic bis(cyclopeptide) protons shift upfield. Both effects are consistent with the incorporation of an anion in the space between the two receptor subunits, demonstrating that the known mode of anion binding of these bis(cyclopeptides) is not affected by the additional side chain in **2**. Electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS) of solutions of **2** containing Na₂SO₄ or NaI also demonstrated the presence of the corresponding anion complexes in solution, furthermore showing that 1:1 complexes are preferentially formed (Figures S10 and S11).

Anion Affinity in Water. The affinity of **2** in water for a series of anions was quantified by isothermal titration calorimetry (ITC), a method that provides a full picture of binding energetics in a single titration.²² The quantification of binding strength in water turned out to be possible for the halides chloride, bromide, and iodide, and for sulfate. All other anions investigated, namely, selenate, nitrate, dihydrogen phosphate, and perchlorate, did not produce measurable heat changes when added to an aqueous solution of **2**, indicating that either these anions are not bound or that the complex formation is enthalpically neutral. The obtained results are summarized in Table 1.

Titration yielding anion affinities $\log K_a > 3$ were evaluated using the one-site binding model, which involves fitting the binding isotherms simultaneously to K_a (or ΔG), ΔH , and the stoichiometry factor, n . This treatment proved to afford significantly better fits than if only K_a and ΔH were treated as unknowns. The reason is that the fitted n corrects for deviations in the assumed cell concentrations, thus improving the overall consistency of the data when comparing a large number of experiments (i.e., K_a and ΔH of related experiments end up to be similar even if the respective n values vary). The average of the n values obtained in all our measurements (Tables 1 and S3–S8) amounts to 0.94 ± 0.15 , supporting the assumption that **1** and **2** prefer to form 1:1 complexes and confirming the result of ESIMS. Fitting the binding isotherms using the one-site binding model became unreliable only for weakly stable complexes, such as the one with chloride. In this case, n was fixed to 1.00, and the thermodynamic parameters

obtained for this complex are therefore associated with a larger error.

Table 1 shows that **2** possesses appreciable affinity for certain anions in water. Halide affinity decreases in the order iodide > bromide > chloride, a trend that reflects the changes of binding enthalpy in this sequence, being favorable for iodide binding but becoming progressively unfavorable when going to chloride. The concomitant increase of binding entropy cannot fully compensate for the enthalpy loss, so that the chloride complex of **2** ends up to be more than 1 order of magnitude less stable in water than the iodide complex. Sulfate binding is endothermic as well, but a large entropic term renders the corresponding complex overall only slightly less stable than the iodide complex. The anion selectivity of **2** thus mirrors the one of bis(cyclopeptide) **1**, which was shown to become more selective for the weakly coordinating iodide anion once the water content of the solvent increases beyond 90 vol %.^{21e} The experimentally determined iodide affinity of **2** in water turned out to be slightly lower than the one previously predicted on the basis of an extrapolation analysis,^{21e} showing that the removal of the last 5 vol % of the organic component in the solvent mixture causes a more-than-expected drop of affinity.

The trends in the binding enthalpy evident in Table 1 can reasonably be attributed to the combined effects of anion desolvation and direct receptor interactions. In the case of the halides, the coordination strength of the anions increases in the order iodide < bromide < chloride, rendering chloride anions typically the strongest bound substrates in this series. In water, however, solvation effects counteract this intrinsic selectivity, as the most strongly coordinating anion is also the one that is most difficult to desolvate. Moreover, factors such as anion size additionally influence the anion affinity. Our previous investigations provided evidence, for example, that the binding site of a bis(cyclopeptide) related to **2** is best suited to host larger anions, such as iodide, whereas chloride is too small to simultaneously interact with all six peptide NH groups.^{21a,b} Costlier anion desolvation and an increasing mismatch between anion and cavity size therefore likely account for the increasingly unfavorable enthalpy of halide binding from iodide to chloride. In the case of the strongly coordinating sulfate anion, anion desolvation is even more difficult than chloride desolvation. Interactions with **2** can be expected to be stronger, however, because of the size of the sulfate anion and its twofold negative charge, rationalizing why the overall enthalpy of sulfate binding is slightly less endothermic than that of chloride binding.

The absence of heat effects in the titrations with selenate, nitrate, dihydrogen phosphate, or perchlorate does not exclude that these anions interact with **2**. It could well be that the

Table 2. Association Constants $\log K_a$, Gibbs Free Energies ΔG , Enthalpies ΔH , and Entropies $T\Delta S$ of the Binding of Iodide to Bis(cyclopeptide) **1 in Different Solvents^a**

solvent	$\log K_a$	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
water ^b	3.80 ± 0.03	-21.7 ± 0.2	-4.8 ± 0.1	16.9 ± 0.3
methanol ^c	6.38 ± 0.04	-36.4 ± 0.2	-34.2 ± 0.4	2.2 ± 0.5
acetonitrile ^c	6.24 ± 0.02	-35.6 ± 0.1	-48.0 ± 0.2	-12.4 ± 0.1
DMSO ^c	3.21 ± 0.05	-18.3 ± 0.3	7.1 ± 0.7	25.4 ± 0.5

^aRecorded at 298 K; ΔG , ΔH , and $T\Delta S$ in kJ mol^{-1} ; the values are means of at least three independent measurements with the standard deviations specified. ^bCounterion: sodium. ^cCounterion: tetramethylammonium.

enthalpic contributions of the anion desolvation and the receptor–anion interaction coincidentally cancel out, leaving binding only due to entropy. We assume that this is indeed the case with selenate, an anion closely related in size and charge to sulfate but slightly easier to desolvate.²³ To test this assumption, selenate binding was also studied in 70 vol % water/methanol. In this solvent, a measurable exothermic heat of complex formation could be detected, with the ITC titration yielding a stability $\log K_a$ for the corresponding complex of 3.46 ($\Delta H = -5.1 \text{ kJ mol}^{-1}$, $T\Delta S = 14.6 \text{ kJ mol}^{-1}$, $n = 1.07$). Thus, selenate is bound by **2**, albeit approximately 1 order of magnitude weaker than sulfate under the same conditions (vide infra), which could explain the lack of heat effects when titrating **2** with selenate in water.

Phosphate anions, which are singly or doubly protonated in water at neutral pH, could, on the other hand, be indeed unable to interact with **2** because repulsive interactions between the hydrogen-bond donors within the receptor cavity and those of the anions should destabilize the complex. The same effect is responsible for the low affinity of the sulfate-binding protein for phosphate.²⁴ We therefore quantified sulfate binding also in phosphate buffer (pH 7.4). This measurement showed that the presence of the buffer has almost no effect on the thermodynamics of binding (Table 1). Thus, phosphate anions do not interfere in sulfate complexation even when present in excess, suggesting that they do not bind to the receptor. In other words, bis(cyclopeptide) **2** recognizes sulfate selectively over other tetrahedral albeit protonated anions in water, rendering this receptor a good model for the sulfate-binding protein.

The weakly coordinating nature of nitrate and perchlorate renders it unlikely that the anions bind with a notable affinity to **2** in water. Nitrate affinity of a related bis(cyclopeptide) was determined by NMR titration to amount to only 130 M^{-1} in 50 vol% $\text{D}_2\text{O}/\text{methanol-}d_4$, for example.^{21a} Although we cannot fully exclude that weakly stable complexes are formed with these anions, it is important to note that the strong exothermicity observed for the binding of perchlorate anions to bambusuril is not observed in the case of **2**.^{12a}

Selectivity of **2** thus substantially differs from that of other previously described anion receptors that do not use strong electrostatic or coordinative interactions for anion binding. Beer's anion-binding rotaxane, for example, binds iodide with almost the same affinity as **2** but sulfate with a significantly lower affinity.²⁵ Noteworthy is also the profoundly different anion selectivity of **2** compared to that of glycoluril-derived anion receptors.^{12,13} Whereas the halide affinity of biotinuril and **2** is similar, biotinuril also binds perchlorate and, in particular, thiocyanate anions.^{13b} Bambusuril and **2** bind chloride with similar affinity, but the affinity of bambusuril to bromide and iodide anions is much higher than that of **2**.

Notable is the large affinity of bambusuril for perchlorate that reaches a $\log K_a$ in water of 7.7.^{12a}

These differences in the binding properties of glycoluril-based receptors and our bis(cyclopeptides) presumably relate to the different natures of their binding sites. Whereas **2** features a cavity containing NH groups that can engage in directed interactions with included anions, these groups are absent in the cavities of bambusuril and biotinuril. Anion binding of the latter two compounds is mainly governed by multiple $\text{C-H}\cdots\text{A}^-$ interactions, whose soft nature could explain the preference for weakly coordinating ions. Besides the actual binding sites, solvation effects could also be responsible for the different binding properties of our bis(cyclopeptides) and glycoluril-based receptors. An insight into these effects was gained by investigating the solvent dependence of the complex formation.

Anion Affinity in Organic Solvents. The good solubility of bis(cyclopeptides) **1** and **2** in various solvents allowed us to evaluate the extent to which their anion affinity is influenced by the medium. We concentrated on polar competitive solvents, namely, water, methanol, acetonitrile, and dimethyl sulfoxide (DMSO), which are frequently used in anion-binding studies.⁸ All measurements could be performed using the synthetically more easily accessible **1** because it turned out that sufficiently high bis(cyclopeptide) concentrations for the ITC titrations (0.25 mM) could be achieved in water if **1** was isolated after chromatographic purification by freeze-drying. Measurements in selected solvents were also performed using **2**, which revealed only minor differences in the thermodynamics of the anion binding of **1** and **2** (Tables S3–S8). Binding studies were restricted to iodide because of the low solubility of sulfate salts in the organic solvents. Because of the better solubility, tetramethylammonium iodide had to be used as the salt in the organic solvents. Reference measurements indicated that the cation has only a minor influence on the thermodynamics of anion binding (vide infra), rendering a comparison of the results with the ones obtained for **1** and sodium iodide in water feasible. The thermodynamic parameters obtained in these studies are summarized in Table 2.

Table 2 demonstrates the expected increase in the strength of iodide binding when going from water to methanol or acetonitrile. In both of these solvents, iodide binding is enthalpically significantly more favorable than that in water. Conversely, entropy becomes less favorable, which is the hallmark of enthalpy/entropy compensation. Because of the unfavorable binding entropy in acetonitrile, the overall stability of the iodide complex in this solvent is slightly lower than that in methanol. Surprisingly, the least-stable complex is formed in DMSO (and not in water) mainly as a result of the endothermicity of complex formation in this solvent.

Rationalizing the solvent dependence of iodide binding is not straightforward because the overall process of complex

Table 3. Relevant Descriptors of Solvent Properties

solvent	$\mu \times 10^{30a}$	$E_T(30)^b$	Z^c	ΔG_{tr}^d	ΔH_{tr}^d	π^*^e	α^e	β^e
water	6.2	63.1	94.6	0.0	0.0	1.09	1.17	0.47
methanol	9.6	55.4	83.6	7.3	-0.1	0.60	0.98	0.66
acetonitrile	13.0	45.6	71.3	20.3	-9.3	0.75	0.19	0.40
DMSO	13.5	45.1	70.2	14.1	-10.9	1.00	0.00	0.76

^aDipole moment μ in C m. ^bDimroth's and Reichardt's $E_T(30)$. ^cKosower's Z . ^dGibbs free energy and enthalpy of transferring iodide from water into the respective solvents; ΔG_{tr} and ΔH_{tr} in kJ mol^{-1} . ^eKamlet-Taft's π^* , α , and β values. ^{6g}

formation comprises several steps, whose individual thermodynamic signatures cannot be experimentally determined by ITC. An insight can be gained by correlating the possible contributions of individual steps with parameters describing characteristic solvent properties, a selection of which is presented in Table 3.

The strength of the direct interactions between the anion and the binding sites on the receptors could relate to the dipole moment, μ , of the solvent, for example, or Dimroth's and Reichardt's $E_T(30)$ ^{26a,b} or Kosower's Z values,^{26c} which are alternative measures of solvent polarity. Potential contributions from hydrophobic and/or dispersive interactions between the two bis(cyclopeptide) subunits in their anion complexes^{21c} could also be related to these parameters. Information about solvation effects may alternatively be derived from the descriptors that characterize the hydrogen-bond donor and acceptor strengths of the solvents, for example, the Kamlet-Taft parameters, π^* , describing polarity/polarizability; α , describing the hydrogen-bond donation ability; and β , describing the hydrogen-bond acceptance ability.^{26d} In addition, energies of transfer of the anion from water to an organic solvent could be correlated with anion solvation in the respective medium.^{26e}

Besides direct host-guest interactions and solvent reorganization during complex formation, also the extent of ion pairing in the different solvents could affect the complex stability. This effect should be small, however, on account of the relatively small effects associated with changing the counterion in the titrations from tetramethyl- to tetrabutylammonium ions (Tables S3–S8). Experimental evidence that tetramethylammonium iodide is practically not ion-paired in DMSO or methanol and only weakly in acetonitrile has recently been published.²⁷ Difficult to estimate are the effects of the solvent on the conformation of the receptors before complex formation and, hence, the energetic contributions associated with the conformational reorganization of the receptor from the initial to the complexed state.

Focusing first on the solvent dependence of iodide solvation, one would intuitively expect that desolvating iodide is easier in the organic solvents than in water. Indeed, transferring iodide from water to any of the investigated organic solvents is associated with positive Gibbs free energies of transfer ΔG_{tr} . A more facile anion desolvation could thus explain the higher stability of the iodide complex of **1** in acetonitrile and methanol with respect to water. If iodide desolvation is the only factor governing complex stability, the complex stability in DMSO should also be high, however, which is not the case. This result suggests that one or more competing factors exist that cause complex stability to be unexpectedly low in this solvent.

To decide which additional parameter(s) could explain the observed trends, we tried to establish a correlation by multiparametric analysis in the form $\Delta G = g\Delta G_{tr} + aA + \dots$ that quantitatively describes the dependence of the exper-

imental free binding energies ΔG on ΔG_{tr} in combination with one or more of the solvent parameters in Table 3 or related ones available in the literature.²⁸ The only tested parameter that afforded a statistically reasonably relevant relationship ($R^2 = 0.9882$) was α , which describes the hydrogen-bond donation ability of the medium. Combining α with further parameters did not significantly improve the fit. The equation resulting from the analysis, namely, $\Delta G = -1.52\Delta G_{tr} - 21.61\alpha$, is consistent with the expected dependence of ΔG on ΔG_{tr} : large positive ΔG_{tr} values that signify an easier anion desolvation with respect to water cause the complex stability to increase. The additional dependence of ΔG on α somewhat counter-intuitively suggests that solvents, which are good hydrogen-bond donors (higher α), also have a beneficial effect on the complex stability. It is important to note that this correlation extends to the solvent dependence of iodide and sulfate complexation in water/acetonitrile and water/methanol mixtures (vide infra).

We associate the dependence of ΔG on α to the solvent reorganization at the binding site of **1** during complex formation. In water, the concave binding sites of each cyclopeptide moiety of **1** can be expected to be solvated by water molecules before the complex formation. The arrangement of these water molecules could resemble the one found in the crystal structure of the trihydrate of the parent cyclopeptide **6** (Figure 2).²⁹ Each of the three water molecules in this crystal

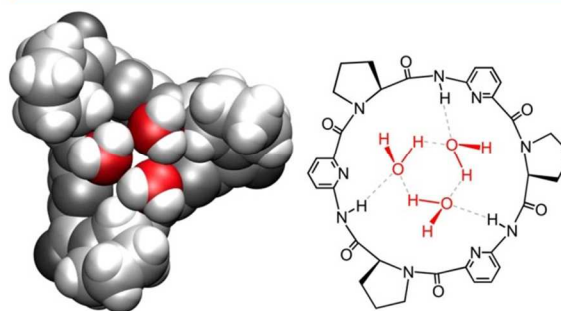


Figure 2. Arrangement of the bound water molecules in the crystal structure of the trihydrate of **6** shown as a space-filling model (left) and in a schematic fashion (right).²⁹

structure binds to an NH group of the peptide with its oxygen atom and further engages with one proton in a hydrogen bond to the oxygen atom of the neighboring water molecule. No hydrogen bonds are formed to the ring nitrogen atoms of **6**. Thus, a cyclic array of three water molecules results, in which three protons, oriented close to the alkyl chains of the proline rings, remain vacant. In solution, the inability of water molecules to saturate their hydrogen-bonding interactions in the cavity between the cyclopeptide rings of **1** possibly extends to other water molecules surrounding the apolar regions of the

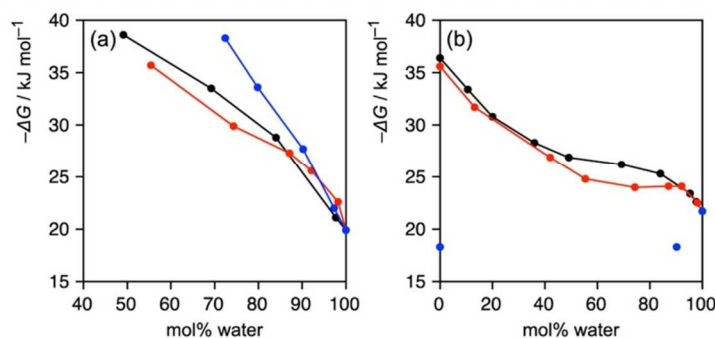


Figure 3. Dependence of the Gibbs free energies of formation of the sulfate (a) and iodide (b) complexes of bis(cyclopeptides) **1** on solvent composition (water/methanol, black; water/acetonitrile, red; water/DMSO, blue).

proline rings remote from the actual binding site. Hydration of the cyclopeptide thus likely creates a cluster of water molecules within the receptor cavity, of which some cannot satisfy their donor sites. The release of these water molecules upon complex formation thus allows vacant hydrogen-bond donors to find binding partners again, resulting in an entropic and presumably enthalpic gain.

The dependence of ΔG on α could thus be associated with the extent to which the hydrophobic effect contributes to the stability of the iodide complex of **1** in the different solvents: the energetic situation created by receptor hydration is particularly unfavorable in water, as hydrogen-bond donors remain vacant on water molecules that tend to engage in interactions with other water molecules. Receptor desolvation is therefore thermodynamically beneficial. In solvents with smaller α values than water, vacant hydrogen-bond donor sites created during the receptor solvation pose less of a thermodynamic disadvantage until this disadvantage fully disappears in DMSO, whose α is zero. Favorable thermodynamic contributions of solvent reorganization during iodide complexation by **1** thus become smaller in the order water > methanol \gg acetonitrile > DMSO. Conversely, DMSO is the strongest hydrogen-bond acceptor of the four solvents studied ($\beta = 0.76$). DMSO molecules should therefore engage in pronounced interactions with the NH groups of **1**, rendering receptor desolvation difficult. Considering that iodide desolvation is also enthalpically more difficult in DMSO than in water (Table 3), an effect usually explained by soft–soft interactions,^{26b,30} the low iodide affinity of **1** (and the endothermicity of complex formation) in DMSO could be rationalized by the enthalpically unfavorable receptor and anion desolvation combined with the lack of hydrophobic effects.

On the basis of the above considerations, the thermodynamics of iodide binding in acetonitrile and methanol can also be understood. Both solvents are less polar (lower π^*) than water or DMSO, and the direct anion–receptor interactions should therefore be intrinsically stronger. The desolvation of iodide anions in acetonitrile is costly in enthalpy similarly to that in DMSO. However, receptor desolvation should be significantly more facile because acetonitrile is the weakest hydrogen-bond acceptor (lowest β) among the solvents studied. Strong interactions of iodide with **1** combined with a facile receptor desolvation and the absence of pronounced hydrophobic effects could therefore account for the high negative binding enthalpy and unfavorable binding entropy associated with iodide binding in acetonitrile. The enthalpic

disadvantage of iodide desolvation in methanol is smaller than that in acetonitrile, but the receptor should be more strongly solvated (larger β). These opposing effects in combination with a certain extent of hydrophobic effects upon complex formation are probably responsible for the similar iodide affinities of **1** in methanol and acetonitrile.

Anion Affinity in Solvent Mixtures. Information about the influence of the gradual change of solvent composition on the complex formation was obtained by quantifying the anion affinity of **1** in different solvent mixtures. We previously investigated the iodide and sulfate affinity of **1** in water/methanol with the water content ranging from 95 to 20 vol %.^{21e} This range of solvent composition has now been extended from 100% water to 100% methanol. In addition, we also followed anion binding in water/acetonitrile and water/DMSO. The anions were mostly used as their sodium salts, and we only had to resort to other salts in solvents with a high organic content due to solubility reasons.

In the case of sodium iodide, anion affinity could be evaluated down to 10 vol % of water in water/methanol and 20 vol % of water in water/acetonitrile. For the measurements in mixtures with respective lower water contents and in pure organic solvents, tetramethylammonium iodide was used. The comparison of iodide binding in the solvent mixtures at which the transition from the sodium to the tetramethylammonium ion was made indicated that the cation has no marked influence on the thermodynamics of binding. This counterion effect on anion binding was also checked in pure organic solvents using tetramethylammonium and tetrabutylammonium iodide as guest salts. A pronounced effect of the cation on anion affinity could be detected in none of these measurements, rendering the influence of ion pairing on anion binding unlikely. Iodide binding turned out to be almost athermic in water/DMSO mixtures, thus allowing a reliable determination of complex stability only in the mixture with 70 vol % water and in DMSO.

Sodium sulfate was insufficiently soluble for the measurements if the solvent mixtures contained less than 30% of water. Because also the use of tetramethylammonium sulfate does not significantly extend the accessible solvent range, we restricted the evaluation of sulfate affinity to solvents containing between 100 and 30 vol % of water in methanol or acetonitrile. The water content could be decreased to only 40 vol % with DMSO as the cosolvent.

The results of the measurements are summarized in Tables S3–S8 and Figure 3, showing the observed trends of sulfate and iodide affinity in a graphical fashion. The water contents of the

solvent mixtures in the respective graphs are specified in mole percent to facilitate comparison of the observed trends with solvent parameters, which are usually reported on the same scale.

Figure 3a shows that sulfate affinity of **1** steeply increases with decreasing water content of the solvent. The most pronounced effect is observed with DMSO as a cosolvent, presumably because water/DMSO is a particularly unfavorable environment for doubly charged anions as reflected in the substantial Gibbs free energies required for transferring sulfate anions from water to water/DMSO (Figure S13a).³¹ Desolvating the sulfate anions in water/DMSO therefore becomes progressively easier as the DMSO content rises, an effect that causes the overall ΔG of binding to become more negative in the same direction. The solvent dependence of the Gibbs free energies of transferring sulfate anions from water to methanol is less pronounced (Figure S13a),²⁶ⁱ which could explain why increasing the methanol content improves complex stability to a smaller extent than increasing the DMSO content. Transfer energies for sulfate anions to water/acetonitrile mixtures are, unfortunately, not available.

The affinity of **1** for the weakly coordinating iodide anion is mediated by solvent composition in a much subtler fashion than sulfate affinity. Figure 3b shows that a small amount of methanol or acetonitrile causes an initial noticeable improvement of affinity, which subsequently only gradually increases between 10 and ca. 60 mol % of the organic component. Only further decreasing the water content causes a more pronounced rise in complex stability. Thus, the almost linear dependence of iodide affinity on solvent composition we observed in our previous study in water/methanol between 5 vol % (2.3 mol %) and 80 vol % (64 mol %)^{21e} does not extend into the regions with a higher or lower content of the organic solvent. The observed trends of complex stability in water/methanol and water/acetonitrile cannot be explained by only considering anion desolvation because iodide transfer energies gradually increase with decreasing water content in both solvent mixtures without exhibiting a steeper increase in the high-water-content region or the plateau in the midway region (Figure S13b). The plateau region, in particular, again suggests the existence of a compensating factor that counteracts the positive effect of anion desolvation on complex stability.

The shape of the curve describing the hydrogen-bond donation ability of water/acetonitrile mixtures, which resembles the red curve in Figure 3b and was associated with microheterogeneity in different regions of the mixtures (Figure S14),³² indicates that α could be responsible in this case, too. We therefore performed multiparametric analyses to assess whether the above-derived correlation also holds for the solvent mixtures. To this end, the red curve in Figure 3b was first fitted to a fourth degree polynomial (Figure S15). Subsequently, ΔG values were calculated at the mole percent solvent compositions, for which ΔG_{tr} and α for water/acetonitrile mixtures are available. These values were then used for the fitting analysis. The same procedure was used to correlate the solvent dependence of iodide affinity of **1** in water/methanol and that of sulfate affinity in the solvent mixtures for which ΔG_{tr} values are available. Table 4 summarizes coefficients g and a obtained after fitting. The goodness of the correlations is depicted graphically in Figure 4.

Table 4 illustrates that every analysis afforded characteristic combinations of the coefficients a and g . Considering that the analyses were performed for a wide range of solvent

Table 4. Coefficients g and a of the Equation $\Delta G = g\Delta G_{tr} + a\alpha$.^a

solvents	anion	g	a	R^2
water/acetonitrile	iodide	-1.38	-18.19	0.9978
water/methanol	iodide	-1.75	-23.07	0.9949
water/methanol	sulfate	-1.04	-17.05	0.9999
water/DMSO	sulfate	-0.62	-19.81	0.9899
pure solvents ^b	iodide	-1.52	-21.61	0.9882

^aCorrelation of the dependence of the Gibbs free energies of iodide and sulfate binding to **1** with the transfer energies ΔG_{tr} of the respective ion from water to a solvent mixture and the corresponding hydrogen-bond donation ability α of this mixture. ^bCoefficients obtained when correlating iodide affinity to ΔG_{tr} and α in water, methanol, acetonitrile, and DMSO.

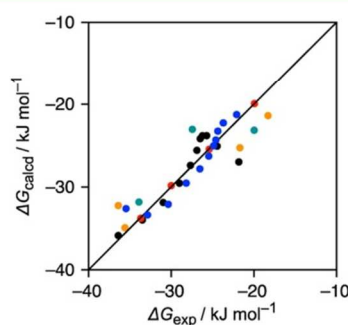


Figure 4. Correlation of the experimental ΔG values with the ones calculated on the basis of the regression analyses; iodide binding in water/methanol (black), sulfate binding in water/methanol (red), iodide binding in water/acetonitrile (blue), sulfate binding in water/DMSO (green), and iodide binding in the pure solvents (orange).

compositions and different anions, the respective coefficients are surprisingly similar, with g ranging between -0.62 and -1.75 (average -1.26 ± 0.44) and a between -17.05 and -23.07 (average -19.94 ± 2.45). Interestingly, using the averages of a and g allowed predicting the solvent dependence of iodide affinity in water/DMSO, and the curve thus obtained well reproduces the anion affinity of **1** observed in 70 vol % water/DMSO (Figure S16). Furthermore, Figure 4 indicates that the ΔG values calculated on the basis of the individual correlations reasonably well describe the experimental ones although deviations are certainly evident. Altogether, these results therefore support the assumption that ΔG_{tr} , which is related to anion desolvation, and α , a solvent descriptor that we expect to relate to the solvent reorganization at the binding site of the receptor upon complex formation, are very likely the major factors influencing the solvent dependence of the anion binding of **1**. Other factors likely play an additional but presumably less decisive role.

We also tested whether this correlation extends to the individual enthalpic and entropic contributions to binding strength. Figure 5 summarizes how the enthalpies and entropies of iodide and sulfate binding by **1** vary with solvent composition.

The graphs in Figure 5 show that the enthalpies and entropies of anion complexation vary with solvent composition in a relatively complex fashion. Enthalpy typically becomes more favorable when increasing the amount of the organic component in the high-water-content region of the solvent mixtures. The curves then go through a minimum, after which a

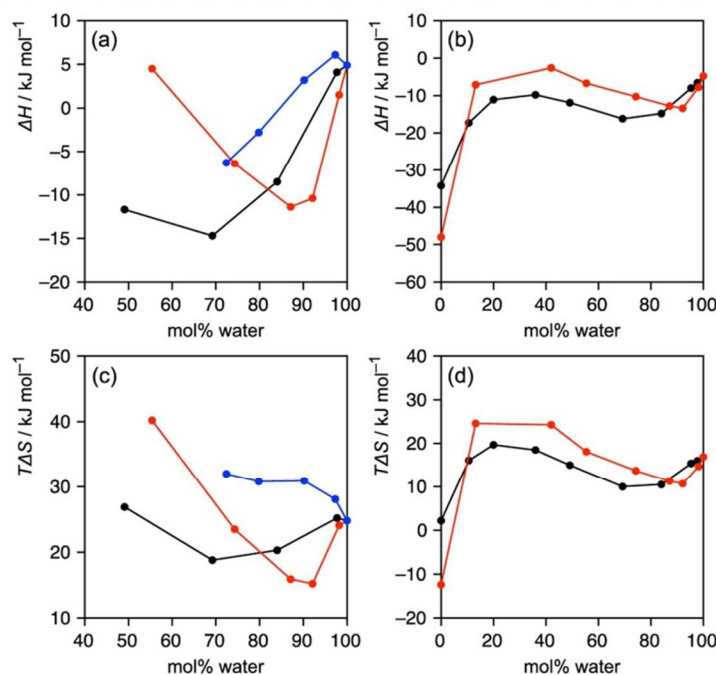


Figure 5. Dependence of the enthalpy of sulfate (a) and iodide (b) binding and the entropy of sulfate (c) and iodide (d) binding to bis(cyclopeptide) **1** on the solvent composition (water/methanol, black; water/acetonitrile, red; water/DMSO, blue).

further increase in the amount of the organic solvent causes the favorable contribution of binding enthalpy to become smaller again. This behavior, which has previously been observed for water/methanol,^{21e} clearly extends to water/acetonitrile. The difference is that the local minimum of binding enthalpy is located at ca. 70 mol % of water in water/methanol, independent of the anion, whereas it is located at 90 mol % in water/acetonitrile. Binding is enthalpically less favorable in mixtures in which the organic component predominates than in mixtures with a higher water content. In water/acetonitrile, the enthalpic contribution to iodide binding between 40 and 20 mol % of water is in fact almost zero, which renders a reliable quantification of binding affinity difficult in this region. Once the organic component exceeds 80 mol %, there is another pronounced change in the thermodynamics of binding associated with a strong improvement of binding enthalpy so that iodide binding in methanol and acetonitrile eventually ends up to be enthalpically strongly favored in the pure organic solvents.

The solvent dependence of binding entropy mostly mirrors that of binding enthalpy: favorable contributions of binding enthalpy are usually associated with less favorable contributions of binding entropy. Importantly, entropy is generally positive with the only exception of iodide binding in water/acetonitrile mixtures with a high acetonitrile content. The only system that does not exhibit enthalpy/entropy compensation is the sulfate complex of **1** in water/DMSO, where the increase of the organic component in the solvent causes enthalpy and entropy to become more favorable. The cause for this effect is currently not clear.

Understanding the solvent dependence of the individual thermodynamic contributions to anion binding of **1** turned out to be more difficult than understanding the trends of the overall

affinity in terms of ΔG . Correlating, for example, ΔH with ΔH_{tr} and α provided no satisfactory solution. A qualitative comparison of the solvent dependence of the enthalpy of iodide binding with the solvent dependence of several reported solvent properties revealed, however, an interesting parallel, namely, with the parameter describing the preferential solvation of iodide anions in water/methanol and water/acetonitrile mixtures. This parameter has been determined using the inverse Kirkwood–Buff integral approach^{33a} and is reported in terms of $\delta x_{X,S}$ or $\delta x_{X,W}$, where negative $\delta x_{X,S}$ or positive $\delta x_{X,W}$ values indicate the preferential solvation of an anion X^- by water over the solvation by the organic solvent. Values of $\delta x_{X,S}$ are reported for the solvation of iodide anions in water/methanol and water/acetonitrile.^{33b} Their solvent dependences are shown in Figure 6 along with the dependence of the enthalpy of iodide binding of **1** in the respective solvent.

Although the match is certainly not perfect, the similarities of the graphs describing the changes of $\delta x_{X,S}$ and ΔH with solvent composition are striking. The courses of the graphs indicate that binding enthalpy is particularly unfavorable in regions of solvent composition in which the iodide ion is mostly surrounded by water molecules and enthalpy benefits from a less pronounced water solvation. These trends can be rationalized by assuming that changing a thermodynamically favored state of ion solvation, for example, the preferential solvation of an anion by water molecules, is enthalpically costly. This explanation extends to entropy as a pronounced preferential solvation by water is likely entropically unfavorable, rendering the entropic contribution of anion desolvation upon complex formation beneficial.

If the local environment of the anion indeed affects complex formation to a significant extent, we wondered whether we could also quantitatively correlate binding enthalpy and the

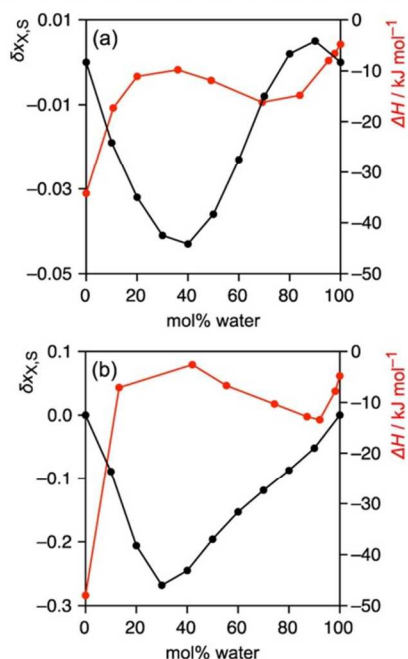


Figure 6. Dependence of $\delta x_{X,S}$ describing the preferential solvation of iodide anions by water over solvation by methanol (a) or acetonitrile (b) on solvent composition. More negative values indicate preferred solvation by water. The graphs also show the solvent dependence of the enthalpy of iodide binding by **1** for comparison.

preferential solvation parameter, $\delta x_{X,S}$. Because the graphs in Figure 6 indicate that $\delta x_{X,S}$ cannot be the only parameter responsible for the solvent dependence of ΔH , we attempted to also consider the preferential solvation of the receptor in this correlation. No quantitative information in this respect is available, but the solvatochromic behaviors of Reichardt's dye^{26b} and other dyes³⁴ have been frequently associated with a preferential solvation of organic molecules. We therefore used the equation $\Delta H = d \delta x_{X,S} + eE_T(30)$ for the multiparametric analysis. No satisfactory solution could be found when trying to correlate the course of ΔH in the full range of solvent compositions, maybe because $E_T(30)$ fails to describe receptor solvation under certain conditions. However, excluding the enthalpies of binding in the pure solvents did afford a reasonable fit, which showed that the preferential solvation of the binding partners likely controls the enthalpy of binding to some extent (Figure S17). We therefore conclude that the characteristic distribution of different solvent molecules in the solvation shells of solutes cannot be neglected when trying to understand their behavior in mixtures of solvents.

CONCLUSIONS

One important outcome of the work presented here is that bis(cyclopeptides) **1** and **2** bind anions not only in aqueous mixtures of organic solvents but also in water. In this highly competitive environment, the weakly coordinating iodide anion is slightly better bound than the strongly coordinating sulfate anion, indicating that anion desolvation competes with complex formation to a larger extent in water than in solvent mixtures. However, sulfate affinity of the bis(cyclopeptides) in water is still substantial and much higher than that of other recently

described receptors, which do not rely on electrostatic or coordinative interactions for anion binding.

The ability of the bis(cyclopeptides) to overcome sulfate hydration is attributed to the special nature of their binding sites, featuring a cavity lined by apolar regions of the proline units and the NH groups of the peptide bonds. Anion complexation thus combines contributions from the release of water molecules from this concave space^{3e} with N–H...A⁻ interactions. These hydrogen-bonding interactions are sufficiently hard and strong to induce affinity for strongly coordinating anions. The bis(cyclopeptides) therefore seem to occupy a position with respect to anion affinity in water between the glycoluril-derived receptors and charged or metal-containing ones, the latter of which typically bind with a higher affinity to strongly coordinating anions.

The second outcome of this work is that at the first sight rather complex anion-binding properties of **1** and **2** in different solvents and solvent mixtures, for example, the unexpected low iodide affinity of **1** in DMSO, can be understood and even quantitatively described by considering well-known solvent parameters relating to, for example, anion and receptor solvation. Correlating anion affinity with these parameters can provide information at a molecular level about factors that affect complex formation. The fact that the structural complexity of solvent mixtures, which also include aspects such as microheterogeneity or preferential solvation, has a profound effect on the thermodynamics of interactions in a host–guest system is not surprising but often not easy to rationalize. Our results suggest that the understanding of these effects, particularly in solvent mixtures frequently used in binding studies, could benefit from the parameters that have been introduced in the past to describe solvent effects or solvation phenomena.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsomega.7b00867.

Experimental procedures and spectral data for all new compounds; details about the qualitative and quantitative binding studies and results of the ITC titrations; solvent dependence of relevant parameters; details about the multiparametric analyses (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Email: kubik@chemie.uni-kl.de.

ORCID

Yizhak Marcus: 0000-0002-3138-9704

Stefan Kubik: 0000-0003-0526-7014

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Annika Steiner for the ESIMS measurements, Prof. Dr. Sandro Keller for helpful discussions, and Dipl.-Chem. Dominic Bernhard for help with the DFT calculations.

REFERENCES

- (1) (a) Smithrud, D. B.; Sanford, E. M.; Chao, I.; Ferguson, S. B.; Carcanague, D. R.; Evansek, J. D.; Houk, K. N.; Diederich, F. Solvent effects in molecular recognition. *Pure Appl. Chem.* **1990**, *62*, 2227–2236. (b) Schneider, H.-J. Binding mechanisms in supramolecular complexes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 3924–3977. (c) Rekharsky, M.; Inoue, Y. Solvation Effects in Supramolecular Recognition. In *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*; Gale, P. A., Steed, J. W., Eds.; Wiley-VCH: Chichester, 2012; Vol. 1, pp 117–134.
- (2) Marcus, Y. *Solvent Mixtures: Properties and Selective Solvation*; Marcel Dekker: New York, 2002.
- (3) (a) Blokzijl, W.; Engberts, J. B. F. N. Hydrophobic effects. Opinions and facts. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1545–1579. (b) Davis, A. M.; Teague, S. J. Hydrogen bonding, hydrophobic interactions, and failure of the rigid receptor hypothesis. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 736–749. (c) Chandler, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* **2005**, *437*, 640–647. (d) Biedermann, F.; Nau, W. M.; Schneider, H.-J. The hydrophobic effect revisited – studies with supramolecular complexes imply high-energy water as a noncovalent driving force. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 11158–11171. (e) Hillyer, M. B.; Gibb, B. C. Molecular shape and the hydrophobic effect. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2016**, *67*, 307–329.
- (4) (a) Rekharsky, M. V.; Mori, T.; Yang, C.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, H.; Sobransingh, D.; Kaifer, A. E.; Liu, S.; Isaacs, L.; Chen, W.; Moghaddam, S.; Gilson, M. K.; Kim, K.; Inoue, Y. A synthetic host-guest system achieves avidin-biotin affinity by overcoming enthalpy-entropy compensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 20737–20742. (b) Moghaddam, S.; Inoue, Y.; Gilson, M. K. Host-guest complexes with protein-ligand-like affinities: computational analysis and design. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4012–4021. (c) Moghaddam, S.; Yang, C.; Rekharsky, M.; Ko, H. K.; Kim, K.; Inoue, Y.; Gilson, M. K. New ultrahigh affinity host-guest complex of cucurbit[7]uril with bicyclo[2.2.2]octane and adamantane guests: thermodynamic analysis and evaluation of M2 affinity calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3570–3581. (d) Cao, L.; Šekutor, M.; Zavalij, P. Y.; Mlinarić-Majerski, K.; Glaser, R.; Isaacs, L. Cucurbit[7]uril-guest pair with an attomolar dissociation constant. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 988–993.
- (5) (a) Biedermann, F.; Uzunova, V. D.; Scherman, O. A.; Nau, W. M.; De Simone, A. Release of high-energy water as an essential driving force for the high-affinity binding of cucurbit[n]urils. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15318–15323. (b) Biedermann, F.; Vendruscolo, M.; Scherman, O. A.; De Simone, A.; Nau, W. M. Cucurbit[8]uril and blue-box: high-energy water release overwhelms electrostatic interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14879–14888.
- (6) (a) Assaf, K. I.; Ural, M. S.; Pan, F.; Georgiev, T.; Simova, S.; Rissanen, K.; Gabel, D.; Nau, W. M. Water structure recovery in chaotropic anion recognition: high-affinity binding of dodecaborate clusters to γ -cyclodextrin. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 6852–6856. (b) Assaf, K. I.; Gabel, D.; Zimmermann, W.; Nau, W. M. High-affinity host-guest chemistry of large-ring cyclodextrins. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7702–7706.
- (7) (a) Kubik, S. Anion recognition in water. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3648–3663. (b) Kataev, E. A.; Müller, C. Recent advances in molecular recognition in water: artificial receptors and supramolecular catalysis. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 137–167. (c) Langton, M. J.; Serpell, C. J.; Beer, P. D. Anion recognition in water: recent advances from a supramolecular and macromolecular perspective. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 1974–1987.
- (8) (a) Bowman-James, K.; Bianchi, A.; García-España, E. *Anion Coordination Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2011. (b) Sessler, J. L.; Gale, P. A.; Cho, W.-S. *Anion Receptor Chemistry*; RSC: Cambridge, 2006. (c) For an excellent review of anion receptors based on cyclopeptides, see: Elmes, R. B. P.; Jolliffe, K. A. Anion recognition by cyclic peptides. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4951–4968.
- (9) Schlenk, H.; Sand, D. M. The association of α - and β -cyclodextrins with organic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 2312–2320.
- (10) Cramer, F.; Saenger, W.; Spatz, H.-C. Inclusion compounds. XIX.^{1A} the formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions. Thermodynamics and kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 14–20.
- (11) (a) Gibb, C. L. D.; Gibb, B. C. Anion binding to hydrophobic concavity is central to the salting-in effects of Hofmeister chaotropes. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7344–7347. (b) Carnegie, R. S.; Gibb, C. L. D.; Gibb, B. C. Anion complexation and the Hofmeister effect. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 11498–11500.
- (12) (a) Yawer, M. A.; Havel, V.; Sindelar, V. A bambusuril macrocycle that binds anions in water with high affinity and selectivity. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 276–279. (b) Havel, V.; Yawer, M. A.; Sindelar, V. Real-time analysis of multiple anion mixtures in aqueous media using a single receptor. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4666–4669.
- (13) (a) Lisbjerg, M.; Jessen, B. M.; Rasmussen, B.; Nielsen, B. E.; Madsen, A. Ø.; Pittelkow, M. Discovery of a cyclic 6 + 6 hexamer of D-biotin and formaldehyde. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2647–2650. (b) Lisbjerg, M.; Nielsen, B. E.; Milhøj, B. O.; Sauer, S. P. A.; Pittelkow, M. Anion binding by biotin[6]uril in water. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 369–373.
- (14) Collins, K. D.; Washabaugh, M. W. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Q. Rev. Biophys.* **1985**, *18*, 323–422.
- (15) Sokkalingam, P.; Shraberg, J.; Rick, S. W.; Gibb, B. C. Binding hydrated anions with hydrophobic pockets. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 48–51.
- (16) (a) Katayev, E. A.; Ustynuk, Y. A.; Sessler, J. L. Receptors for tetrahedral oxyanions. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3004–3037. (b) Ravikumar, I.; Ghosh, P. Recognition and separation of sulfate anions. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3077–3098.
- (17) (a) Mateus, P.; Delgado, R.; Brandão, P.; Félix, V. Polyaza cryptand receptor selective for dihydrogen phosphate. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8638–8646. (b) Mateus, P.; Delgado, R.; Brandão, P.; Carvalho, S.; Félix, V. Selective recognition of tetrahedral dianions by a hexaaza cryptand receptor. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4661–4673. (c) Mateus, P.; Delgado, R.; André, V.; Duarte, M. T. Sulfate recognition by a hexaaza cryptand receptor. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 834–842.
- (18) (a) Custelcean, R.; Bosano, J.; Bonnesen, P. V.; Kertesz, V.; Hay, B. P. Computer-aided design of a sulfate-encapsulating receptor. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4025–4029. (b) Custelcean, R.; Bonnesen, P. V.; Duncan, N. C.; Zhang, X.; Watson, L. A.; Van Berkel, G.; Parson, W. B.; Hay, B. P. Urea-functionalized M_4L_6 cage receptors: anion-templated self-assembly and selective guest exchange in aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8525–8534.
- (19) Zhou, H.; Zhao, Y.; Gao, G.; Li, S.; Lan, J.; You, J. Highly selective fluorescent recognition of sulfate in water by two rigid tetrakisimidazolium macrocycles with peripheral chains. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14908–14911.
- (20) Cai, J.; Hay, B. P.; Young, N. J.; Yang, X.; Sessler, J. L. A pyrrole-based triazolium-phane with NH and cationic CH donor groups as a receptor for tetrahedral oxyanions that functions in polar media. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1560–1567.
- (21) (a) Kubik, S.; Kirchner, R.; Nolting, D.; Seidel, J. A molecular oyster – a neutral anion receptor containing two cyclopeptide subunits with a remarkable sulfate affinity in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12752–12760. (b) Reyheller, C.; Hay, B. P.; Kubik, S. Influence of linker structure on the anion binding affinity of bicyclopeptides. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 2095–2102. (c) Rodriguez-Docampo, Z.; Pasqu, S. I.; Kubik, S.; Otto, S. Noncovalent interactions within a synthetic receptor can reinforce guest binding. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11206–11210. (d) Kubik, S.; Goddard, R. Conformation and anion binding properties of cyclic hexapeptides containing L-4-hydroxyproline and 6-aminopicolinic acid subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5127–5132. (e) Sommer, F.; Kubik, S. Anion binding of a neutral bis(cyclopeptide) in water/

methanol mixtures containing up to 95% of water. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8851–8860.

(22) Schmidtchen, F. P. Isothermal Titration Calorimetry in Supramolecular Chemistry. In *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Schalley, C. A., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2007; pp 55–78.

(23) Marcus, Y. *Ion Properties*; Marcel Dekker: New York, 1997.

(24) Jacobson, B. L.; Quioco, F. A. Sulfate-binding protein dislikes protonated oxyacids. *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 783–787.

(25) Langton, M. J.; Robinson, S. W.; Marques, I.; Félix, V.; Beer, P. D. Halogen bonding in water results in enhanced anion recognition in acyclic and rotaxane hosts. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 1039–1043.

(26) (a) Dimroth, K.; Reichardt, C.; Siepmann, T.; Bohlmann, F. Über Pyridinium-N-phenol-betaine und ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polarität von Lösungsmitteln. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1963**, *661*, 1–37. (b) Reichardt, C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319–2358.

(c) Kosower, E. M. The effect of solvent on spectra. III. The use of Z-values in connection with kinetic data. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3267–3270. (d) Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W. Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, π^* , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2877–2887. (e) Marcus, Y.; Kamlet, M. J.; Taft, R. W. Linear solvation energy relationships: standard molar Gibbs free energies and enthalpies of transfer of ions from water into nonaqueous solvents. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 3613–3622. (f) Riddick, J. A.; Bunger, W. B.; Sakano, T. K. *Organic Solvents: Physical Properties and Methods of Purification*; Wiley Interscience: New York, 1986.

(g) Marcus, Y. The use of chemical probes for the characterization of solvent mixtures. Part 2. Aqueous mixtures. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1994**, 1751–1758. (h) Hefter, G.; Marcus, Y.; Waghorne, W. E. Enthalpies and entropies of transfer of electrolytes and ions from water to mixed aqueous organic solvents. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2773–2836. (i) Marcus, Y. Gibbs energies of transfer of anions from water to mixed aqueous organic solvents. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3880–3897.

(27) Giesecke, M.; Mériquet, G.; Hallberg, F.; Fang, Y.; Stils, P.; Furó, I. Ion association in aqueous and non-aqueous solutions probed by diffusion and electrophoretic NMR. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 3402–3408.

(28) Marcus, Y. The properties of organic liquids that are relevant to their use as solvating solvents. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, *22*, 409–416.

(29) Kubik, S.; Goddard, R.; Kirchner, R.; Nolting, D.; Seidel, J. A cyclic hexapeptide containing L-proline and 6-aminopicolinic acid subunits binds anions in water. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2648–2651.

(30) (a) Fuchs, R.; Hagan, C. P. Single-ion enthalpies of transfer from water to aqueous dimethyl sulfoxide solutions. *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 1797–1800. (b) Chen, T.; Hefter, G.; Marcus, Y. Relationships among solvent softness scales. *J. Solution Chem.* **2000**, *29*, 201–216.

(31) Marcus, Y. Transfer Gibbs free energies of divalent anions from water to organic and mixed aqueous-organic solvents. *Z. Naturforsch., A: Phys. Sci.* **1995**, *50*, 51–58.

(32) Marcus, Y.; Migron, Y. Polarity, hydrogen bonding, and structure of mixtures of water and cyanomethane. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 400–406.

(33) (a) Marcus, Y. Preferential solvation of ions in mixed solvents. Part 4. — Comparison of the Kirkwood–Buff and quasi-lattice quasi-chemical approaches. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1989**, *85*, 3019–3032. (b) Marcus, Y. Preferential solvation of ions in mixed solvents. 6: Univalent anions in aqueous organic solvents according to the inverse Kirkwood–Buff integral (IKBI) approach. *J. Chem. Thermodyn.* **2007**, *39*, 1338–1345.

(34) Bevilacqua, T.; Gonçalves, T. S.; Venturini, C. de G.; Machado, V. G. Solute-solvent and solvent-solvent interactions in the preferential solvation of 4-[4-(dimethylamino)styryl]-1-methylpyridinium iodide in 24 binary solvent mixtures. *Spectrochim. Acta, Part A* **2006**, *65*, 535–542.

2.4 Zusammenfassung

Die Synthesen des **BCP1** wurden im Vergleich zu der in meiner Diplomarbeit verwendeten Methode verbessert. Durch Veränderung der Isolation konnte **BCP1** außerdem in einer Form erhalten werden, die eine Charakterisierung der Anionenaffinität auch in Wasser gestattet. Durch Einführung einer zusätzlichen solubilisierenden Gruppe in die aromatische Einheit des Linkers wurde außerdem **BCP2** erhalten, das in bis zu 10 mM Konzentrationen in Wasser löslich ist.

Initiale Bindungsstudien konzentrierten sich zunächst auf die Charakterisierung der Anionenaffinität von **BCP1** in Wasser/Methanol-Gemischen und auf die Anionen Γ^- und SO_4^{2-} . Hierbei zeigte sich, dass in einem Bereich von 10 Vol% bis zu 90 Vol% Wasser/Methanol die Stabilitäten des Iodid- bzw. Sulfatkomplexes von **BCP1** fast linear von der Lösungsmittelzusammensetzung abhängt. Dabei ist der Anstieg der Komplexstabilität mit sinkendem Wasseranteil beim Sulfatkomplex wesentlich größer als beim Iodidkomplex. In ca. 90 Vol% Wasser/Methanol sind beide Komplexe gleich stabil und in Gemischen mit höherem Wasseranteil wird der Iodidkomplex stabiler als der Sulfatkomplex. Die Inversion der Anionenselektivität von **BCP1** in Lösungsmitteln mit hohem Wassergehalt zugunsten des weniger stark koordinierenden Anions wurde auf dessen weniger effiziente Solvatisierung in Wasser zurückgeführt.

Da die relativ komplexe Abhängigkeit der Komplexbildungsenthalpie und -entropie von der Lösungsmittelzusammensetzung nicht im Detail verstanden wurde, wurden die Untersuchungen auf reine organische Lösungsmittel und Wasser/Acetonitril- und Wasser/DMSO-Gemische ausgeweitet. Hierbei zeigte sich, dass die Komplexstabilität der Iodid- und Sulfatkomplexe von **BCP1** in diesen Lösungsmitteln im Wesentlichen von der Solvataion der Anionen kontrolliert wird (je leichter die Anionen desolvatisiert werden, desto höher ist die Komplexstabilität) und der H-Brücken Donoracidität α des Lösungsmittels. Die Abhängigkeit der Komplexstabilität von α wurde mit dem Beitrag, den der HE zur Komplexbildung beisteuert, korreliert. Diese Ergebnisse unterstützen daher die Resultate vorangegangener Arbeiten, die auf die Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Prolinringen der BCPs bei der Bildung ihrer Anionenkomplexes hinwiesen.^[28]

Auch in Wasser/Acetonitril und Wasser/DMSO wurde eine recht komplexe, nicht-lineare Abhängigkeit der Komplexbildungsenthalpie und -entropie von der Lösungsmittelzusammensetzung gefunden. Eine mathematische Korrelation dieser

Abhängigkeit mit Lösungsmittelparametern ist nicht bzw. nur ansatzweise gelungen. Der Vergleich des Kurvenverlaufs mit einem Parameter, der die bevorzugte Solvatisierung von Iodidanionen in Wasser/Methanol- bzw. Wasser/Acetonitril-Gemischen beschreibt, lieferte aber Hinweise darauf, dass die bevorzugte Solvataion eines Anions durch eine der Lösungsmittelkomponenten die Thermodynamik seiner Bindung an **BCP1** beeinflusst. Das entscheidende Ergebnis ist, dass strukturelle Parameter der Lösungen von Salzen in Lösungsmittelgemischen Einflüsse auf Bindungsprozesse ausüben können und Lösungsmittelgemische nicht als homogene Lösungen betrachtet werden sollten, die nur durch ihre Polarität charakterisiert sind. Diese Aspekte werden bei Bindungsstudien, welche oft in Lösungsmittelgemischen durchgeführt werden, vielfach vernachlässigt.

Schließlich konnte die Affinität der BCPs bezüglich verschiedener Anionen in Wasser charakterisiert werden. Hierfür wurde **BCP2** und die Anionen Γ^- , Br^- , Cl^- , SO_4^{2-} , SeO_4^{2-} , NO_3^- , H_2PO_4^- und ClO_4^- verwendet. Es zeigte sich, dass **BCP2** schwach koordinierende Anionen mit Ausnahme von Γ^- nicht bindet. Die Halogenidaffinität von **BPC2** korreliert mit der Größe des Anions und nimmt von Cl^- über Br^- zu Γ^- zu. Auch SO_4^{2-} wird von **BCP2** trotz des für die Desolvatation von SO_4^{2-} benötigten hohen Energiebetrags mit substantieller Affinität gebunden. Dies wurde auf starke $\text{N-H}\cdots\text{A}^-$ -Wechselwirkungen zurückgeführt, die für die Komplexbildung mitverantwortlich sind. **BCP2** nimmt daher eine Sonderstellung unter bekannten Anionenrezeptoren in Wasser ein. Während positiv geladene Rezeptoren oder solche mit Metallzentren bevorzugt an stark koordinierende Anionen binden, besitzen solche die weiche $\text{C-H}\cdots\text{A}^-$ -Wechselwirkungen ausnutzen, zum Beispiel Bambusurile und Biotinurile, eine höhere Affinität für schwach koordinierende chaotrope Anionen (ClO_4^- , SCN^-). Mit der Kombination aus hydrophoben Wechselwirkungen und $\text{N-H}\cdots\text{A}^-$ -Wechselwirkungen gelingt mit dem neutralen **BCP1** bzw. **BCP2** nicht nur die Bindung des schwach koordinierenden Iodidanions, sondern auch die von SO_4^{2-} . Dabei ist die Anionenaffinität auf die richtige Balance zwischen Größe des Anions (also dessen Passgenauigkeit in dem zur Verfügung stehenden Hohlraum), der Stärke der Rezeptor-Anion-Wechselwirkung sowie energetischen Beiträgen von Anion- und Rezeptordesolvatation abhängig. Die BCPs kommen daher sowohl in struktureller Hinsicht als auch in Bezug auf die zugrundeliegenden Prinzipien der Anionenbindung natürlichen Systemen, wie dem SBP, am nächsten.

3 Cyclopeptide zur Immobilisierung auf Gold

3.1 Kenntnisstand

3.1.1 Sensoren und Sonden

Wenn die in den vorigen Kapiteln beschriebenen cyclopeptidbasierten Rezeptoren nicht nur in der Grundlagenforschung, sondern auch in der Anwendung (wie beispielsweise der Überwachung der Trinkwasserqualität, welche strengen Auflagen unterliegt)^[44] zum Einsatz kommen sollen, sind in erster Linie analytische Anwendungen sinnvoll, bei denen die CPs, deren Synthese und Aufreinigung typischerweise aufwändig sind, in nur geringen Mengen benötigt werden. Mögliche Anwendungen beinhalten also den Einsatz von CPs als Erkennungselemente in chemischen Sensoren und Sonden.

In diesem Zusammenhang ist es zunächst wichtig, eine Abgrenzung zu treffen, da manchmal die Begriffe „chemischer Sensor“ und „chemische Sonde“ als Synonyme angesehen werden, was jedoch nicht zutrifft. Sensoren sind per Definition „miniaturisierte analytische Geräte, die Informationen über spezifische Ionen und Verbindungen in komplexen Proben in Echtzeit und online liefern“.^[45] Sie sind somit in der Lage, chemische Spezies zu unterscheiden. Dies unterscheidet sie von Detektoren, die dies nicht können. Eine Vielzahl chemischer Sensoren beruhen auf elektrochemischen Methoden, wie beispielsweise die potentiometrischen Messungen. Chemische Sonden dagegen sind meist optischer Natur und reagieren auf bestimmte Bedingungen oder Spezies in deren Umgebung.

Der Grundaufbau von Sensoren ist in Abbildung 27 gezeigt.^[46] Sie enthalten eine Rezeptoreinheit, die mit einem in der Probe vorhandenen passenden Analyten wechselwirken kann. Dadurch wird ein Signal erzeugt, welches im Signalwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Dieses elektrische Signal kann anschließend als Ausgangssignal in für die Auswertung zuständige Peripheriegeräte (Computer) eingespeist werden.

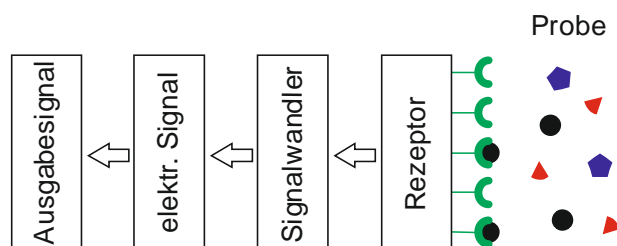


Abbildung 27 Schematischer Aufbau eines chemischen Sensors.

Dagegen führt die Wechselwirkung von Sonden mit einer Spezies unmittelbar zu einem auswertbaren Signal, wie etwa einem Farbumschlag der Lösung und zusätzliche Analysegeräte, wie in Abbildung 27 gezeigt, können wegfallen.

3.1.2 Modifizierte Au-Oberflächen für elektrochemische Sensoren

Schon seit dem frühen 20igsten Jahrhundert sind elektrochemische Sensoren bekannt. Besonders bewährt haben sie sich bei der Entwicklung von Biosensoren. Unter einem Biosensor versteht man ein analytisches Gerät, welches eine biologische Antwort in ein auswertbares elektrisches Signal umwandelt. Der erste kommerziell vertriebene Vertreter dieser Klasse von Sensoren war 1975 ein Glucosesensor, der von Yellow Springs Instruments angeboten wurde.^[47]

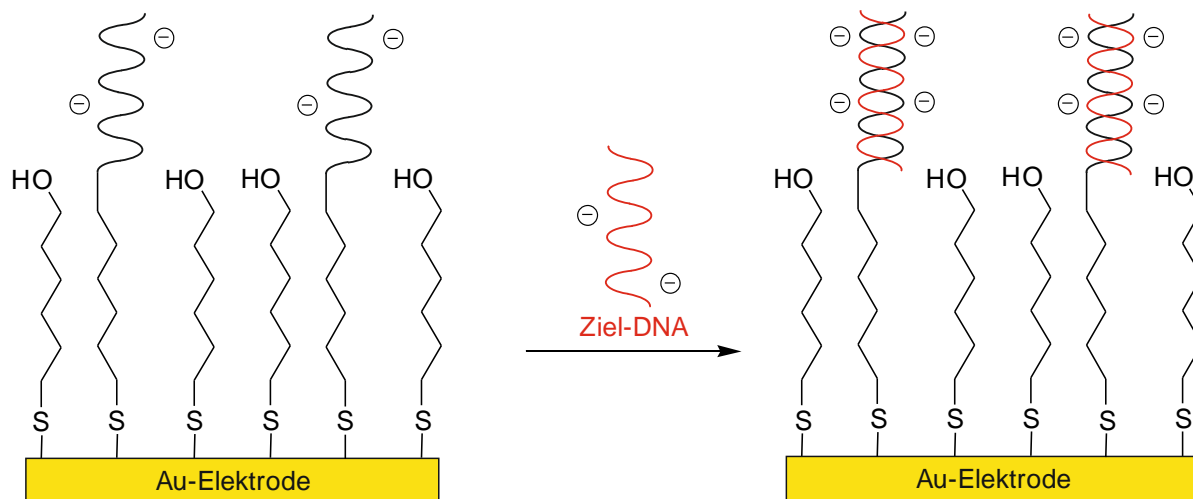
Von Interesse können solche Biosensoren auch bei der Untersuchung von pathogenen Proben, wie der Detektion des Avian Influenza Virus des Typs H5N1 (AIV, auch als Vogelgrippe bekannt) sein. Dieser Erreger kann Geflügelbestände bedrohen und unter Umständen auch auf den Menschen übertragen werden, wobei die Infektion häufig zum Tod führt.^[48-51] Übliche Methoden zur Detektion dieses Virus, wie zum Beispiel die Verwendung der Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)^[52] oder Enzymassays (AC-ELISA)^[53] haben den Nachteil, dass sie oft kostenintensiv und aufwändig in der Durchführung sind und dadurch speziell geschulte Personen notwendig sind.

Um diese Problematik zu umgehen, entwickelte die Gruppe um Radecki und Radecka einen elektrochemischen Genosensor auf Basis einer Au-Elektrode, der das H5N1 Virus detektieren kann.^[54] Das zugrundeliegende Prinzip ist in Schema 9 gezeigt. Durch die Immobilisierung von Einzelstrang-DNA mit der 20 Basen beinhaltenden Sequenz 5'-HS-(CH₂)₆-CCT CAA GGA GAG GAG AGA AGA AG-3' auf der Au-Oberfläche, kann Einzelstrang-DNA mit 20 komplementären Basen, wie sie im H5N1-Virus vorkommen, mit einem Detektionslimit bis zu 2.4×10^{-11} M nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt dabei auf elektrochemischem Weg in Anwesenheit eines Redoxmarkers in der Probenlösung.

Die ebenfalls auf der Au-Elektrode immobilisierten 6-Mercaptohexan-1-oleinheiten dienen als Abstandhalter zwischen den jeweiligen DNA-Einzelsträngen. Die Wechselwirkung der komplementären DNA-Stränge verändert die Oberflächenladung der Elektrode und dadurch deren elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Redoxmarker, was insgesamt den Elektronentransfer zwischen dem Marker und der Au-Elektrode beeinflusst.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

Diese Veränderung ist mit elektrochemischen Methoden detektierbar. Bei DNA-Biosensoren spricht man auch von Genosensoren.



Schema 9 Von Radecki und Radecka dargestellter elektrochemischer Genosensor zur Detektion des H5N1-Virus.

Neben den genannten Vorteilen haben diese Sensoren allerdings auch Nachteile. So können auf der Oberfläche der modifizierten Au-Elektrode defekte und kleine Löcher (Pinholes) während der Modifikation entstehen.^[55] Durch diese Defekte werden unerwünschte Faraday-Ströme detektiert, wenn Redoxmarker-Moleküle an die Au-Elektrode gelangen, wodurch der Gesamtstrom verfälscht wird. Eine Methode, um dieses Problem zu umgehen, ist, das redoxaktive Zentrum in die Elektrodenoberfläche zu integrieren. Diese Strategie hat den zusätzlichen Vorteil, dass kein externer Redoxmarker mehr notwendig ist. Die Eigenschaften solcher redoxaktiven Schichten hängen von der Distanz des Redoxzentrums zur Au-Elektrode, der Struktur der verbrückenden Einheit sowie der molekularen Umgebung des Redoxzentrums ab.^[56]

Unter diesen Gesichtspunkten haben Radecki und Radecka 2008 einen elektrochemischen Sensor zur Detektion des in höheren Dosen lebertoxischen Paracetamol^[57] (Abbildung 28a)) vorgestellt.^[55] Hierfür wurde ein Kupfer(II)-Komplex mit zwei Dipyrrromethenliganden (Abbildung 28b)) in die Oberfläche einer mit Dodecanthiolliganden passivierten Au-Elektrode integriert. Dieser Dipyrrromethenligand bindet Paracetamol, was durch das redoxaktive Kupferzentrum elektrochemisch detektiert werden kann. Welche Art der Wechselwirkung für die Erkennung von Paracetamol mit diesem elektrochemischen Sensor verantwortlich ist, wurde von den Autoren nicht näher erläutert. Mit diesem System

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

war es möglich, ohne aufwändige Probenvorbereitung ein Detektionslimit von Paracetamol in Anwesenheit menschlichen Plasmas von ca. 1.3×10^{-4} M zu erreichen. Dieses Detektionslimit ist ausreichend niedrig, um den Wirkstoff zuverlässig nachweisen zu können.

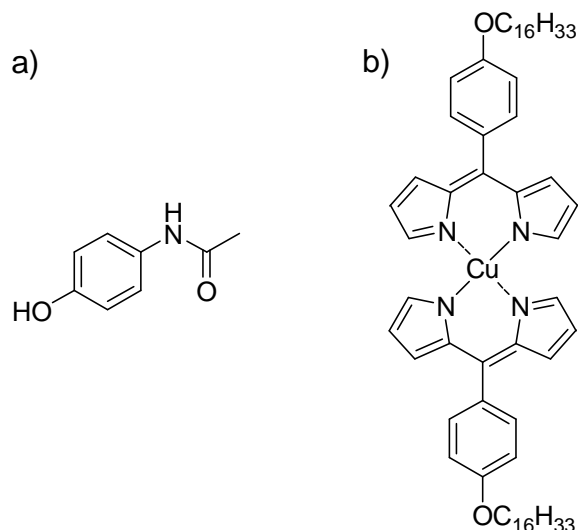
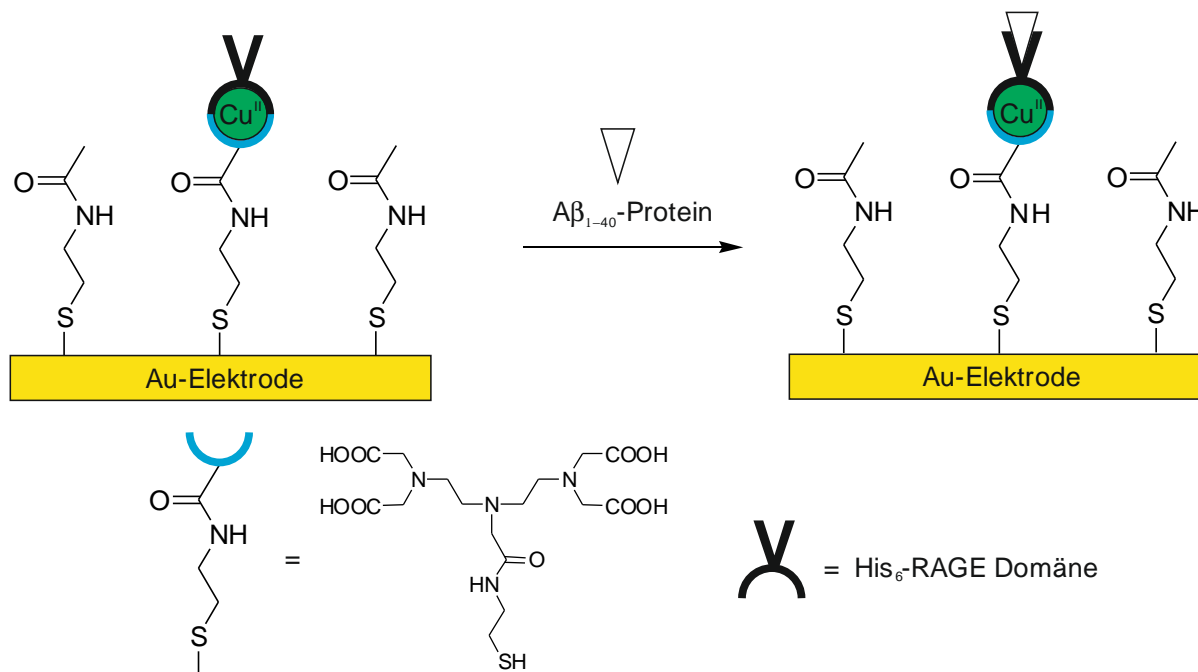


Abbildung 28 Struktur von a) Paracetamol und b) auf der Au-Elektrode immobilisierter Bis(dipyrromethen)-Kupfer(II)-Komplex.

Kürzlich wurde ebenfalls von Radecki *et al.* ein auf einem Dipyrromethenderivat basierender Biosensor für die Detektion von Antikörpern des bereits erwähnten H5N1-Virus in Hühnerserum entwickelt.^[58] Durch entsprechende Modifikation der Au-Elektrode konnten Antikörper bis zu einer Verdünnung des Hühnerserums um $1:7 \times 10^6$ (in einem Puffersystem) mit einem Limit von 2.4 pg/mL detektiert werden.

Die gleiche Gruppe konnte mit dem in Schema 10 gezeigten Aufbau auch das Protein A β_{1-40} , welches neben anderen A β -Proteinen eine fundamentale Rolle bei der Alzheimerkrankheit spielt,^[59-63] in Anwesenheit von menschlichem Plasma in mikromolaren bis nanomolaren Mengen detektieren.^[64] Als A β_{1-40} -erkennendes Element dient bei diesem Sensor eine His₆-RAGE-Domäne, welche über einen Kupfer(II)-Komplex mit einem thiolhaltigen Diethylentriaminpentaessigsäurederivat auf der Au-Oberfläche des Sensors verbunden ist.



Schema 10 Schematisches Prinzip der elektrochemischen Detektion von $\text{A}\beta_{1-40}$.

Die hier gezeigten Beispiele zeigen, dass elektrochemische Sensoren hohe Sensitivitäten und Selektivitäten erreichen können. Analoge elektrochemische Sensoren mit immobilisierten CPs könnten zur Anionendetektion eingesetzt werden, wenn die Wechselwirkung des CPs mit den Analyten ein messbares elektrochemisches Signal induziert. Für die Herstellung solcher Elektroden werden nur wenige Milligramm eines geeigneten CPs benötigt.

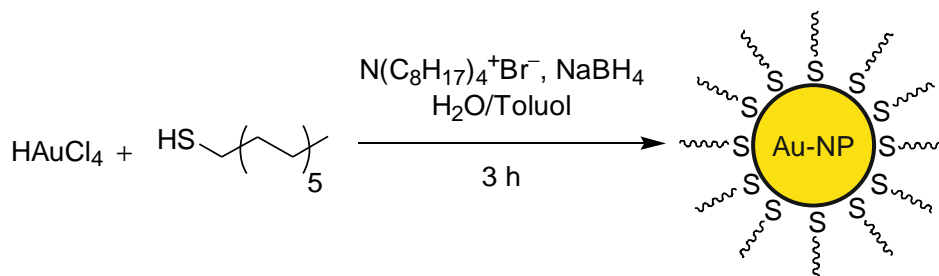
3.1.3 Modifizierte Au-Nanopartikel für optische Sonden

Synthese von Au-Nanopartikeln

Seit den ersten Berichten von Faraday^[65] über die ungewöhnlichen Eigenschaften von kolloidalem Gold vor 160 Jahren wurden diverse Methoden entwickelt, um stabile Goldnanopartikel (Au-NPs) darzustellen. 1994 wurde von Brust und Schiffrin eine leistungsfähige Synthese kleiner (<5 nm) Au-NPs mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 1–3 nm etabliert.^[66] Hierbei wird in einem Zweiphasengemisch Tetrachlorgoldsäure mit einem Phasentransferkatalysator in die organische Phase überführt und in Anwesenheit von Dodecanthiol mit Natriumborhydrid zu alkythiolpassivierten Au-NPs reduziert (Schema 11). Die Thiolliganden schützen die Au-NPs vor Agglomeration unter anderem wegen der im

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

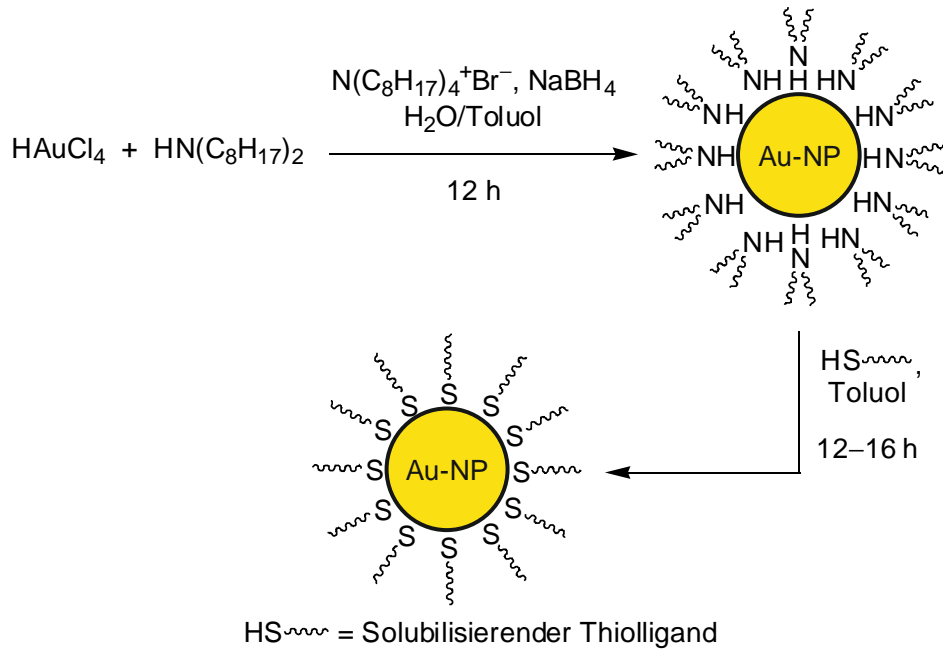
Vergleich zu anderen möglichen passivierenden Liganden, wie Aminen^[67] oder Phosphanen^[68], starken Wechselwirkung von Thiolen mit Goldoberflächen.^[69,70]



Schema 11 Synthese von dodecanthiolgeschützten Au-NPs nach Brust-Schiffrin.

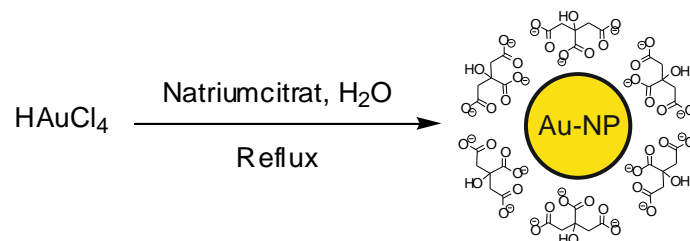
Je mehr Gold im Verhältnis zum immobilisierenden Thiolliganden eingesetzt wird, umso größer werden die erhaltenen Au-NPs.^[71] Zu diesem Ergebnis ist 2008 auch die Gruppe um Scrimin gekommen, die die Methode von Brust-Schiffrin modifizierten.^[67] Zunächst werden hierbei im ersten Schritt Au-NPs mit vergleichsweise schwach gebundenen Aminliganden synthetisiert, welche im Anschluss durch eine Austauschreaktion gegen Thiolliganden ersetzt werden (Schema 12). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Thiolliganden nach der bereits erfolgten Nanopartikelsynthese eingeführt werden. Dadurch können auch funktionalisierte Thiole verwendet werden, die in Gegenwart von NaBH_4 nicht stabil sind. Außerdem ist leichter eine Synthese von Au-NPs mit unterschiedlichen oberflächengebundenen Thiolen möglich. Scrimin konnte durch die Variation der zugegebenen Menge des Amins stabile Au-NPs mit Durchmessern im Bereich von 1.9–8.9 nm darstellen und diese dann durch Ligandenaustausch mit hydrophilen Thiolliganden in wasserlösliche Au-NPs überführen.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD



Schema 12 Vorgehensweise der Au-NPs nach Scrimin.

Um Au-NPs im Bereich von 10–20 nm zu erhalten, dient die 1951 von Turkevich eingeführte Methode, bei der Citrat als reduzierendes Reagens und als passivierender Ligand fungiert.^[72] Diese Methode wurde 1973 von Frens weiter modifiziert (Schema 13).^[73] Er zeigte, dass durch Veränderung der anwesenden Menge Natriumcitrat die Durchmesser der erhaltenen Au-NPs im Bereich von 16–147 nm variiert werden können. Dabei steigen die Durchmesser bei Reduktion der Citratmenge an, während bei größeren Mengen Citrat kleinere Au-NPs erhalten werden.



Schema 13 Angepasste Turkevich-Methode nach Frens zur Synthese citratgeschützter Au-NPs.

Durch Wahl der Darstellungsmethode können also heutzutage gezielt Au-NPs mit Durchmessern zwischen 2 und ca. 150 nm hergestellt werden. Dabei existieren neben den

vorgestellten Methoden noch Varianten, zum Beispiel die Methode von Murphy,^[74] die in Einzelfällen Vorteile bieten.

Eigenschaften von Au-Nanopartikeln

Aufgrund ihrer Größe verhalten sich Au-NPs weder wie einzelne Goldatome noch wie metallisches Gold. Ein Beispiel dafür ist, dass sie (vorausgesetzt sie sind durch stabile Liganden passiviert) ähnlich wie organische Moleküle aus einer Lösung isoliert, getrocknet und auch wieder gelöst werden können. Außerdem zeigen Au-NPs, die größer als ca. 3 nm sind, im UV/Vis-Spektrum eine charakteristische Oberflächenplasmonresonanzbande (Surface Plasmon Resonance, SPR-Bande) im Bereich von ca. 530 nm. Diese ist auf die kollektive Schwingung von Oberflächenelektronen der Au-NPs nach Anregung von Licht geeigneter Wellenlänge zurückzuführen. Diese Bande wird umso intensiver, je größer die Nanopartikel sind und somit je mehr Elektronen in Schwingung versetzt werden können. In Abbildung 29 sind als Beispiel die UV/Vis-Spektren verschieden großer Au-NPs mit Alkylthiolliganden gezeigt.^[75] Es ist deutlich zu erkennen, dass die SPR-Bande bei Partikeln kleiner als 3 nm nahezu verschwindet, während sie bei größeren Au-NPs deutlich ausgeprägter ist.

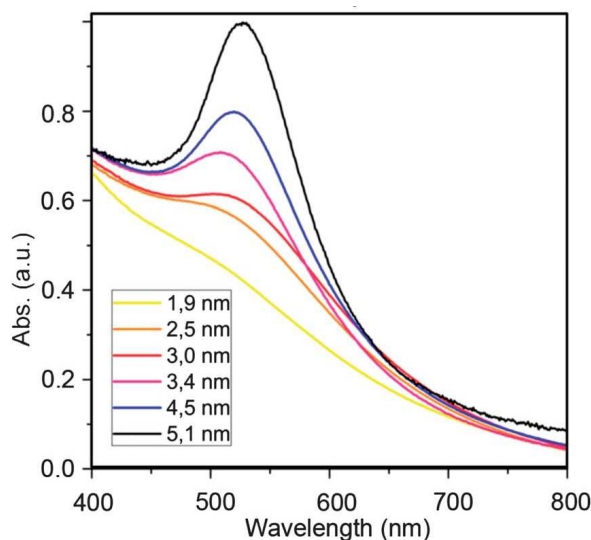


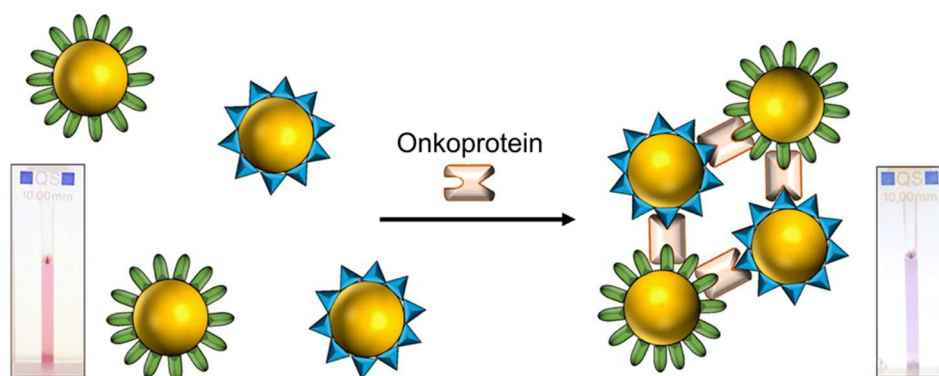
Abbildung 29 UV/Vis-Spektren von dodecanthiolgeschützten Au-NPs mit verschiedenen Durchmesser des Goldkerns. Reproduced (adapted) from G. L. Nealon, B. Donnio, R. Greget, J.-P. Kappler, E. Terazzi, J.-L. Gallani, *Nanoscale* 2012, 4, 5244–5258 with permission from The Royal Society of Chemistry.

Charakteristisch für Au-NPs ist auch die Färbung der Lösung. Während kleine Au-NPs (<5 nm) tiefbraun bis schwarz sind, sind größere Nanopartikel (>5 nm) in Lösung über rot bis zu violett gefärbt, da auch die Lage der Plasmonresonanzbande von der Au-NP-Größe abhängt.

Optische Sonden

Dadurch, dass die SPR-Bande bei größeren Au-NPs signifikant an Intensität zunimmt und durch Aggregation einzelner Au-NPs typischerweise zu höheren Wellenzahlen verschoben wird, stellen Au-NPs eine interessante Basis für die Entwicklung optischer Sonden dar. Wird durch die Wechselwirkung eines Au-NPs mit einem geeigneten Analyten die Agglomeration von Au-NPs induziert, kann die Anwesenheit des Analyten UV/Vis-spektroskopisch durch bathochrome Verschiebung der SPR-Bande oder sogar mit bloßem Auge durch Blauverfärbung der Lösung nachgewiesen werden.

Kürzlich beschrieb die Gruppe um Bruylants oberflächenmodifizierte Au-NPs, mit welchen das in menschlichen leukämischen Zellen^[76] vermehrt vorkommende Onkoprotein Mdm2 im nanomolaren Bereich nachgewiesen werden kann (Schema 14).^[77] Hierbei werden zwei verschieden modifizierte Au-NPs kombiniert, die jeweils unterschiedliche Protein-Aptamere auf der Au-NP-Oberfläche tragen mit Bindungsstellen für das Onkoprotein Mdm2.



Schema 14 Multivalente Aggregation eines Onkoproteins mit Au-NPs, beschrieben von Bruylants et al. Blaue Dreiecke = Aptamer p53; grüne Halbkreise = Aptamer p14. Reprinted (adapted) with permission from M. Retout, H. Valkenier, T. Doneux, K. Bartik, G. Bruylants, ACS Sens. 2016, 1, 929–933. Copyright 2016 American Chemical Society.

Das Zielmolekül führt zu einer Aggregation dieser Au-NPs, welche spektroskopisch nachgewiesen werden kann (Abbildung 30).

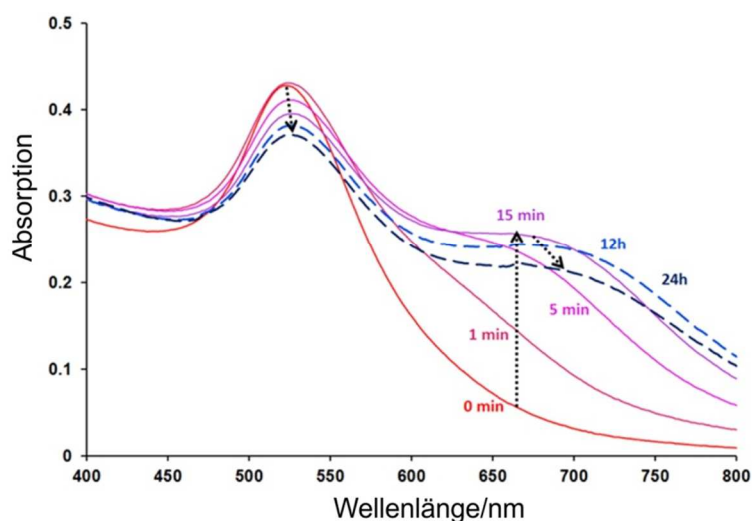


Abbildung 30 Zeitaufgelöste UV/Vis-Spektren der Mischung aus Au-NP-p53 und Au-NP-p14 in Anwesenheit von Mdm2 (50 nM). Reprinted (adapted) with permission from M. Retout, H. Valkenier, T. Doneux, K. Bartik, G. Bruylants, *ACS Sens.* 2016, 1, 929–933. Copyright 2016 American Chemical Society.

Bereits 5 min nach der Zugabe von Mdm2 ist eine Abnahme der Intensität der SPR-Bande bei 520 nm zu erkennen, während eine neue Absorptionsbande bei 680 nm entsteht. Diese bathochrome Verschiebung der SPR-Bande um 160 nm zeigt die proteininduzierte Agglomeration der Nanopartikel an. Diese Aggregation konnte auch mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) nachgewiesen werden.

Analoge optische Sonden auf Basis von Au-NPs wurden beschrieben. Beispiele sind oberflächenmodifizierte Au-NPs zum Nachweis von Fumarat,^[78] Fluorid^[79] oder Nitrit.^[80]

Diese Beispiele belegen, dass die analytinduzierte Au-NP-Aggregation eine empfindliche, teils hochselektive und ohne großen apparativen Aufwand anwendbare Strategie zur Entwicklung optischer Sonden darstellt. Die Verwendung der in den vorigen Kapiteln beschriebenen CPs als Erkennungseinheiten in solchen Sonden ist möglich, da die Anionenbindung dieser CPs mit der Zusammenlagerung zweier Cyclopeptidringe verbunden ist. Entsprechend kann die Wechselwirkung von CPs, die sich auf unterschiedlichen Au-NPs befinden, zur Nanopartikelaggregation führen.

Teil A: Modifikation von Au-Oberflächen mit CPs zur Entwicklung eines Sensors

3.2 Aufgabenstellung

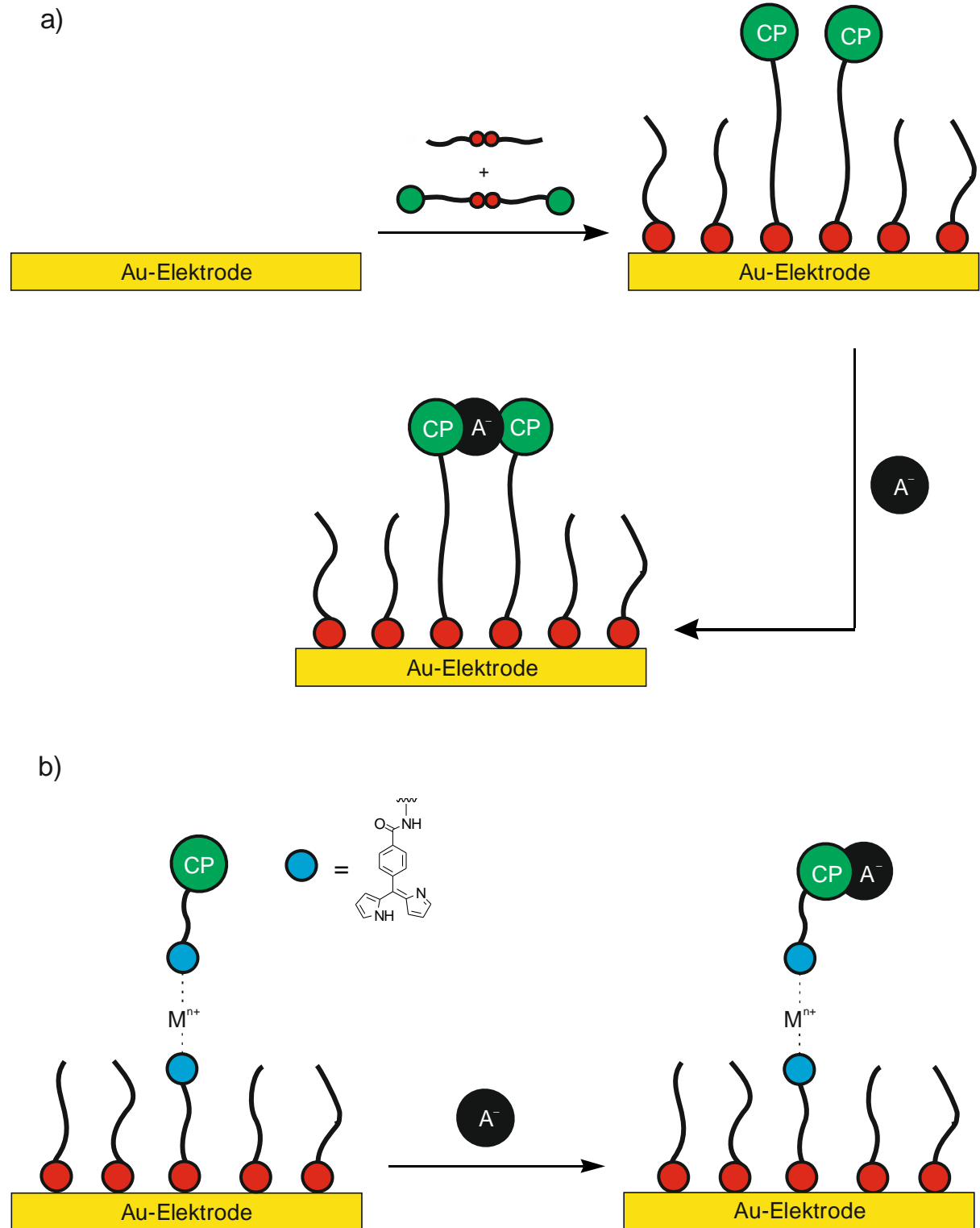
Das Ziel dieses Teils der Arbeit war es, anionenbindende CPs darzustellen, die auf einer Goldoberfläche, zum Beispiel einer Goldelektrode (Au-Elektrode), immobilisiert werden können. Unsere Kooperationspartner Prof. Hanna Radecka und Prof. Jerzy Radecki (Olsztyn, Polen) sollten diese Verbindungen mittels einer in ihrer Gruppe etablierten Methode auf Au-Elektroden immobilisieren.^[54,58] Anschließend sollte durch die Kooperationspartner untersucht werden, ob diese Au-Elektroden einen elektrochemischen Nachweis von Anionen in Wasser erlauben.

Es sollten zwei Strategien verfolgt werden, die CPs auf den Au-Elektroden zu immobilisieren, um zwei verschiedene elektrochemische Nachweismethoden zu realisieren. In Schema 15 sind beide Ansätze schematisch skizziert.

In der ersten Variante nach Schema 15a) soll ein CP mit einer Alkylkette, die endständig eine Thiolfunktion enthält, verwendet werden. Dieses CP soll als Disulfid auf der Au-Oberfläche immobilisiert werden. Bei Anionenzugabe sollten die beiden Cyclopeptidringe Anionenkomplexe auf der Au-Oberfläche ausbilden. Die daraus resultierende Veränderung der Oberflächenladung beeinflusst das Redoxpotential eines extern zugegebenen Redoxmarkers, wodurch die Anionenbindung detektiert werden kann.

Bei der zweiten Variante nach Schema 15b) werden Cyclopeptideinheiten über Metallkomplexe mit von Dipyrrromethen abgeleiteten Liganden auf der Oberfläche immobilisiert. Durch das Metallzentrum besitzt dieses System bereits einen redoxaktiven Reporter, weshalb bei dieser Variante kein externer Redoxmarker nötig ist. Der Bindungsmodus der Anionen sollte sich ebenfalls von dem in Variante a) unterscheiden, da sich keine zwei Cyclopeptideinheiten in räumlicher Nähe befinden und dadurch nicht mit der Bildung von Sandwichkomplexen zu rechnen ist.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD



Schema 15 Schematische Darstellung und Anionenbindungsmodus von a) Immobilisierung eines CP-Disulfids und b) Immobilisierung eines CPs über Koordination an ein Metallzentrum. Schwarze Linie = Alkyl- bzw. Arylkette; roter Kreis = Schwefel; grüner Kreis = CP; schwarzer Kreis = Anion; blauer Kreis = Dipyromethen.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Synthesepfanungen

Als Zielverbindungen in diesem Projekt wurden die Cyclopeptide **CP2** und **CP3** (Abbildung 31) gewählt. Sie sollten auf die in Schema 16 und Schema 17 gezeigte Weise zugänglich sein.

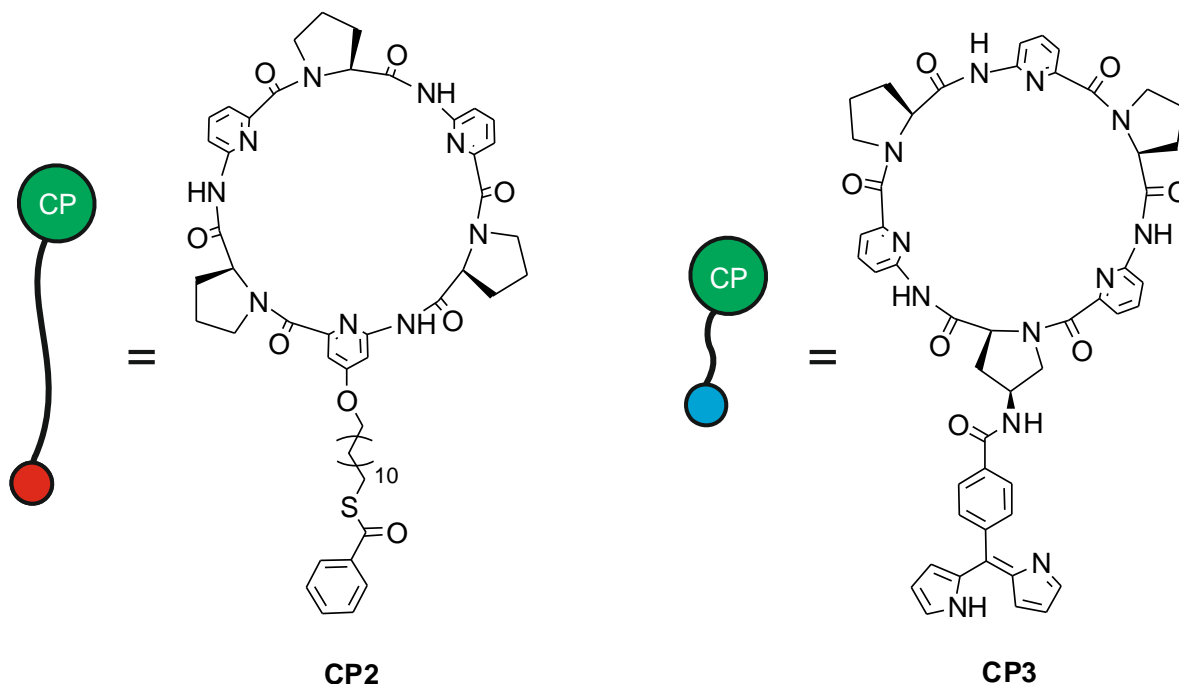
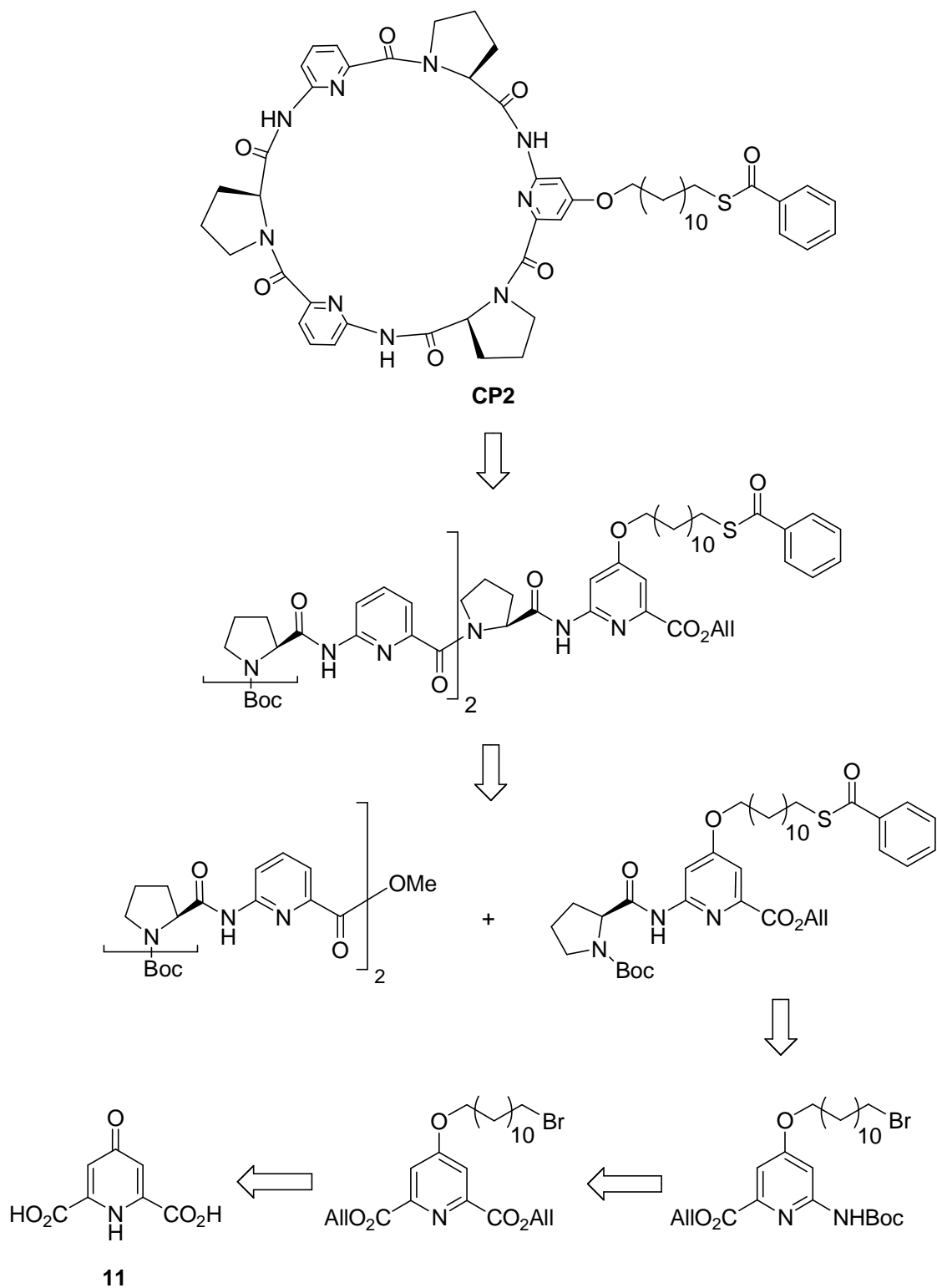


Abbildung 31 Strukturen von CP2 und CP3.

Das gewünschte **CP2** (Schema 16) sollte durch Cyclisierung eines linearen Hexapeptids dargestellt werden, das an einer aromatischen Untereinheit eine ω -Thiobenzoylalkylkette enthält. Die in dem Hexapeptid zu verwendende Schutzgruppenchemie ist hier von entscheidender Bedeutung. Es sollten am *N*-terminalen Ende eine im Sauren abspaltbare Boc- und am *C*-terminalen Ende eine durch Pd(0)-Katalyse abspaltbare Allylester-Schutzgruppe verwendet werden. In Kombination mit der endständigen Thiobenzoatgruppe in dem Substituenten an der aromatischen Untereinheit, die basisch abgespaltet werden kann, wird eine orthogonale Schutzgruppenchemie erreicht. Das lineare Hexapeptid sollte durch Kupplung eines in der Arbeitsgruppe bekannten Tetrapeptids mit einem in 4-Position entsprechend substituierten Dipeptid erhalten werden. Durch Kupplung des in 4-Position substituierten 6-Aminopicolinsurederivats und Boc-L-Prolin sollte das

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

substituierte Dipeptid unter etablierten Methoden mit anschließender Substitution des Bromids gegen Thiobenzoat dargestellt werden.

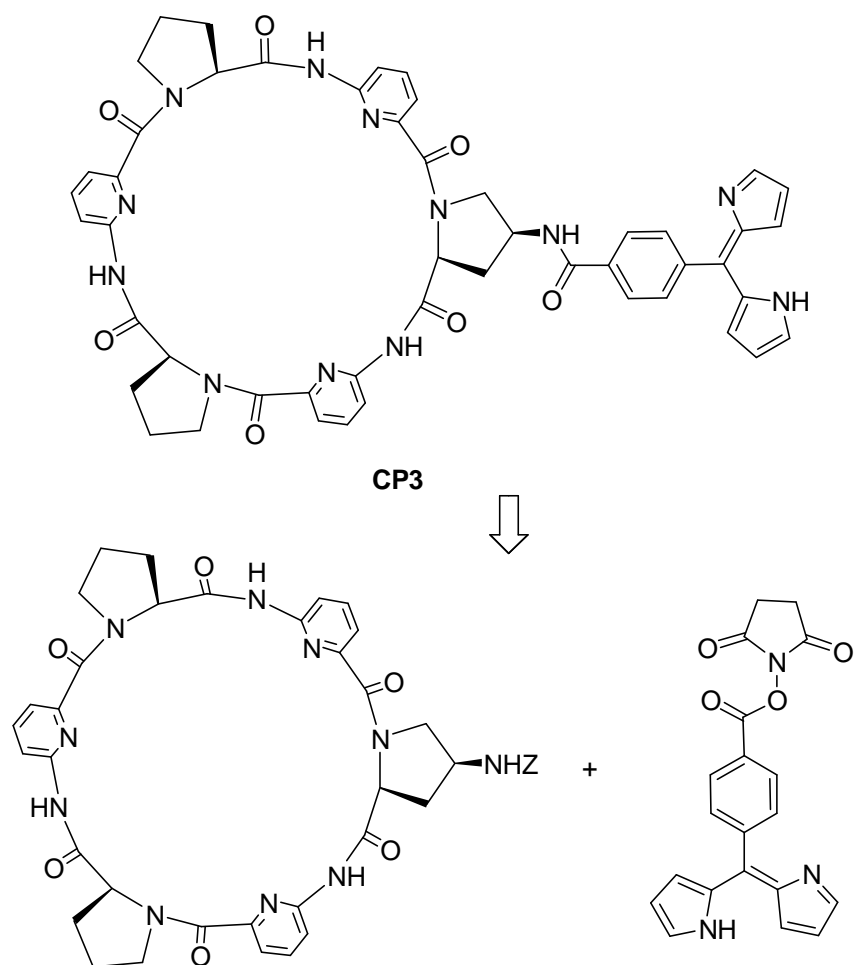


Schema 16 Geplante Route für die Synthese von **CP2**.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

Das an der Aminfunktion Boc-geschützte 6-Aminopicolinsäurederivat sollte ausgehend von dem entsprechenden Diallylester erhalten werden. Dieser Diallylester mit in 4-Position eingeführtem Bromdodecanrest sollte durch eine Ethersynthese mit Dibromdodecan und dem zugrundeliegenden Diester erhalten werden. Die Länge von 12 Methylengruppen wurde gewählt, um nach Immobilisierung des **CP2** einen ausreichenden Abstand des CPs zu den ebenfalls auf der Au-Oberfläche zur Passivierung eingeführten Alkylthiolen zu erreichen, damit diese ungehindert mit Anionen wechselwirken können. Der Diallylester sollte ausgehend von der kommerziell erhältlichen Chelidamsäure dargestellt werden.

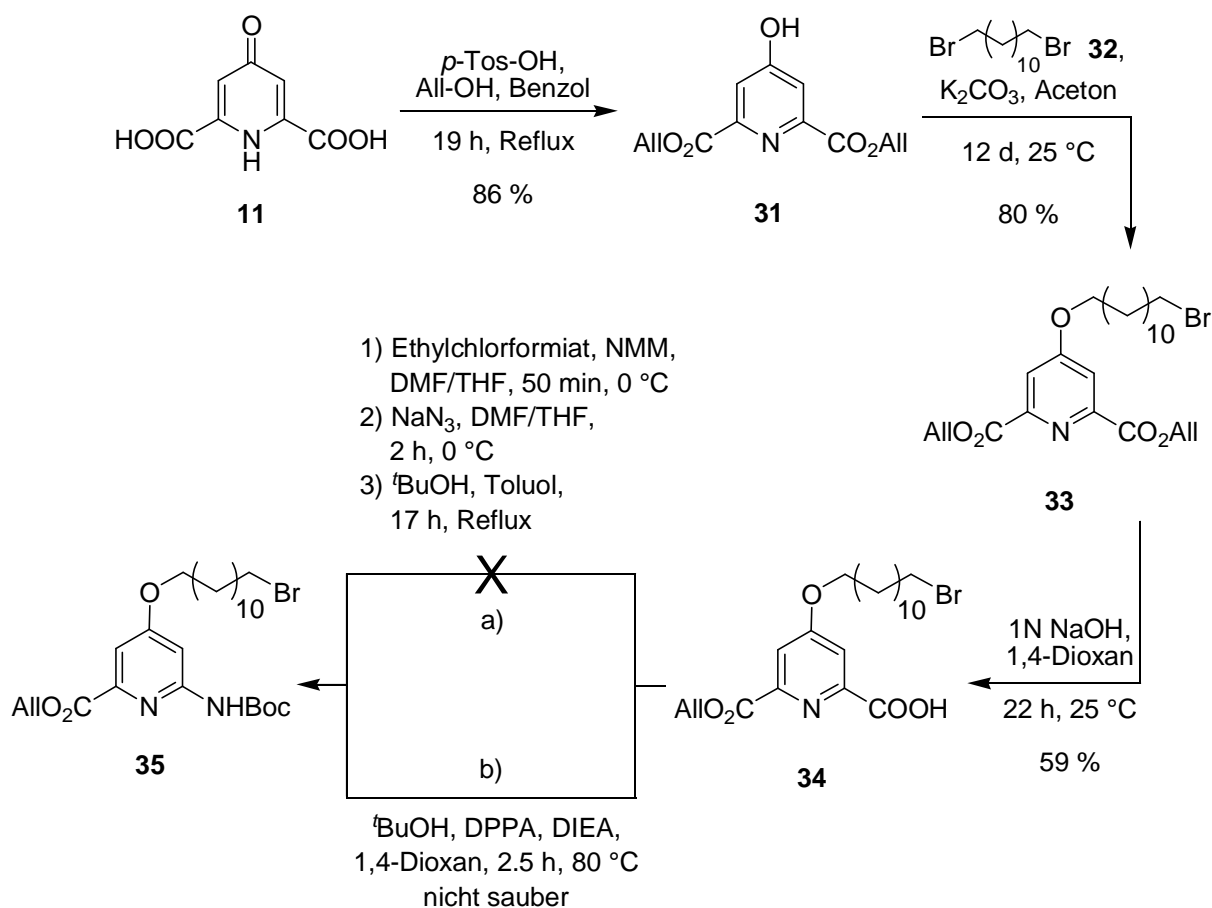
Für die Synthese von **CP3** (Schema 17) kann im Wesentlichen auf eine in der Gruppe etablierte Syntheseroute^[81] zurückgegriffen werden, um zu dem Cyclopeptidgrundgerüst zu gelangen. Das bekannte CP mit einer Z-geschützten (4*S*, 2*S*)-Aminoprolinereinheit sollte entschützt und mit dem von Prof. Wim Dehaen (Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellten Dipyrromethenderivat zu **CP3** gekuppelt werden.



Schema 17 Geplante Synthese von **CP3**.

3.3.2 Synthese von CP2

Zunächst sollte eine Syntheseroute für den Pyridinbaustein **35** ausgearbeitet werden, welcher eine Kombination von Boc- und Allylester als Schutzgruppen für die Amino- bzw. Carboxylatgruppe enthält (Schema 18). Diese Schutzgruppenkombination hatte sich bei der Synthese anderer Cyclopeptide mit Thiolgruppen in einer Seitenkette bereits bewährt.^[82] Hierfür wurde zunächst die kommerziell erhältliche Chelidamsäure **11** mit Allylalkohol im Sauren zweifach verestert.^[83] Anschließend wurde **31** im Sinne einer Williamson-Ethersynthese unter basischen Bedingungen zu dem in 4-Position ethersubstituierten Derivat **33** in 80 % Ausbeute umgesetzt.^[84]



Schema 18 Syntheseroute für das Pyridinderivat **35**.

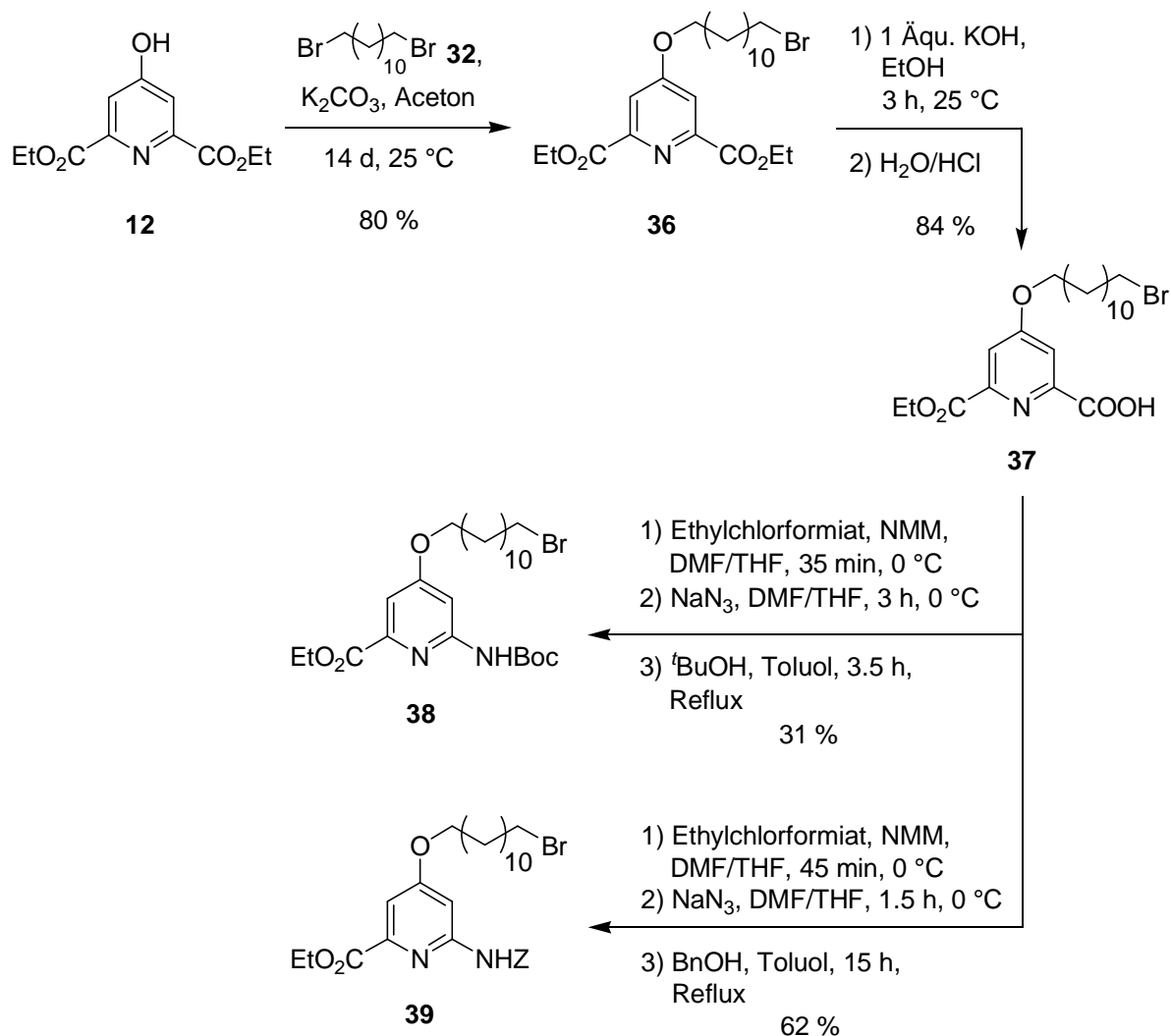
Die anschließende einseitige Verseifung zu **34** gelang nur in moderater Ausbeute und lieferte kein sauberes Produkt, weshalb möglicherweise die folgende Umsetzung zu **35** nicht zufriedenstellend realisiert werden konnte. Auf dem Standardweg (Weg a))^[30,85] konnte das

gewünschte Produkt nicht isoliert werden. Eine alternative Methode, bei der **34** in einem Eintopfverfahren mit Diphenylphosphorylazid (DPPA) umgesetzt wurde, welches gleichzeitig als Reagenz zur Generierung des gemischten Anhydrids dient als auch als Azidquelle (Weg b)),^[86] lieferte nur geringe Mengen verunreinigtes Produkt.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde das Analogon **39** synthetisiert, das anstelle des Allylesters eine Ethylestergruppe enthält. Die Verwendung des Ethylesters ändert das Prinzip der für den Aufbau des CPs notwendigen Schutzgruppenchemie nicht, da Ethylester und Boc-Schutzgruppen ebenfalls unabhängig voneinander abgespaltet werden können. Es muss aber darauf geachtet werden, dass die selektive Spaltung eines Ethylesters im Basischen in Gegenwart einer im selben Molekül vorhandenen Thiobenzoatgruppe nicht möglich ist, die Spaltung eines Allylesters unter Pd(0)-Katalyse aber durchaus. Daher kann bei diesem Verfahren die Thiobenzoatgruppe erst ganz am Ende der Synthese eingeführt werden.

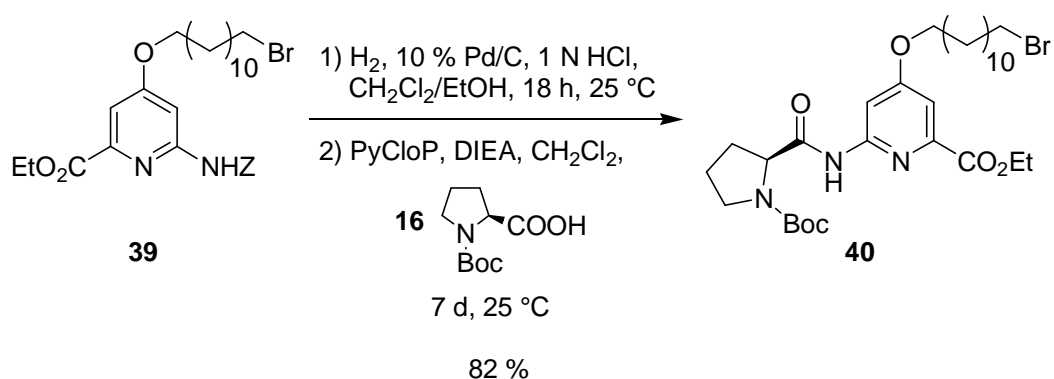
Bei der neuen Synthese wurde mit dem bereits in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Diethylester der Chelidamsäure **12** begonnen (Schema 19). Dieser wurde in einer Williamson-Ethersynthese mit **32** zu **36** in 80 % Ausbeute umgesetzt. Die anschließende einseitige Verseifung mit KOH in Ethanol verlief in hohen Ausbeuten und lieferte **37** als sauberes Produkt.^[87] Die anschließende Umsetzung mit Ethylchlorformiat, Natriumazid und nachfolgender Curtius-Umlagerung in Anwesenheit verschiedener Alkohole lieferte die gewünschten Produkte **38** und **39**, welche beide als Pyridinbausteine für die Synthese des **CP2** in Frage kommen. Bei Verwendung von *tert*-Butanol wurde der Boc-geschützte Pyridinbaustein **38** in 31 % Ausbeute und bei Verwendung von Benzylalkohol wurde das Z-geschützte Derivat **39** in 62 % Ausbeute erhalten. Da die Ausbeute von **39** doppelt so hoch ausfiel wie die von **38**, wurde in den folgenden Schritten das Z-geschützte Derivat **39** weiterverwendet.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD



Schema 19 Synthese des Pyridinbausteins 38 bzw. 39.

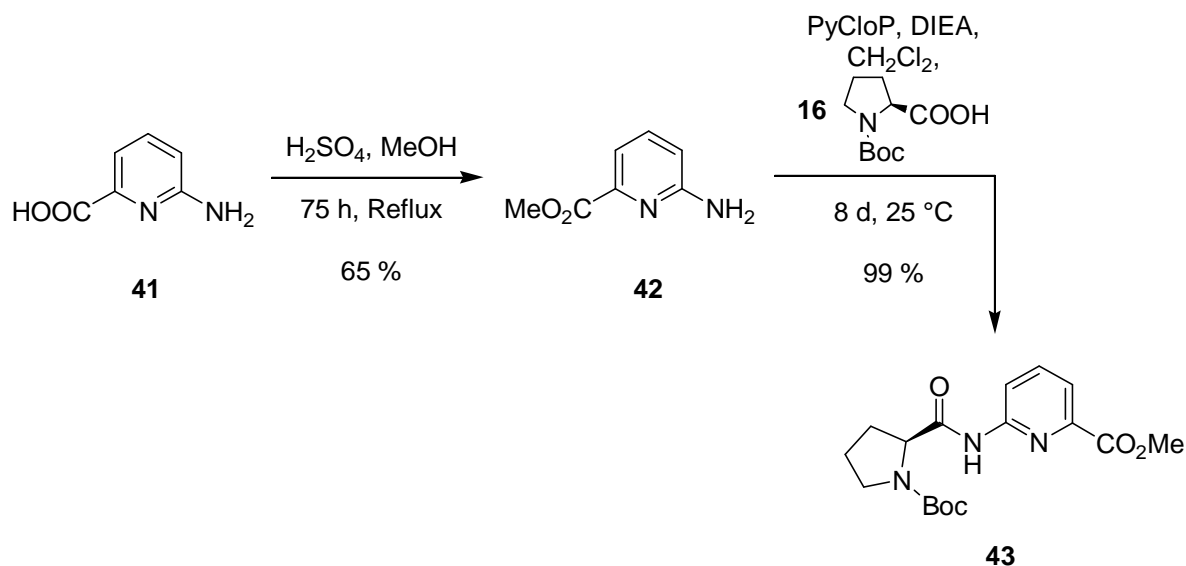
Verbindung 39 wurde unter Standardbedingungen am *N*-Terminus entschützt und mit Boc-L-Prolin 16 sowie PyCloP als Kupplungsreagenz zu dem Dipeptid 40 gekuppelt (Schema 20).



Schema 20 Darstellung des Dipeptids 40.

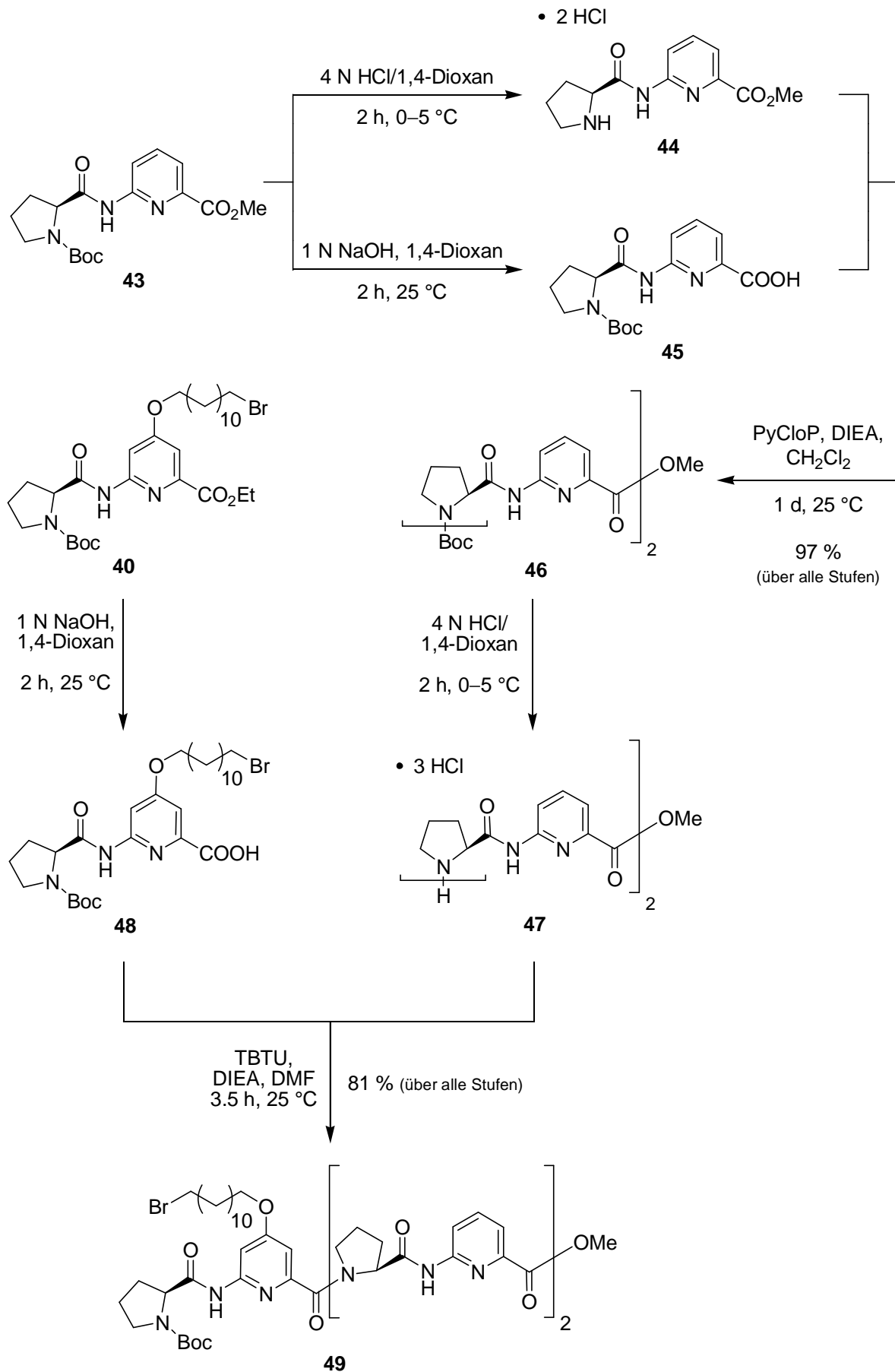
3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

Um zu **CP2** zu gelangen, musste zusätzlich der unsubstituierte Tetrapeptidbaustein **46** dargestellt werden. Dafür war das in Schema 21 gezeigte Dipeptid **43** nötig, welches ausgehend von kommerziell erhältlicher 6-Aminopicolinsäure **41** erhalten wurde. Hierzu wurde der Methylester **42** synthetisiert und dieser anschließend unter Standardkupplungsbedingungen mit **16** in quantitativer Ausbeute zum Dipeptid **43** gekuppelt.^[81]



Schema 21 Synthese des Dipeptids **43**.

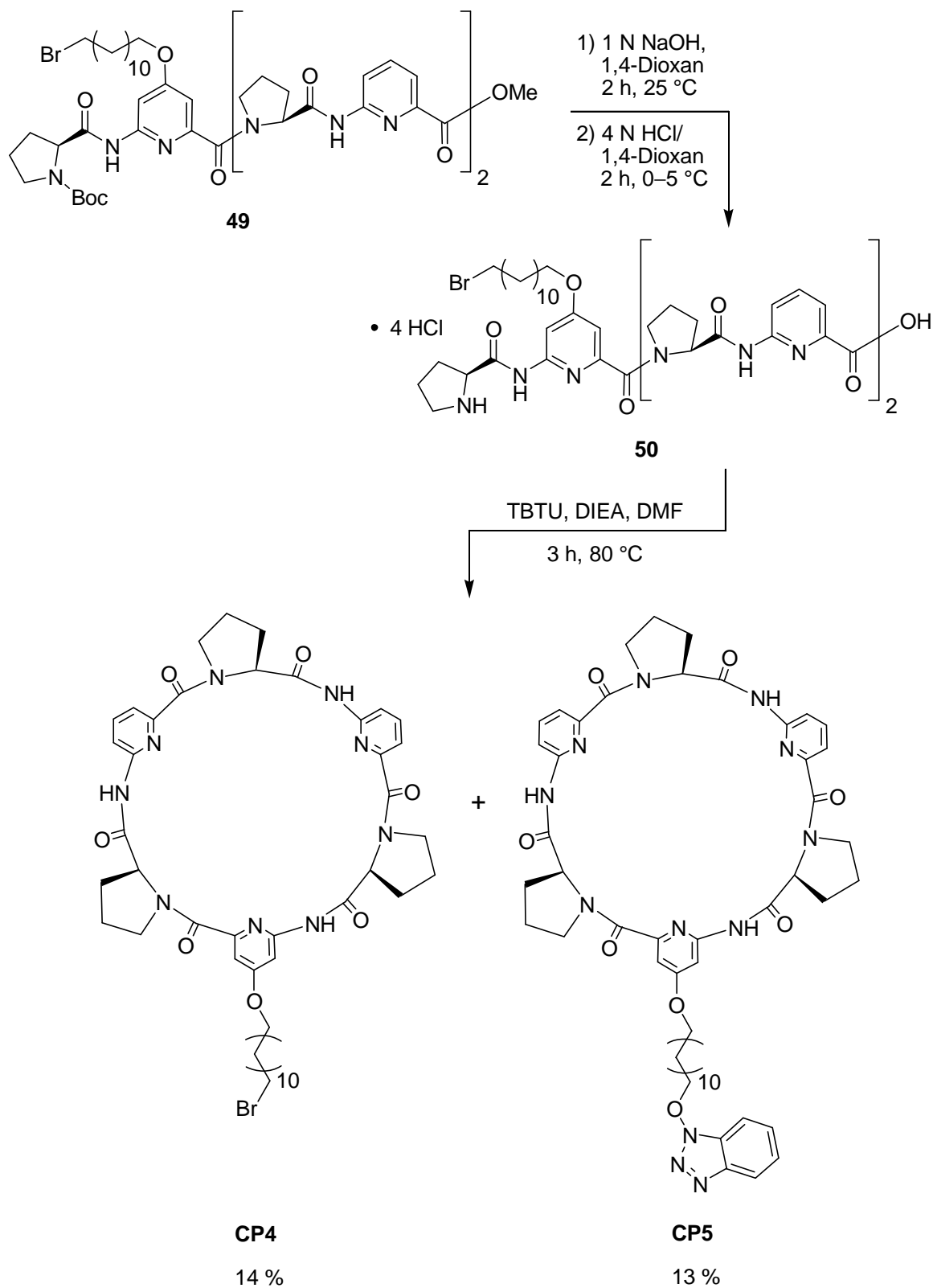
Ein Äquivalent von **43** wurde unter üblichen Bedingungen zu dem *N*-terminal entschützten Dipeptid **44** und ein weiteres Äquivalent zu dem Dipeptid **45** entschützt (Schema 22). Die teilgeschützten Dipeptide **44** und **45** wurden dann in sehr guter Ausbeute zu dem Tetrapeptid **46** gekuppelt.^[81] Dieses wurde daraufhin am *N*-Terminus zu **47** entschützt und mit dem am *C*-Terminus entschützten Dipeptid **48** mit TBTU als Kupplungsreagenz in 81 % Ausbeute zu dem linearen Hexapeptid **49** kettenverlängert.^[81]



Schema 22 Synthese des Tetrapeptids **46** und linearen Hexapeptids **49**.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

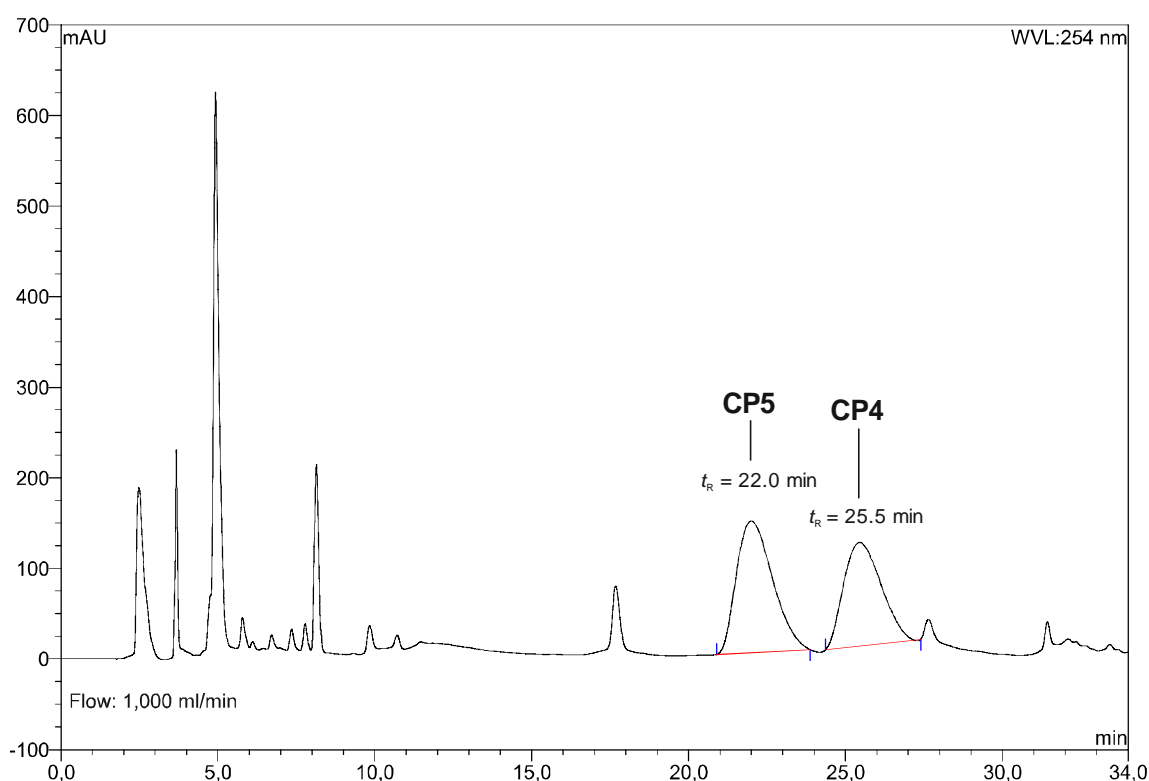
Nun wurde das lineare Hexapeptid **49** am *N*- und *C*-Terminus zu **50** entschützt und unter üblichen Bedingungen mit TBTU cyclisiert (Schema 23).



Schema 23 Cyclisierung von **49**.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

Während der Aufarbeitung der Reaktionsmischung mittels präparativer HPLC stellte sich heraus, dass neben dem gewünschten **CP4** noch ein Nebenprodukt in gleicher Menge entsteht (Abbildung 32). Dieses konnte nach Isolation und massenspektrometrischer sowie ¹H-NMR-spektroskopischer Charakterisierung als **CP5** identifiziert werden. Die Entstehung dieses Produkts ist auf die Substitution des Bromids in der Seitenkette von **CP4** durch Benzotriazol zurückzuführen, welches während der Cyclisierung als Abbauprodukt aus dem Kupplungsreagenz TBTU entsteht.



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel. Area %	Amount	Type
1	22,01		145,223	194,111	55,20		
2	25,46		114,153	157,550	44,80		
Total:			259,375	351,660	100,00		

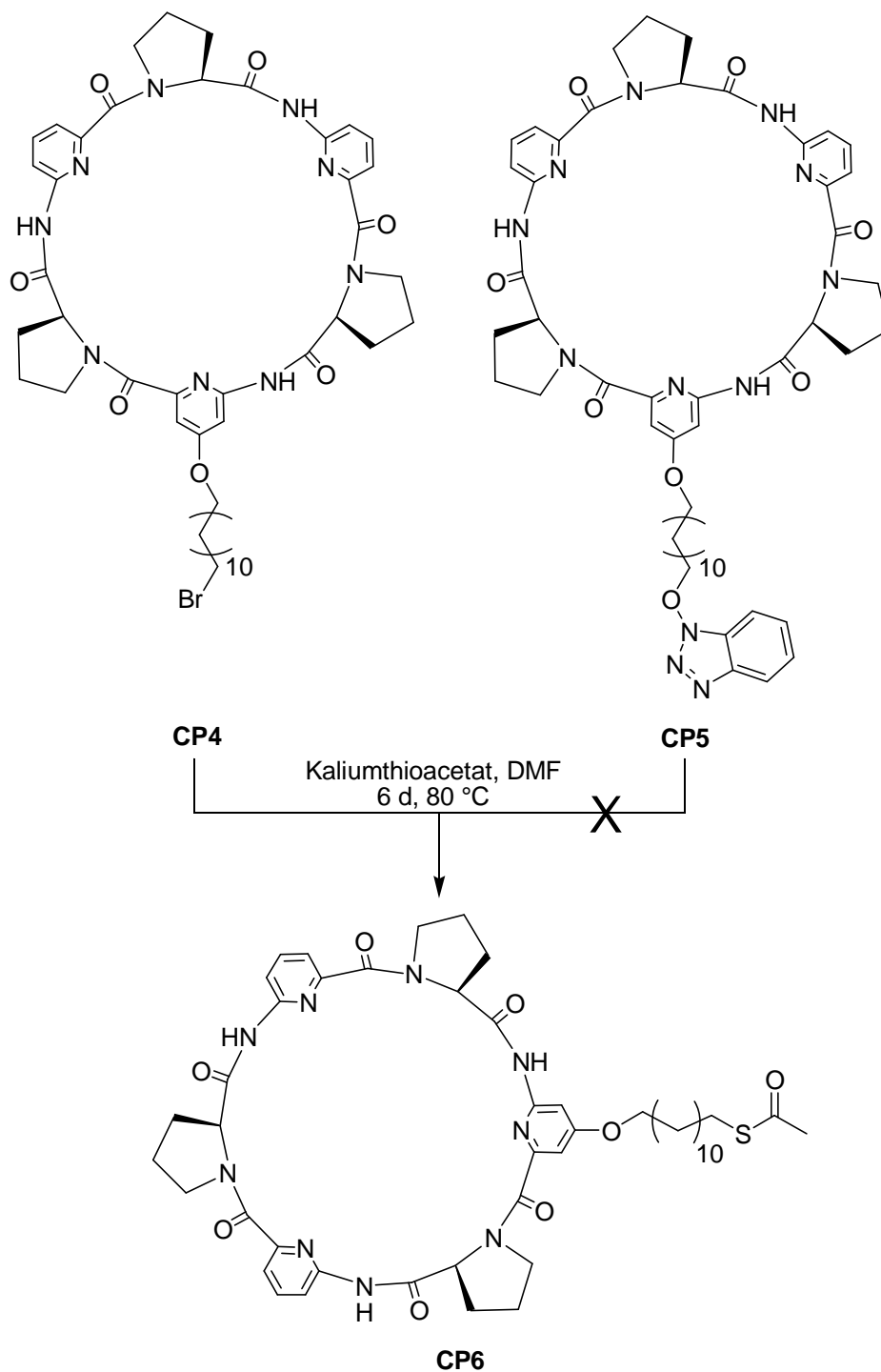
Abbildung 32 HPLC-Chromatogramm (analytisch) der bei der Cyclisierung von **50** erhaltenen Reaktionsmischung.

Bei Durchführung der Cyclisierung bei 25 °C anstelle von 80 °C wurde nach 11 d Reaktionszeit ebenfalls eine Mischung von **CP4** und **CP5** isoliert, allerdings in einem Verhältnis von 2:1 zugunsten des gewünschten Bromids. Die Gesamtausbeute dieser Cyclisierung betrug jedoch nur 9 %, wahrscheinlich weil das Edukt bei 25 °C in geringerem

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

Umfang Konformationen annimmt, die zum Makrocyclus führen und sich dadurch vermehrt länger-kettige Oligomere und Polymere bilden. Damit stellt die Reduktion der Reaktionstemperatur kein praktisches Verfahren zur Synthese von **CP4** dar.

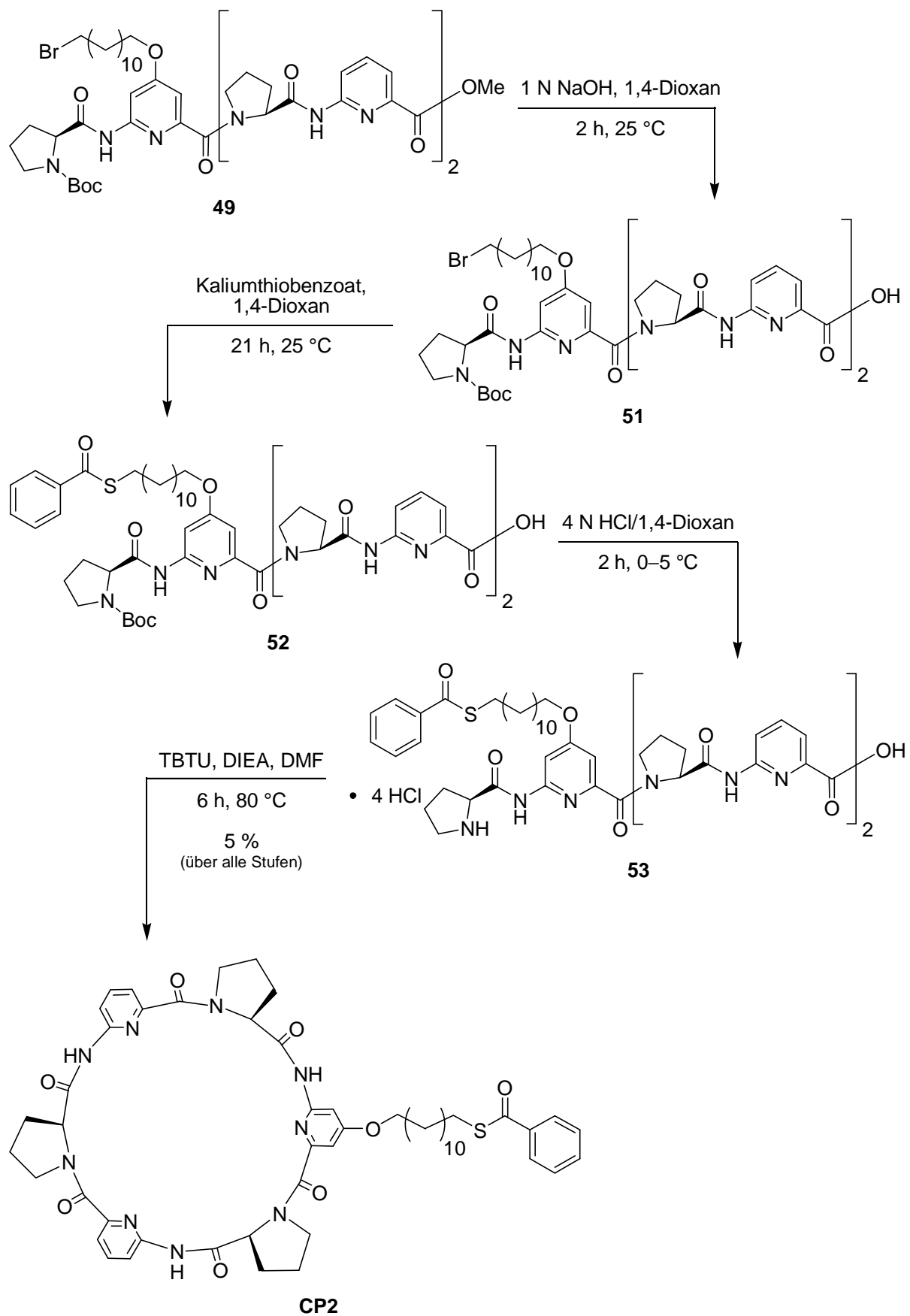
Es wurde daraufhin versucht, **CP4** und **CP5** durch Reaktion mit Kaliumthioacetat in das gewünschte Produkt **CP6** zu überführen (Schema 24).



Schema 24 Testreaktionen zur Substitution von **CP4** und **CP5** zu **CP6**.

Hierbei wurde gefunden, dass aus **CP4** das gewünschte Produkt wie erwartet entsteht, eine Überführung von **CP5** in **CP6** unter diesen Bedingungen aber nicht möglich ist. Um die unerwünschte Bildung von **CP5** zu umgehen, wurde darum die Reihenfolge der Schritte von dem Hexapeptid **49** zum Produkt **CP2** geändert. Gemäß Schema 25 wurde **49** zunächst unter Standardbedingungen am C-Terminus verseift. Das Produkt wurde anschließend mit Kaliumthiobenzoat unter Bildung von **52** umgesetzt. Dieses wurde im Sauren am N-Terminus entschützt und das so gebildete Hexapeptid **53** unter etablierten Bedingungen cyclisiert. Auf diese Weise war es möglich, das gewünschte **CP2** analysenrein in 5 % Ausbeute über alle Stufen ausgehend von **49** zu erhalten. Die Ausbeute ist nicht zufriedenstellend, es muss jedoch bedacht werden, dass der Substitutionsschritt ebenfalls einen Einfluss auf die Gesamtausbeute hat.

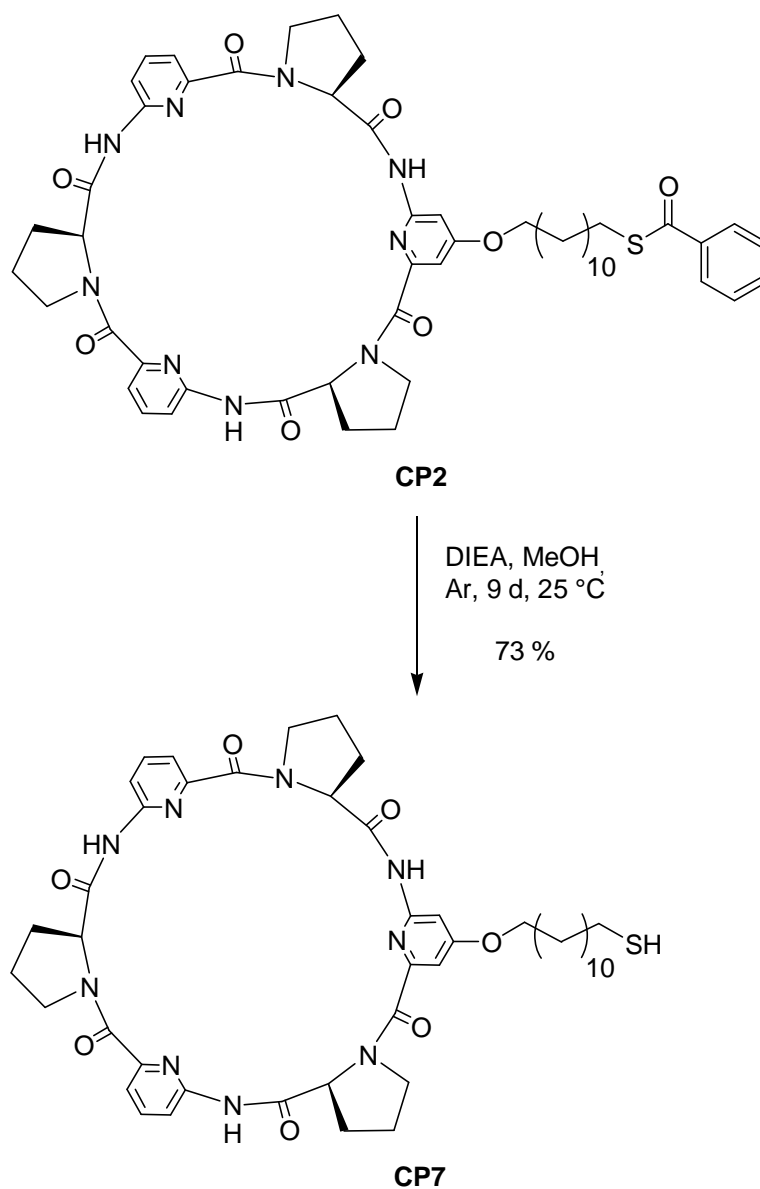
3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD



Schema 25 Synthese von CP2.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

CP2 wurde im letzten Schritt unter wasserfreien, basischen Bedingungen gemäß Schema 26 unter Argonatmosphäre zu dem freien Thiol entschützt, welches bei der Aufarbeitung an der Luft direkt zu dem Dimer **(CP7)₂** oxidierte (Abbildung 33).



Schema 26 Entschützung von CP2 zu dem freien Thiol CP7.

Auf diese Weise wurde **(CP7)₂** in Mengen erhalten, die für die von unserem Kooperationspartner geplanten Untersuchungen ausreichen. Das Material wurde nach Polen geschickt. Ergebnisse zur Immobilisierung von **(CP7)₂** auf Au-Elektroden und deren Eigenschaften stehen noch aus.

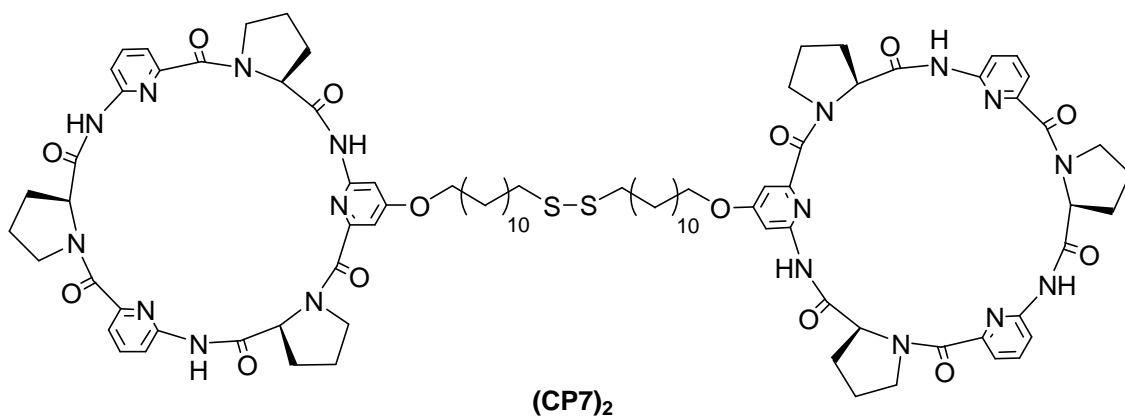
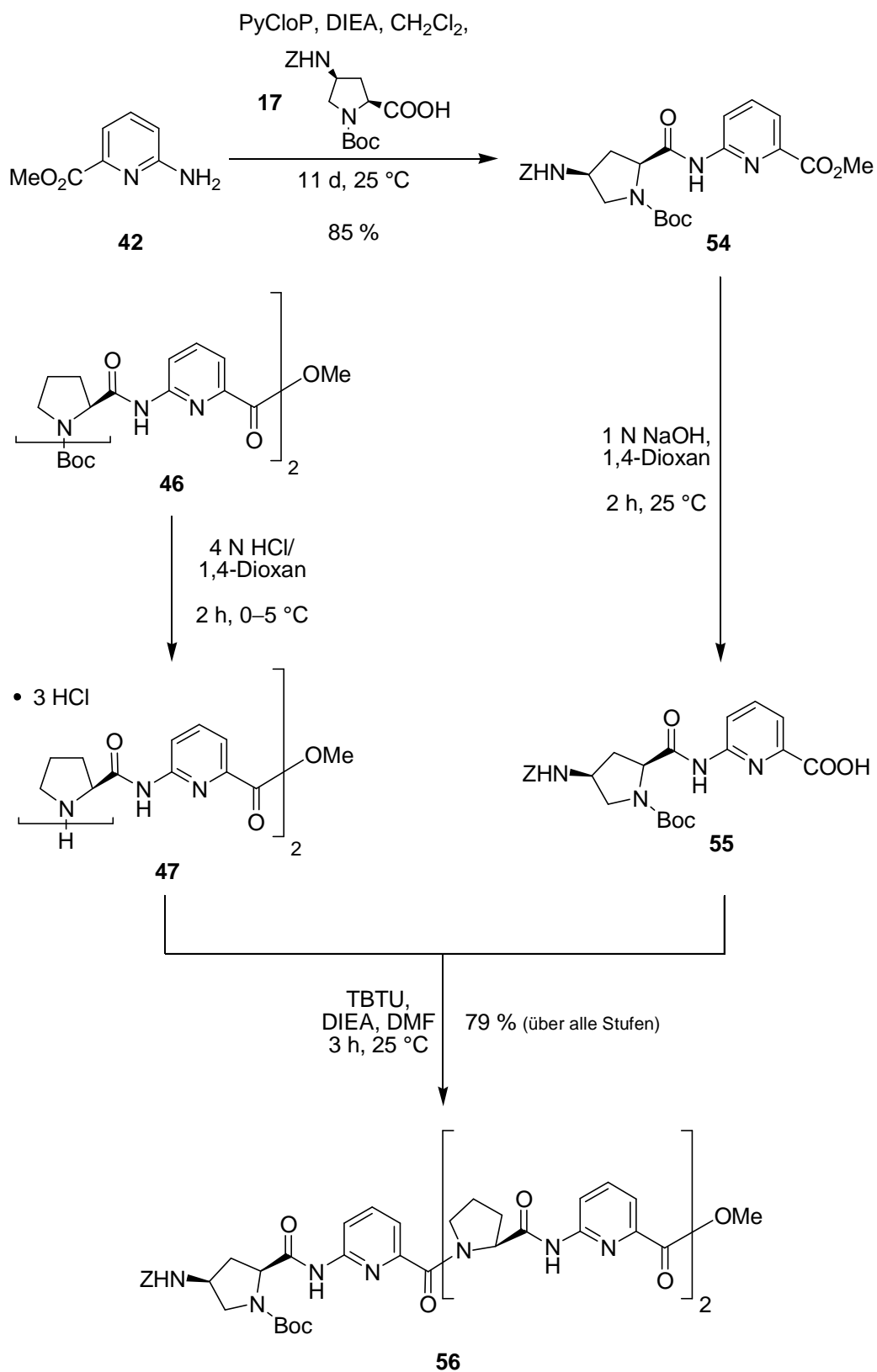


Abbildung 33 Disulfid (CP7)₂ nach Oxidation von CP7.

3.3.3 Synthese von CP3

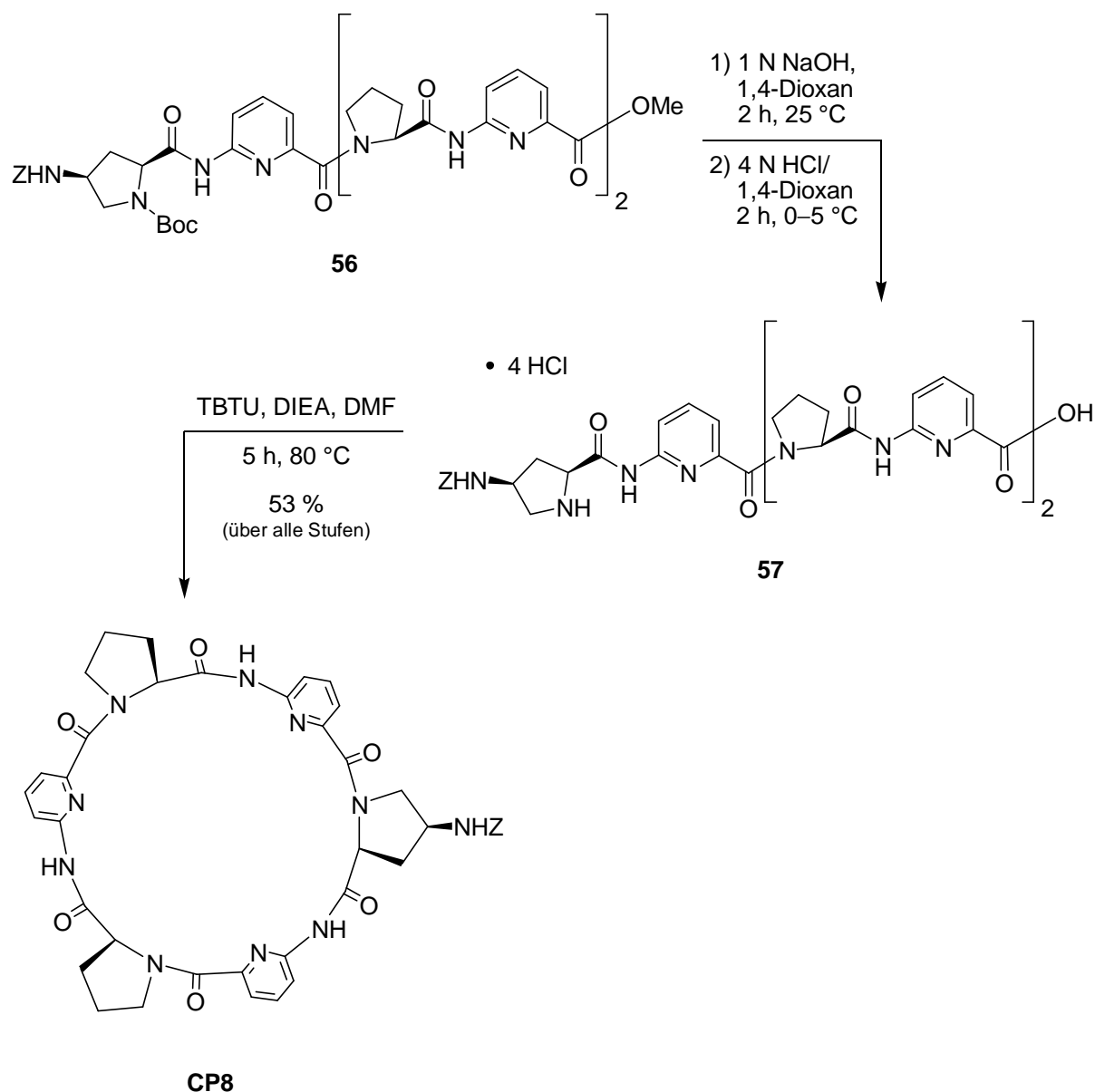
Um das Ausgangsmaterial für die Synthese von **CP3** zu erhalten, konnte auf eine etablierte Syntheseroute zurückgegriffen werden.^[81] Hierzu wurde zunächst **42** (Kapitel 3.3.2) mit dem Prolinderivat **17** und PyCloP als Kupplungsreagenz zu dem Dipeptid **54** in guter Ausbeute umgesetzt (Schema 27). Das Produkt wurde am C-Terminus entschützt und mit am N-Terminus entschützten **47** (Kapitel 3.3.2) zum linearen Hexapeptid **56** in 79 % Ausbeute umgesetzt.



Schema 27 Synthese des linearen Hexapeptids **56**.

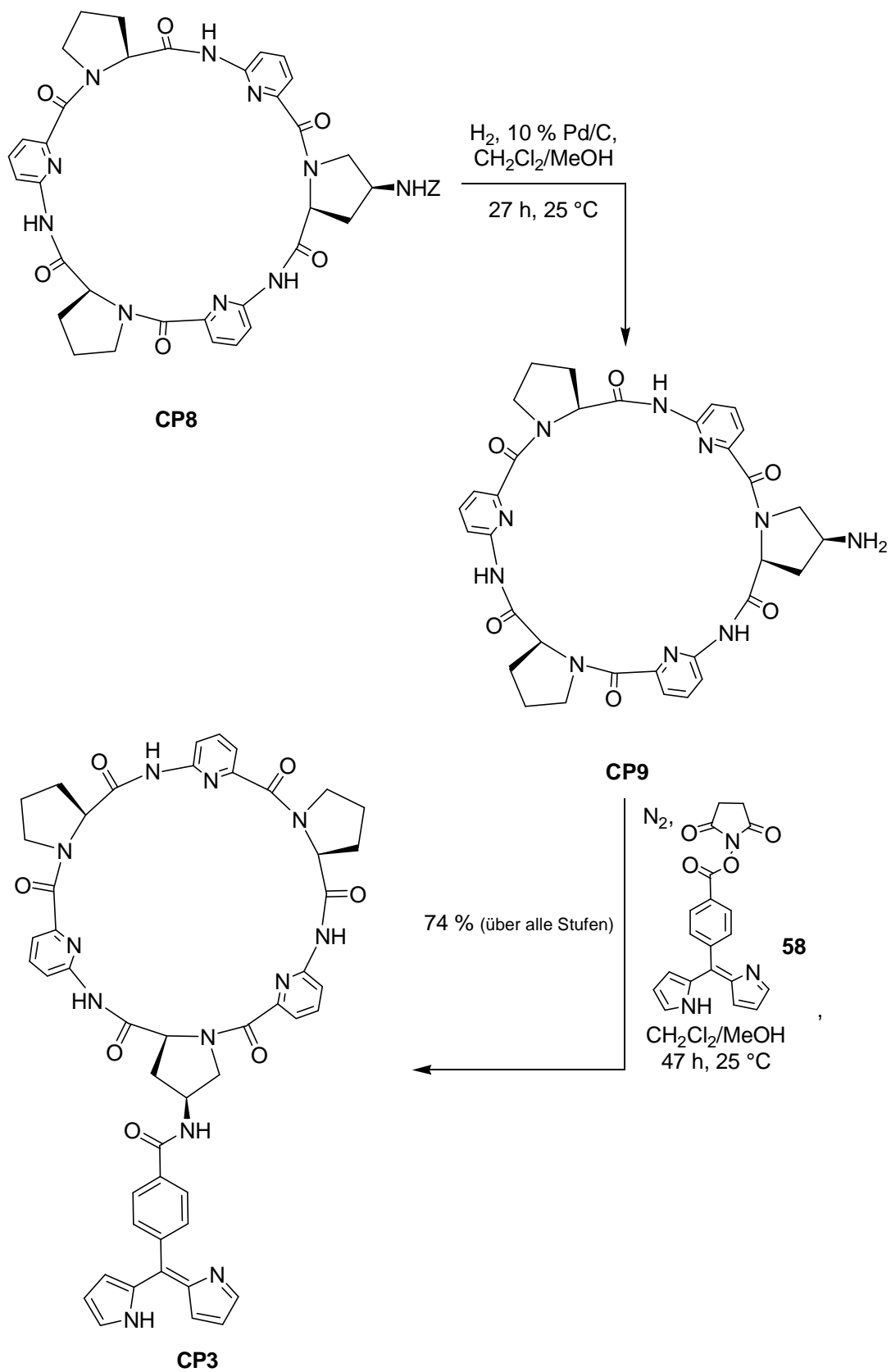
3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

Anschließend wurde **56** nach Standardbedingungen zuerst am C-Terminus und dann am N-Terminus entschützt und unter üblichen Bedingungen in einer vergleichsweise hohen Ausbeute von 53 % zu **CP8** cyclisiert (Schema 28).



Schema 28 Cyclisierung von **56** zu **CP8**.

Nun wurde die Schutzgruppe am Aminoprolinbaustein von **CP8** entfernt (Schema 29). Hierbei erwies es sich als vorteilhaft, auf die sonst übliche Zugabe von 1 N Salzsäure zu verzichten, um das CP als Amin und nicht als Hydrochlorid zu erhalten, wodurch es ohne Basenzugabe mit dem Aktivester **58** weiter umgesetzt werden konnte. Diese Kupplung zu **CP3** wurde unter inerten Bedingungen in guter Ausbeute realisiert.



Schema 29 Synthese von CP3.

Das isolierte Material wurde zu den Kooperationspartnern in Polen gesendet. Auch bei diesem Projekt stehen die Ergebnisse bezüglich der Eigenschaften der modifizierten Au-Elektroden noch aus.

Diskussion

Die Synthese des aromatischen Grundbausteins **35** zur Darstellung von **CP2** gelang nicht, da die Carbonsäure **34** nicht erfolgreich in das geschützte Amin **35** überführt werden konnte. Zwei übliche Methoden für diese Transformation lieferten kein oder nur verunreinigtes Produkt. Dies lag möglicherweise an der Umsetzung von **33** zur freien Carbonsäure **34**, welche kein sauberes Produkt lieferte. Der Austausch der Allyl- gegen Ethylestergruppen führte nicht nur zu einer deutlichen Ausbeuteerhöhung im Schritt zur Carbonsäure **37**, auch die darauffolgende Curtius-Umlagerung zu **38** bzw. **39** verlief nun unproblematisch. Verbindung **39** konnte problemlos im weiteren Verlauf zu dem Dipeptid **40** und weiter zum linearen Hexapeptid **49** verlängert werden. Unter üblichen Bedingungen wurde während der Cyclisierung von **50** das Nebenprodukt **CP5** erhalten, dessen Bildung auch durch Variation der Reaktionsbedingungen nicht komplett unterdrückt werden konnte. Dieses Nebenprodukt konnte nicht weiterverwendet werden. Daher wurde die Reihenfolge der Schritte angepasst und der Thiobenzoatrest bereits vor der Cyclisierung eingeführt. Auf diese Weise war es möglich, **CP2** in ausreichender Menge darzustellen und den Kooperationspartnern nach standardmäßiger Entschützung das Disulfid (**CP7**)₂ zur Verfügung zu stellen.

Die Kupplung des **CP8** mit dem Dipyrromethenderivat **58** gestaltete sich zunächst schwierig. Bei Verwendung des Hydrochlorids statt des freienamins **CP9** konnte massenspektrometrisch die Bildung von **CP3** zwar nachgewiesen werden, jedoch gelang eine Isolation des Produkts nicht. Durch Verwendung des freienamins **CP9** konnte die Bildung von **CP3** ebenfalls massenspektrometrisch beobachtet werden, allerdings konnte in diesem Fall mittels üblicher Aufreinigungsmethoden kein sauberes Produkt isoliert werden. Eine Aufreinigung mittels HPLC gelingt beispielsweise nicht, möglicherweise wegen des wässrigen Lösungsmittelgemischs, das für die Trennung notwendig ist aber zur Zersetzung von **CP3** führt. Versuche das Produkt aus einem Lösungsmittel auszufällen, lieferte ebenfalls kein sauberes Produkt. Erst durch die Verwendung von normaler Säulenchromatographie auf Kieselgel mit einem Gemisch organischer Lösungsmittel als Elutionsmittel unter Zusatz einer Base konnte **CP3** in zufriedenstellender Reinheit erhalten werden.

3.4 Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit sollten die beiden Cyclopeptidderivate **CP2** und **CP3** dargestellt werden und Kooperationspartnern für die Entwicklung anionenselektiver Elektroden zur Verfügung gestellt werden.

Die für die Synthese von **CP2** benötigte aromatische Aminosäure konnte erfolgreich dargestellt werden wenn als Schutzgruppe für die Carboxylatfunktion ein Ethylester verwendet wurde. Ausgehend von diesem Baustein konnte das benötigte Dipeptid problemlos erhalten werden und auch die Kettenverlängerung zum linearen Hexapeptid verlief gemäß in der Gruppe üblichen Protokollen in üblichen Ausbeuten. Für die Cyclisierung zum Produkt erwies es sich als vorteilhaft, wenn die Thiobenzoatgruppe vor der Cyclisierung eingeführt wird. Ausgehend von **CP2** wurde das entschützte Thiol **CP7** bzw. das Disulfid (**CP7**)₂ erhalten und unseren Kooperationspartnern für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

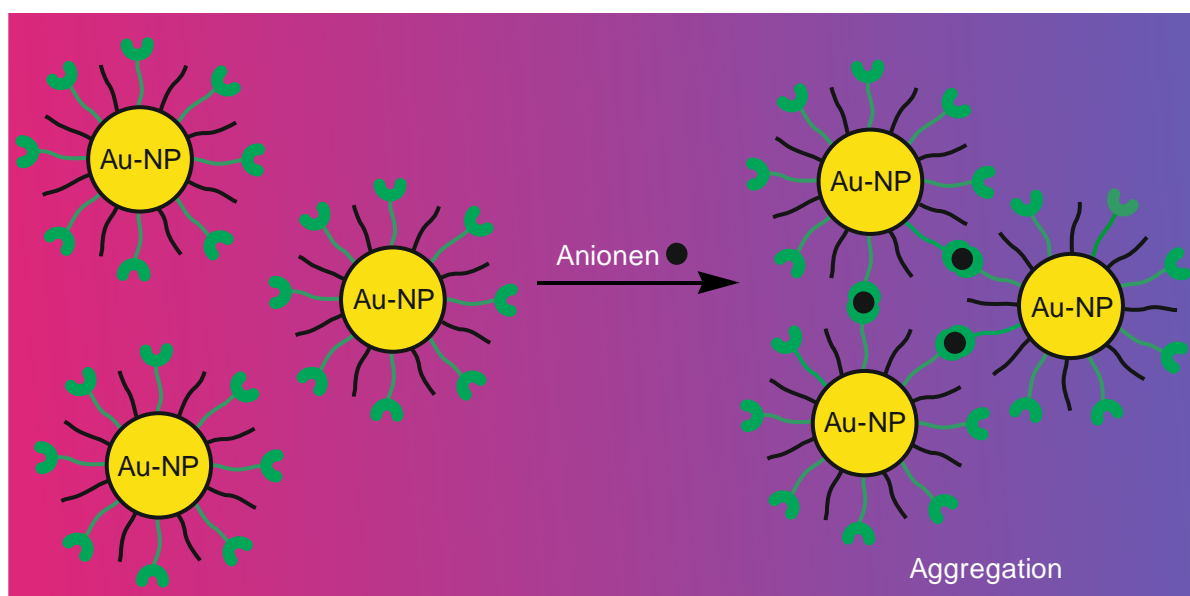
Für die Synthese von **CP3** wurde das bekannte **CP8** nach Entschützen mit dem von Wim Dehaen zur Verfügung gestellten Aktivester **58** in guter Ausbeute zu dem gewünschten **CP3** umgesetzt. Eine Probe wurde zu den Kooperationspartnern gesendet. Die Ergebnisse zur Immobilisierung der beiden CPs auf den Au-Elektroden und zur Charakterisierung ihrer Eigenschaften stehen noch aus.

Teil B: Modifikation von Au-NPs mit CPs zur Entwicklung optischer Sonden

3.5 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieses Vorhabens sollten Vorarbeiten in einem von der DFG geförderten Projekt geleistet werden. Ziel des Projekts ist es, eine optische Sonde zu entwickeln, mit der Anionen in wässrigen Medien detektiert werden können, wobei als Grundlage oberflächenmodifizierte Au-NPs dienen sollen, die CPs als anionenerkennende Komponenten enthalten. Das Konzept basiert auf der Eigenschaft der Au-NPs, je nach Größe eine charakteristische Farbe zu besitzen. Oberflächengebundene CPs, die mit Anionen Sandwich-artige 2:1-Komplexe bilden, sollen eine anioneninduzierte Aggregation der Au-NPs bewirken. Dieses Prinzip ist in Schema 30 gezeigt. Werden oberflächenmodifizierte Au-NPs geeigneter Größe verwendet, kann auf diese Weise ein Farbumschlag einer Lösung von rötlich nach blau erwartet werden. Die Anionenaffinität dieses Systems profitiert dabei von der Eigenschaft der CPs, Anionen in wässriger Lösung erkennen zu können und von multivalenten Effekten.^[21,24,77,88,89]

Neben den cyclopeptidhaltigen Liganden sollen inerte Liganden auf der Au-Oberfläche immobilisiert werden, welche die Wasserlöslichkeit der Au-NP gewährleisten und als Abstandhalter zwischen den CPs dienen sollen. Dadurch wird sichergestellt, dass die auf einem einzigen Au-NP immobilisierten CPs nicht miteinander wechselwirken können.



Schema 30 Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Au-NP-basierten Anionensonden. Schwarze Linie = solubilisierender Ligand; schwarzer Punkt = Anion; grüne Schale = CP.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

In meinem Beitrag zu diesem Projekt sollten Methoden zum Aufbau der benötigten CPs erarbeitet werden, wobei die Synthesen möglichst modular sein sollten, um strukturelle Variationen einfach durchführen zu können. Diese Cyclopeptidderivate bestehen aus dem eigentlichen Cyclopeptidring als erkennendes Element, einer Alkylkette variabler Länge und einer in dieser Kette endständig angeordneten Thiolgruppe, die für die Immobilisierung der CPs auf der Nanopartikeloberfläche dient. Die beiden Zielverbindungen **CP12** und **CP13** sind in Abbildung 34 gezeigt. Sie unterscheiden sich in der Position, in der der thiolhaltige Substituent mit dem CP verbunden ist. In **CP12** befindet sich der Substituent an einer aromatischen Einheit des Rings und in **CP13** an einer Prolineinheit. **CP12** und **CP13** sollen durch Kupplung von 8-S-(Acetyl)-thiooctansäure mit einem geeignet funktionalisierten Cyclopeptidderivat dargestellt werden. Entsprechend standen die Synthesen der jeweiligen Z-geschützten Cyclopeptidderivate **CP10** und **CP11** zunächst im Fokus der Arbeit.

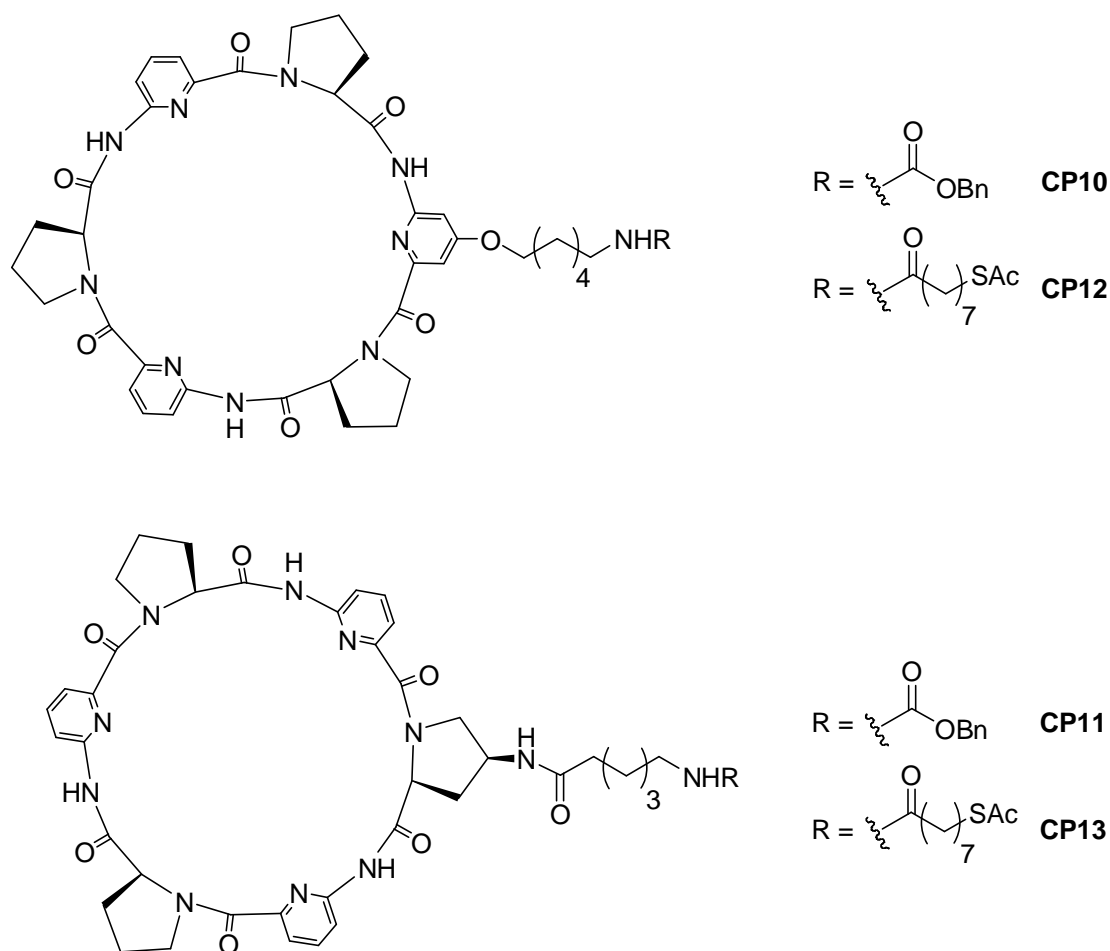


Abbildung 34 Strukturen der Verbindungen **CP10**, **CP11**, **CP12** und **CP13**.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

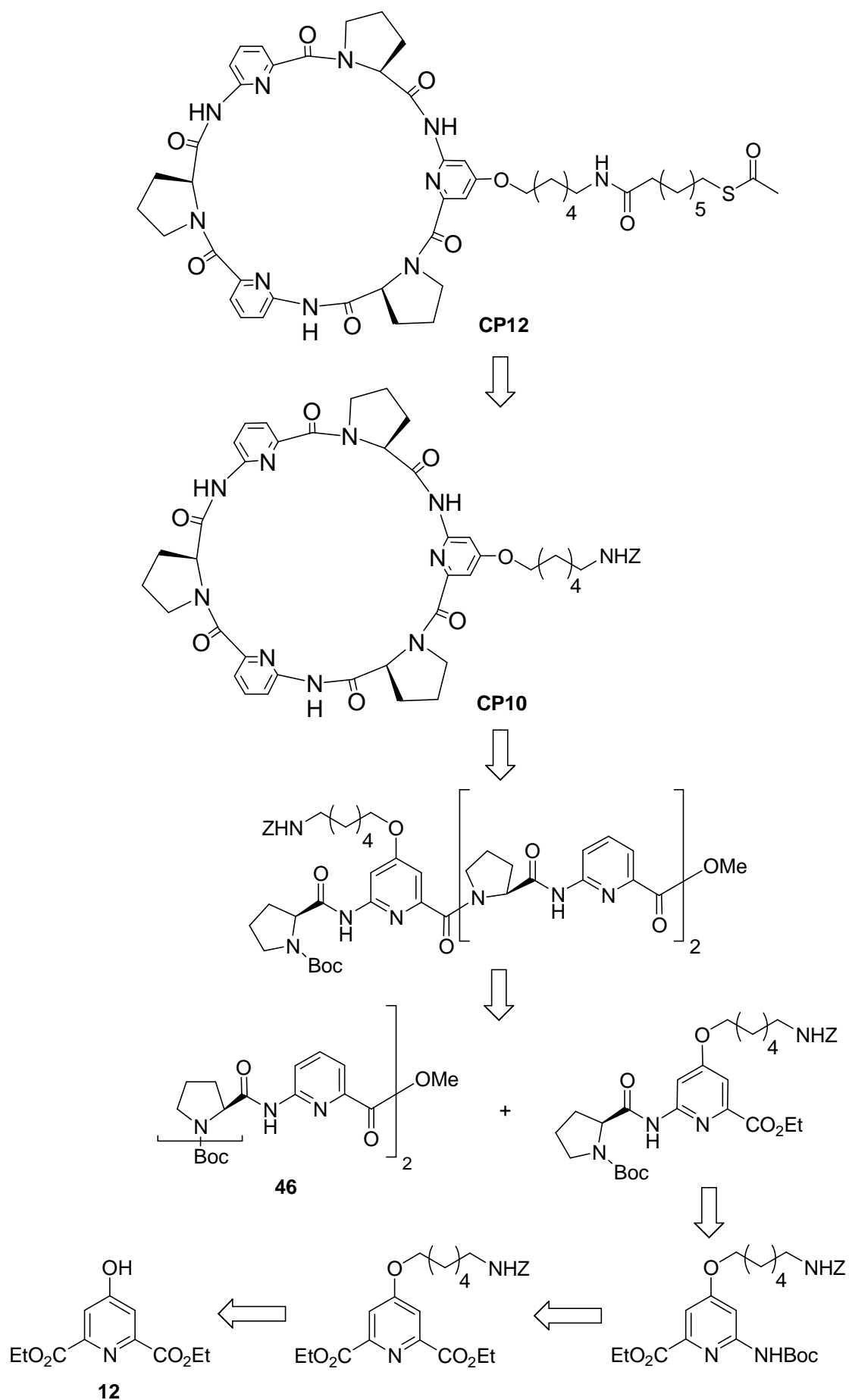
Neben der Darstellung dieser CPs sollten auch erste Synthesen der oberflächenmodifizierten Au-NPs durchgeführt werden. Diese Partikel sollten idealerweise Durchmesser im Bereich von 10–20 nm besitzen, da diese typischerweise eine intensiv rötliche Färbung aufweisen. Dadurch sollte die anioneninduzierte Au-NP-Aggregation einen Farbumschlag von rot nach blau verursachen, der leicht mit bloßem Auge erkennbar sein sollte.

3.6 Ergebnisse und Diskussion

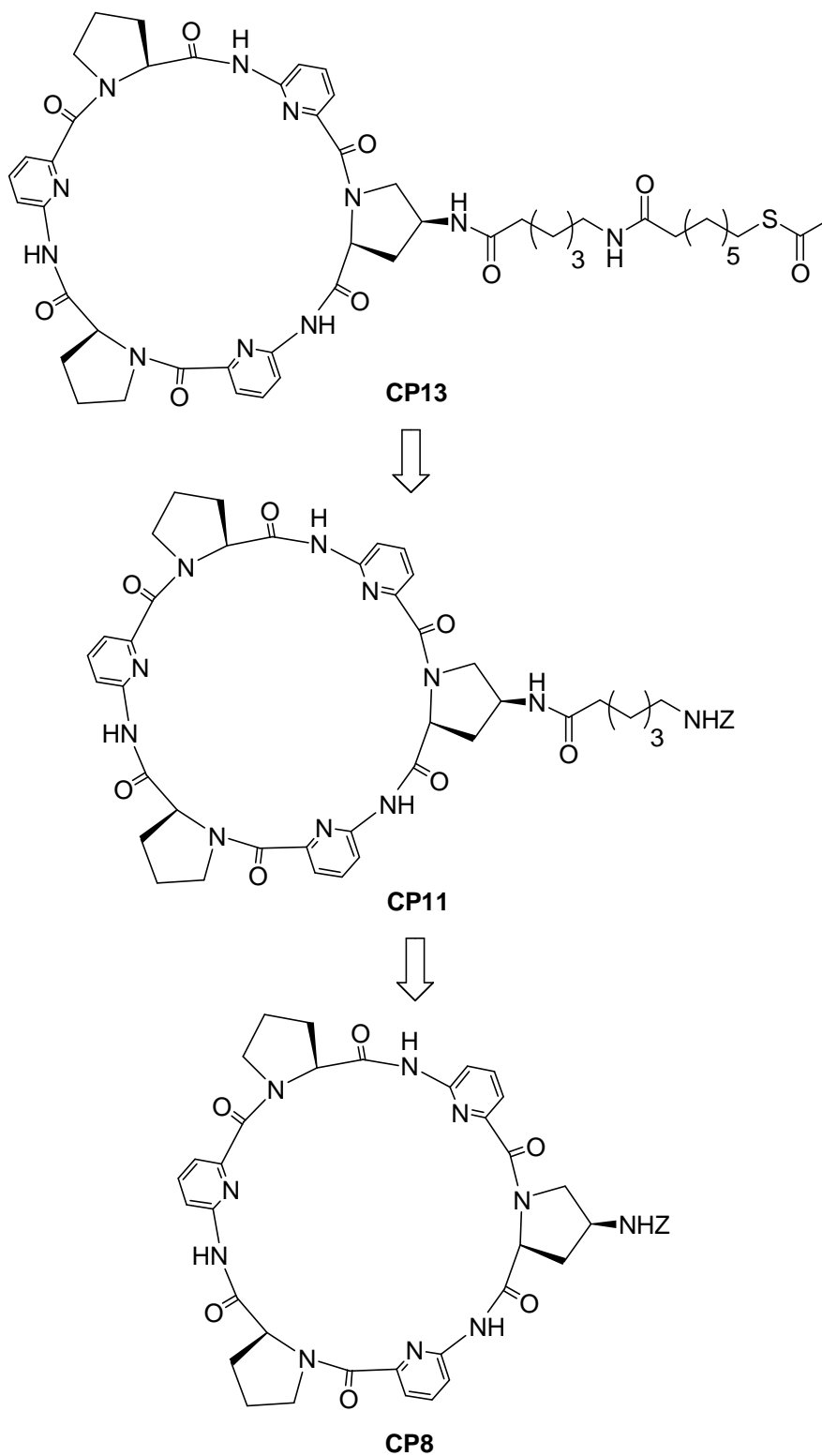
3.6.1 Syntheseplanungen

Die retrosynthetische Analyse von **CP12** ist in Schema 31 gezeigt. Das Zielprodukt **CP12** sollte durch Kupplung der Aminofunktion von **CP10** mit 8-*S*-(Acetyl)-thiooctansäure erhalten werden. Dieses CP sollte durch Cyclisierung des zugrundeliegenden Hexapeptids dargestellt werden, welches aus dem bereits beschriebenen Tetrapeptid **46** (Kapitel 3.3.2) und einem in 4-Position der aromatischen Einheit mit 6-*Z*-Aminohexanol substituierten Dipeptid aufgebaut ist. Das Dipeptid sollte durch Kupplung von Boc-*L*-Prolin und dem in 4-Position substituierten 6-Aminopicolinsäurederivat unter üblichen Methoden erhalten werden. An dieser Stelle ist die Kombination von Ethylester-, Boc- und *Z*-Schutzgruppen im Molekül wichtig, da diese Gruppen jeweils selektiv unter verschiedenen Bedingungen gespalten werden können. Der Pyridinbaustein sollte durch selektive Überführung einer Ethylestergruppe des zugrundeliegenden Diesters in das Amin erhalten werden. Der in 4-Position substituierte aromatische Diester sollte durch Einführung von 6-*Z*-Aminohexanol in den bereits in verschiedenen Synthesen verwendete Diethylester der Chelidamsäure **12** (Kapitel 2.2.2, Kapitel 3.3.2) dargestellt werden.

Um **CP11** darzustellen, sollte auf das bereits beschriebene **CP8** (Kapitel 3.3.3) als Grundgerüst zurückgegriffen werden. Dieses sollte zunächst mit einem *Z*-geschützten Amin und anschließend mit der Thioleinheit gekuppelt werden, um zu dem gewünschten **CP13** zu gelangen (Schema 32).



Schema 31 Geplante Darstellung von CP12.

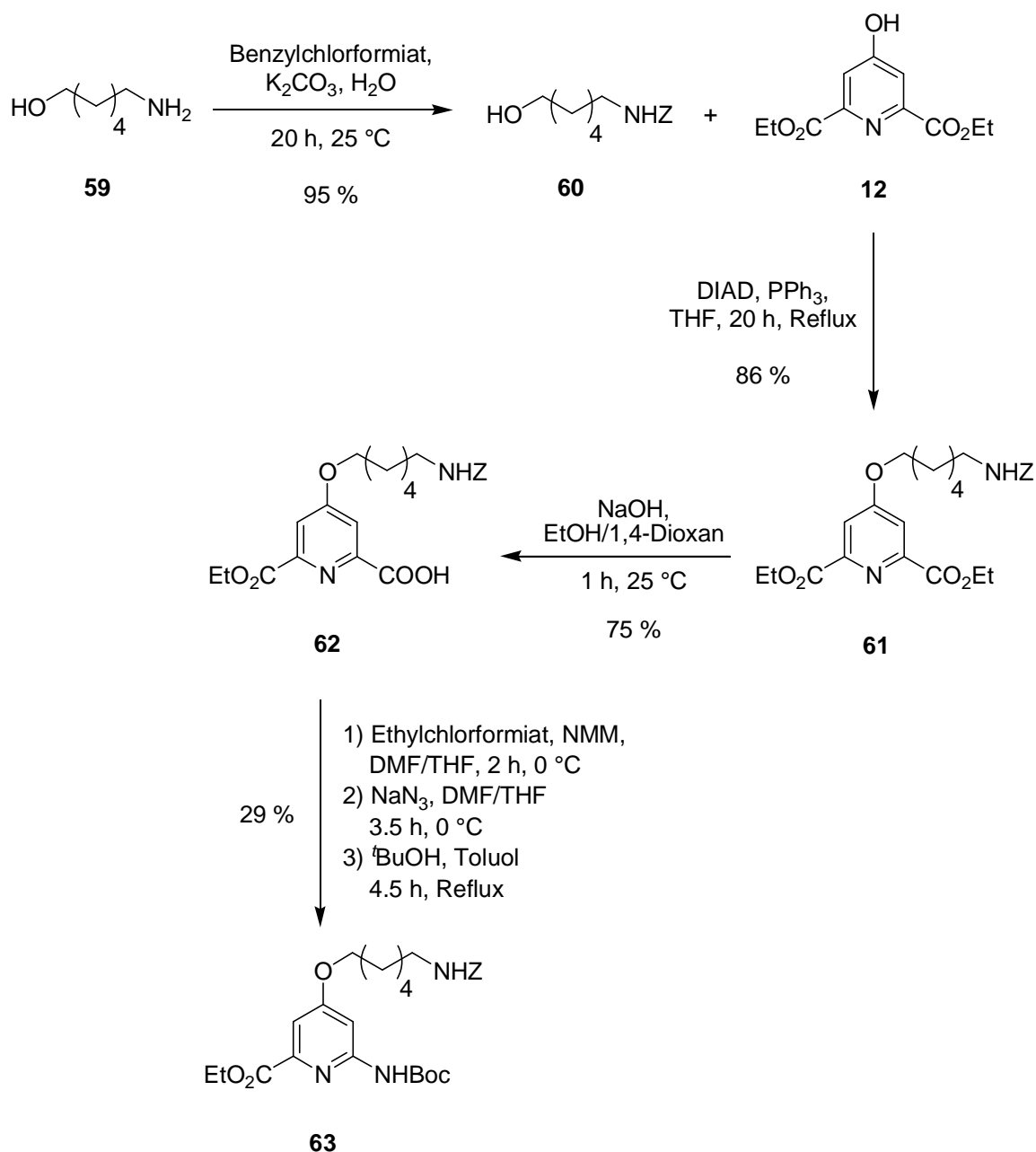


Schema 32 Geplante Darstellung von CP13.

3.6.2 Synthese von CP10

Für die Synthese von **CP10** wurde zunächst der geeignet funktionalisierte Pyridinbaustein **63** dargestellt (Schema 33).

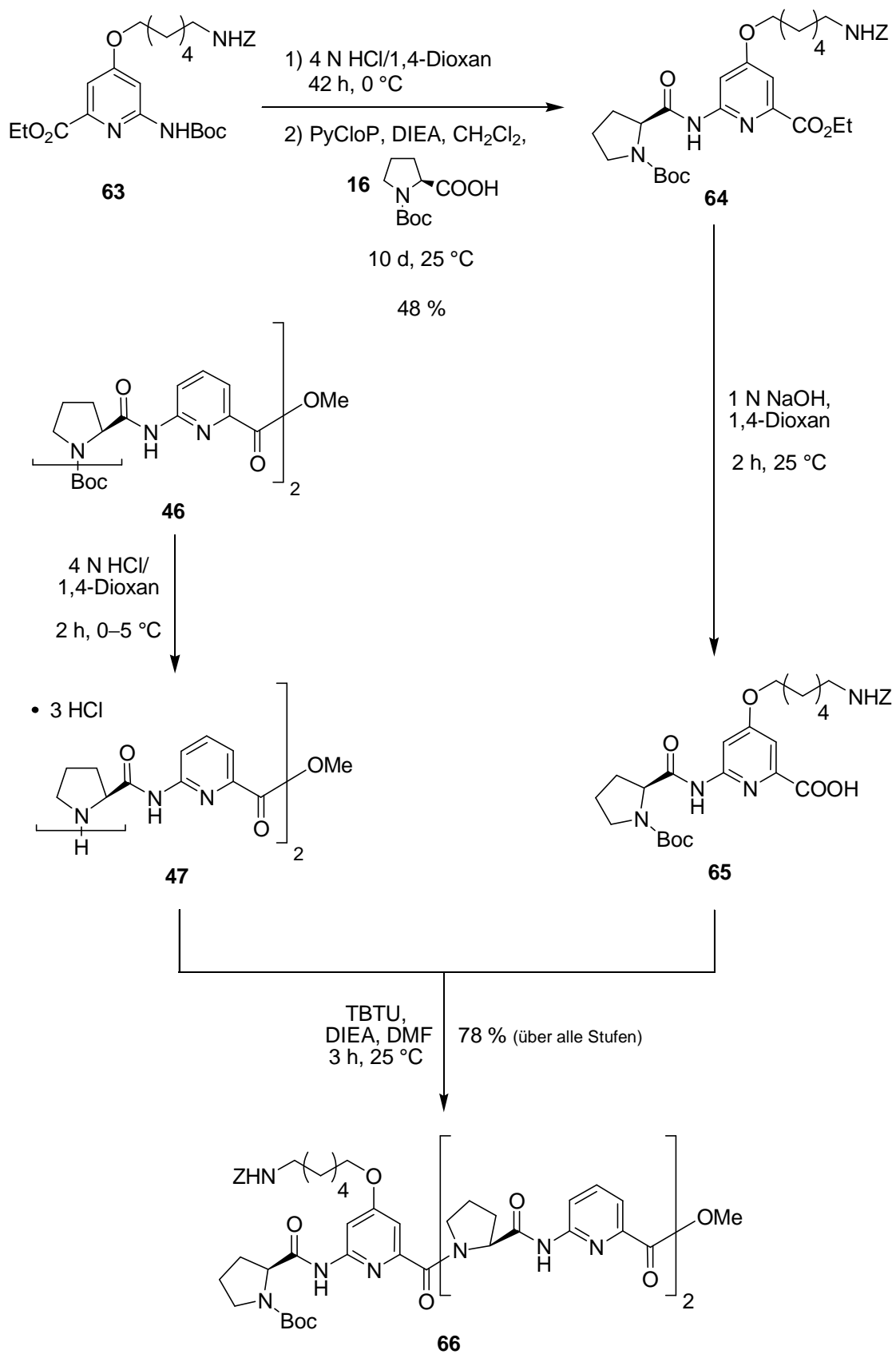
3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD



Schema 33 Darstellung des substituierten Pyridinbausteins 63.

Hierfür wurde 6-Aminoalkohol **59** mit Benzylchloroformiat Z-geschützt.^[90] Anschließend wurde **60** mit dem bereits beschriebenen Diethylester **12** (Kapitel 2.2.2) mittels einer Mitsunobu-Reaktion in 86 % Ausbeute verknüpft.^[33] Die anschließende einseitige Verseifung von **61** zu **62** gelang in 75 % Ausbeute.^[91] Der gewünschte Pyridinbaustein **63** konnte nach Umsetzung von **62** mit Ethylchloroformiat, Überführung in das Azid mit Natriumazid und Erhitzen in Anwesenheit von *tert*-Butanol mit 29 % Ausbeute erhalten werden.^[30,85]

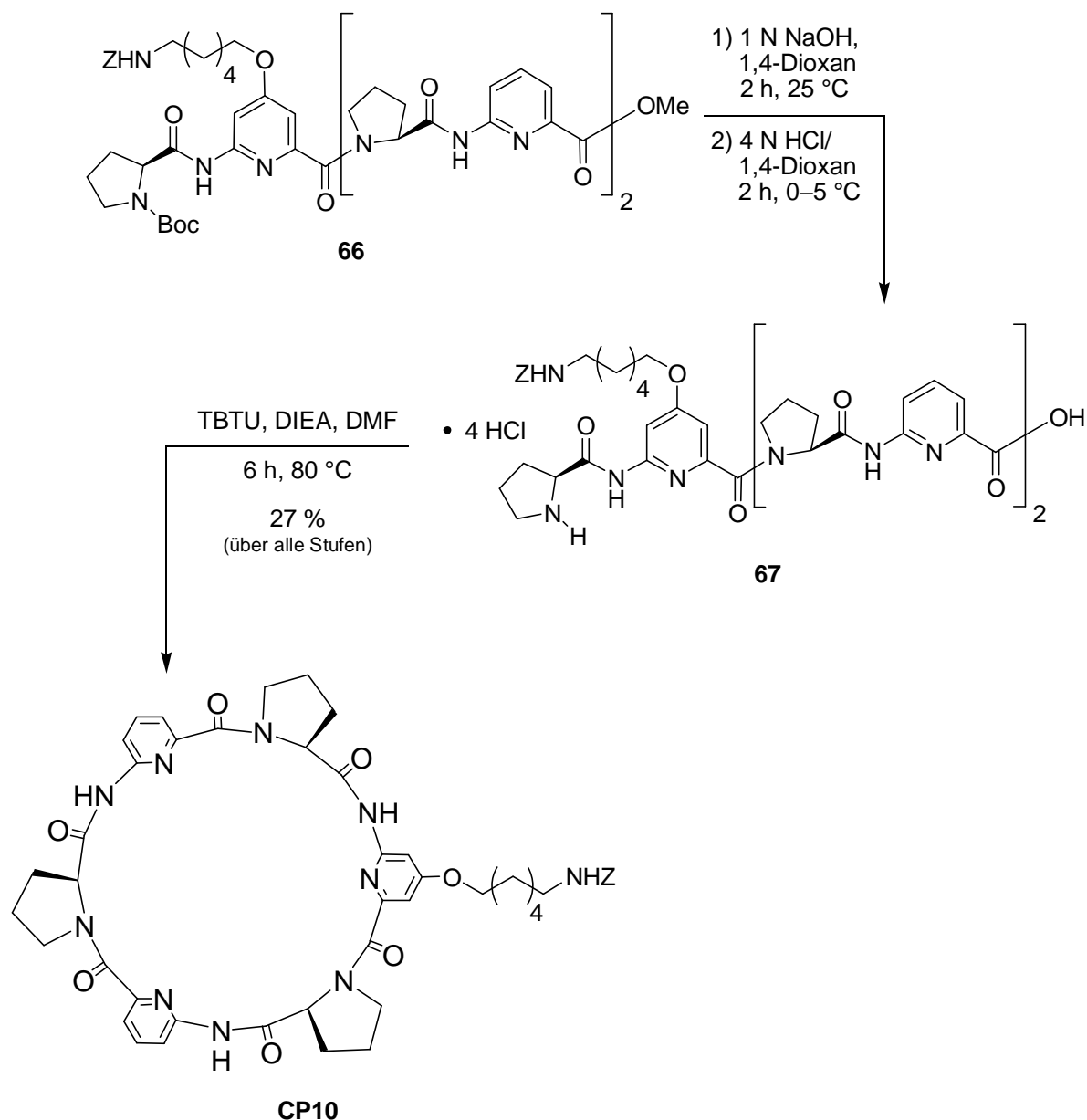
Im Folgenden wurde das Dipeptid **64** synthetisiert, indem **63** zunächst unter etablierten Bedingungen von der Boc-Schutzgruppe befreit wurde und anschließend mit **16** in Gegenwart von PyCloP gekuppelt wurde (Schema 34). Die niedrige erhaltene Ausbeute von 48 % ist unüblich für Kupplungsreaktionen dieser Art, die meist in guten bis sehr guten Ausbeuten verlaufen. Möglicherweise hängt sie mit der Entschützungsreaktion zusammen, welche mit 42 h eine ungewöhnlich lange Reaktionszeit aufweist, während der es möglicherweise zu einer teilweisen Zersetzung des Edukts kommt. Der weitere Reaktionsverlauf entspricht weitestgehend dem bereits beschriebenen Schema. Das Dipeptid **64** wurde am C-Terminus verseift und das Produkt **65** mit dem N-terminal entschützten Tetrapeptid **47** mit TBTU zu dem linearen Hexapeptid **66** in guter Ausbeute gekuppelt.



Schema 34 Synthese des linearen Hexapeptids **66**.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

Anschließend wurde **66** entsprechend Schema 35 nach beidseitiger Entschützung in insgesamt 27 % Ausbeute zu dem **CP10** cyclisiert.

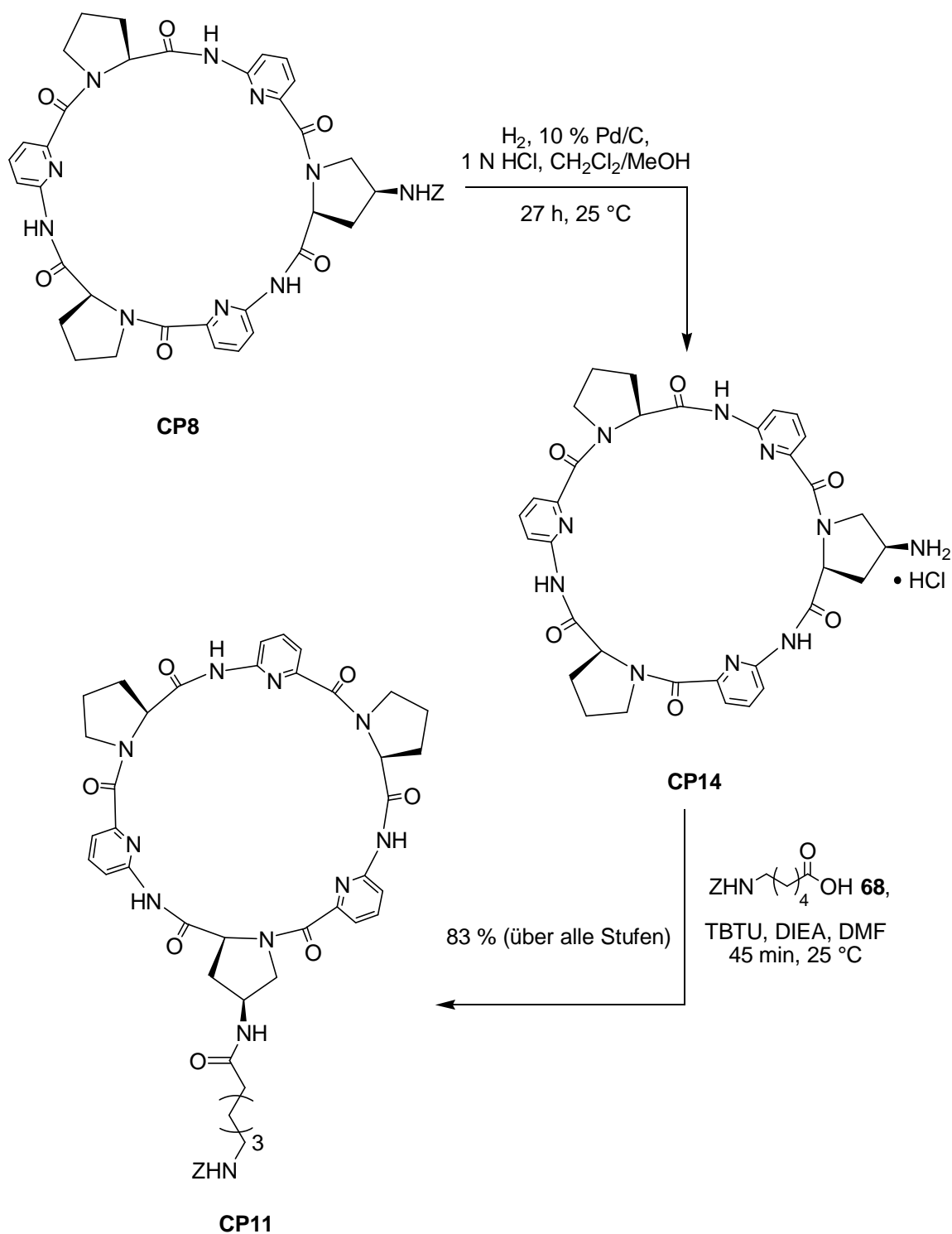


Schema 35 Cyclisierung von **66** zu **CP10**.

3.6.3 Synthese von **CP11**

Die Synthese von **CP11** ging von dem bereits dargestellten **CP8** aus (Kapitel 3.3.3). Dieses wurde zunächst entschützt und das Produkt mit kommerziell erhältlicher 6-Z-Aminohexansäure **68** in Gegenwart von TBTU in 83 % Ausbeute zu **CP11** gekuppelt (Schema 36).

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD



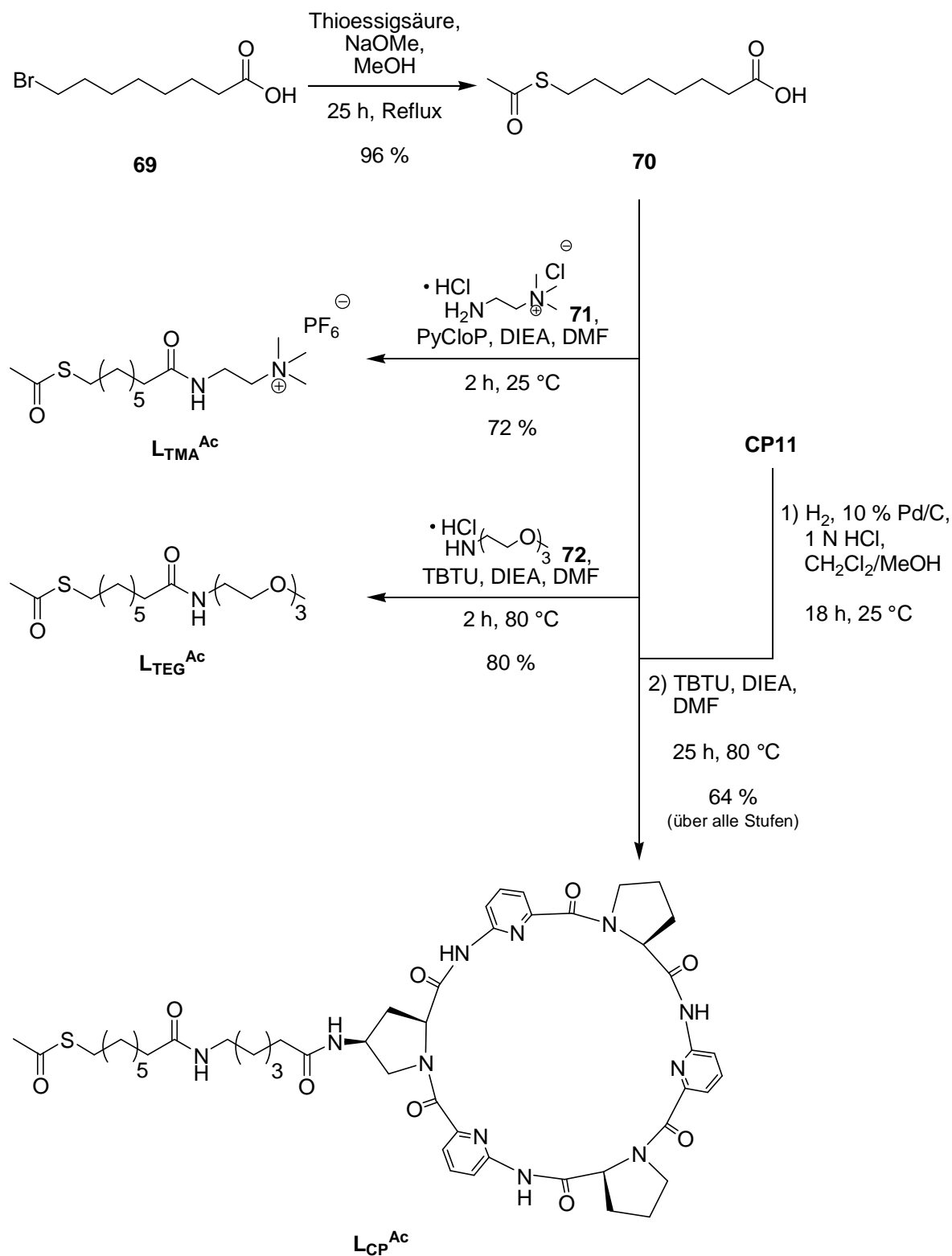
Schema 36 Synthese von *CP11*.

3.6.4 Synthese der Liganden

Die Synthese der benötigten Liganden erfolgte ausgehend von 8-Bromooctansäure **69**. Nach der Umsetzung mit Thioessigsäure unter basischen Bedingungen wurde **70** in 96 %

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

Ausbeute erhalten (Schema 37).^[92] Ausgehend hiervon wurden die drei Liganden L_{TMA}^{Ac} , L_{TEG}^{Ac} und **CP13** (im Folgenden als L_{CP}^{Ac} bezeichnet) dargestellt.



Schema 37 Synthese von L_{TMA}^{Ac} , L_{TEG}^{Ac} und L_{CP}^{Ac} .

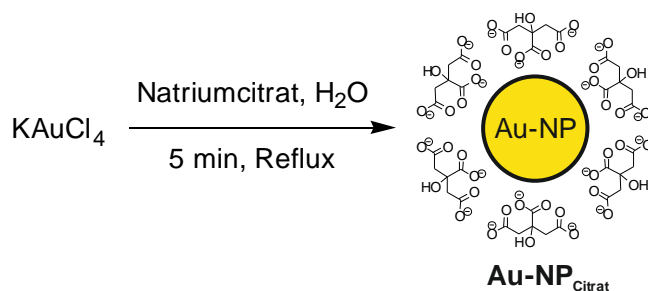
3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

Um L_{TMA}^{Ac} zu erhalten, wurde (2-Aminoethyl)trimethylammoniumchlorid Hydrochlorid **71** mit **70** und PyCloP als Kupplungsreagenz in 72 % Ausbeute umgesetzt (Schema 37). L_{TEG}^{Ac} wurde durch Kupplung von zuvor hergestelltem 2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethylamin Hydrochlorid **72** mit **70** in Gegenwart von TBTU als Kupplungsreagenz in guter Ausbeute dargestellt.^[92] Zur Darstellung von L_{CP}^{Ac} wurde **CP11** zunächst unter etablierten Bedingungen an der Aminofunktion entschützt und das Produkt in Gegenwart von TBTU zu L_{CP}^{Ac} in 64 % Ausbeute über beide Stufen umgesetzt.

Die Darstellung von **CP12** (Abbildung 34) ausgehend von **CP10** wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die Synthese dürfte auf analogen Wegen problemlos möglich sein.

3.6.5 Synthese der Au-NPs

Um Au-NPs im Bereich von 10–20 nm darzustellen, wurde zunächst eine angepasste Turkevich-Methode verwendet (Schema 38).^[77] Zu einer siedenden Lösung von Kaliumtetrachloraurat in Wasser wurde Natriumcitrat gegeben, welches zugleich als Reduktionsmittel und Stabilisator für die entstehenden Au-NPs dient. Bei diesen Synthesen wird ein vollständiger Umsatz des Goldsalzes angenommen.



Schema 38 Synthese der citratgeschützten Nanopartikel $Au-NP_{Citrat}$.

Die entstehenden Lösungen hatten eine charakteristische weinrote bis lila Färbung, was die erfolgreiche Bildung der Au-NPs anzeigt. Eine Abschätzung der Größe der gebildeten Partikel erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie (Abbildung 35). Es wurde eine stark ausgeprägte SPR-Bande bei 534 nm beobachtet, die allerdings lediglich qualitativ anzeigt, dass die Partikel einen Durchmesser >5 nm besitzen.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

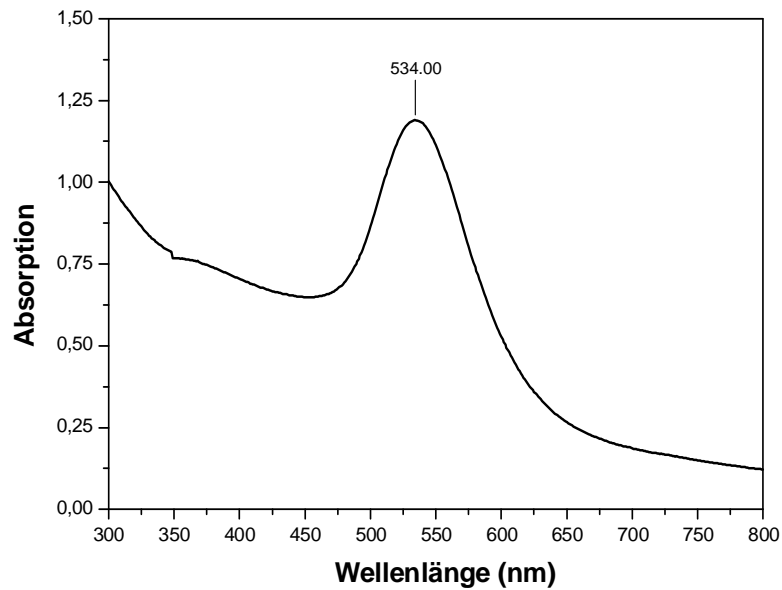


Abbildung 35 UV/Vis-Spektrum Au-NP_{Citrat}. 25 °C; 0.1 mM Natriumcitratlösung.

Eine quantitative Aussage über die Größe der Au-NPs konnte mittels TEM-Aufnahmen getroffen werden. Die Aufnahmen der erhaltenen Au-NPs zeigen, dass sie eine durchschnittliche Größe von ca. 34 nm besitzen (Abbildung 36). Sie sind damit für das geplante Vorhaben zu groß. Ein weiterer Nachteil war, dass die erhaltenen Au-NPs neben sphärischen auch andere Geometrien aufwiesen. Dies könnte die Aggregation aufgrund sterischer Inkompatibilität möglicherweise negativ beeinflussen.

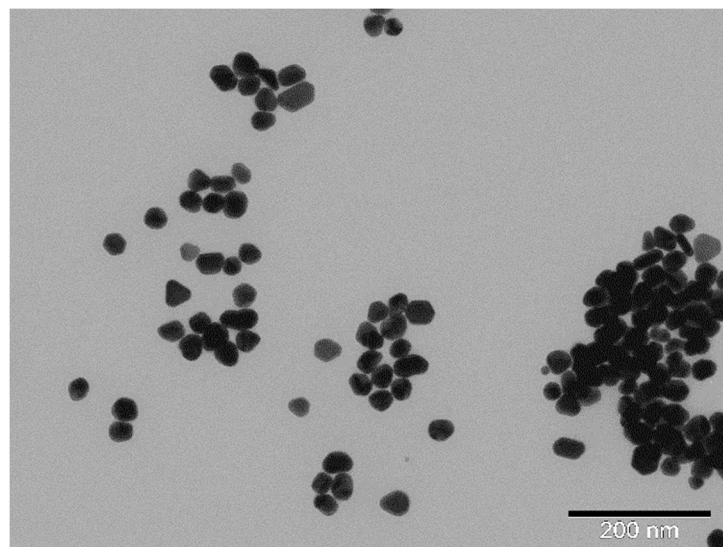
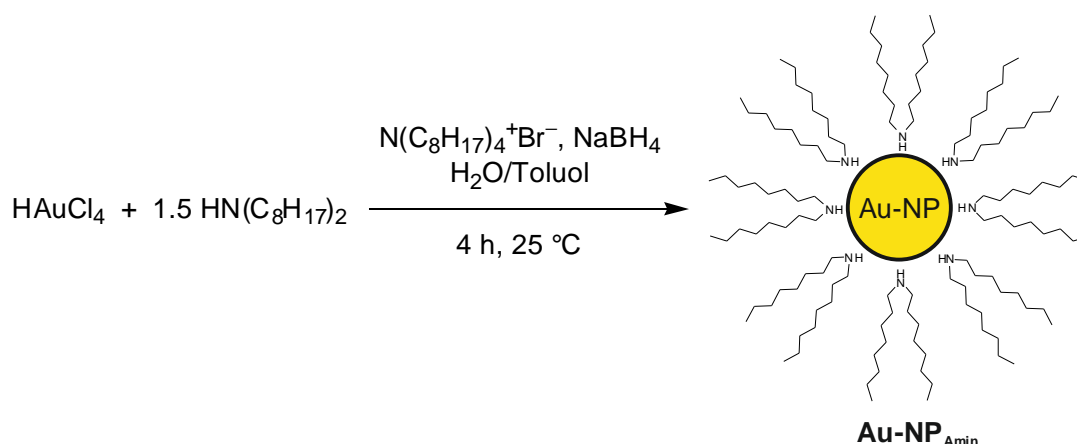


Abbildung 36 TEM-Aufnahme von Au-NP_{Citrat}.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

Es wurde daher im Folgenden zusätzlich auf eine andere bewährte Methode zur Synthese von Au-NPs zurückgegriffen. Mit Hilfe einer angepassten Brust-Schiffrin Synthese sollten Di-*n*-octylamin-geschützte Au-NPs mit einer Größe von ca. 10 nm zugänglich sein.^[67] In einem Zweiphasengemisch wurde Tetrachlorgoldsäure mit einem Phasentransferkatalysator aus der wässrigen in die organische Phase überführt und dort mit 1.5 Äquivalenten Di-*n*-octylamin mit einem Reduktionsmittel zu den amingeschützten Nanopartikeln **Au-NP_{Amin}** reduziert (Schema 39).

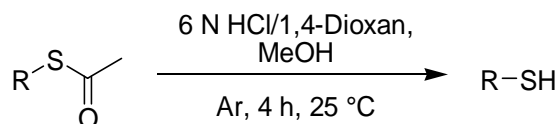


Schema 39 Synthese der amingeschützten Nanopartikel **Au-NP_{Amin}**.

Eine Charakterisierung dieser in Toluol gelösten, relativ schwach stabilisierten Nanopartikel erwies sich als schwierig, da diese bei Kontakt mit Luftsauerstoff rasch agglomerieren und darum keine verlässlichen $^1\text{H-NMR}$ - bzw. UV/Vis-Spektren erhalten werden konnten. Daher wurde die erhaltene Toluollösung bei niedrigen Temperaturen unter einer Schutzgasatmosphäre gelagert und ohne Charakterisierung für die in Kapitel 3.6.6 beschriebenen Austauschreaktionen verwendet.

3.6.6 Versuche zur Immobilisierung von Liganden auf Au-NPs

Zur Immobilisierung der in 3.6.4 dargestellten Liganden $\text{L}_{\text{TEG}}^{\text{Ac}}$, $\text{L}_{\text{TMA}}^{\text{Ac}}$ und $\text{L}_{\text{CP}}^{\text{Ac}}$ wurde zunächst die jeweiligen Thioacetat-Schutzgruppen unter etablierten Bedingungen gemäß Schema 40 entfernt. Es wurde unter einer Argonatmosphäre mit entgasten Lösungsmitteln gearbeitet, um die Oxidation der freien Thiole zu den entsprechenden Disulfiden zu verhindern. Die auf diese Weise entschützten Liganden wurden anschließend in den entsprechenden Austauschreaktionen verwendet.



Schema 40 Allgemeine Vorgehensweise zur Entschützung der Liganden.

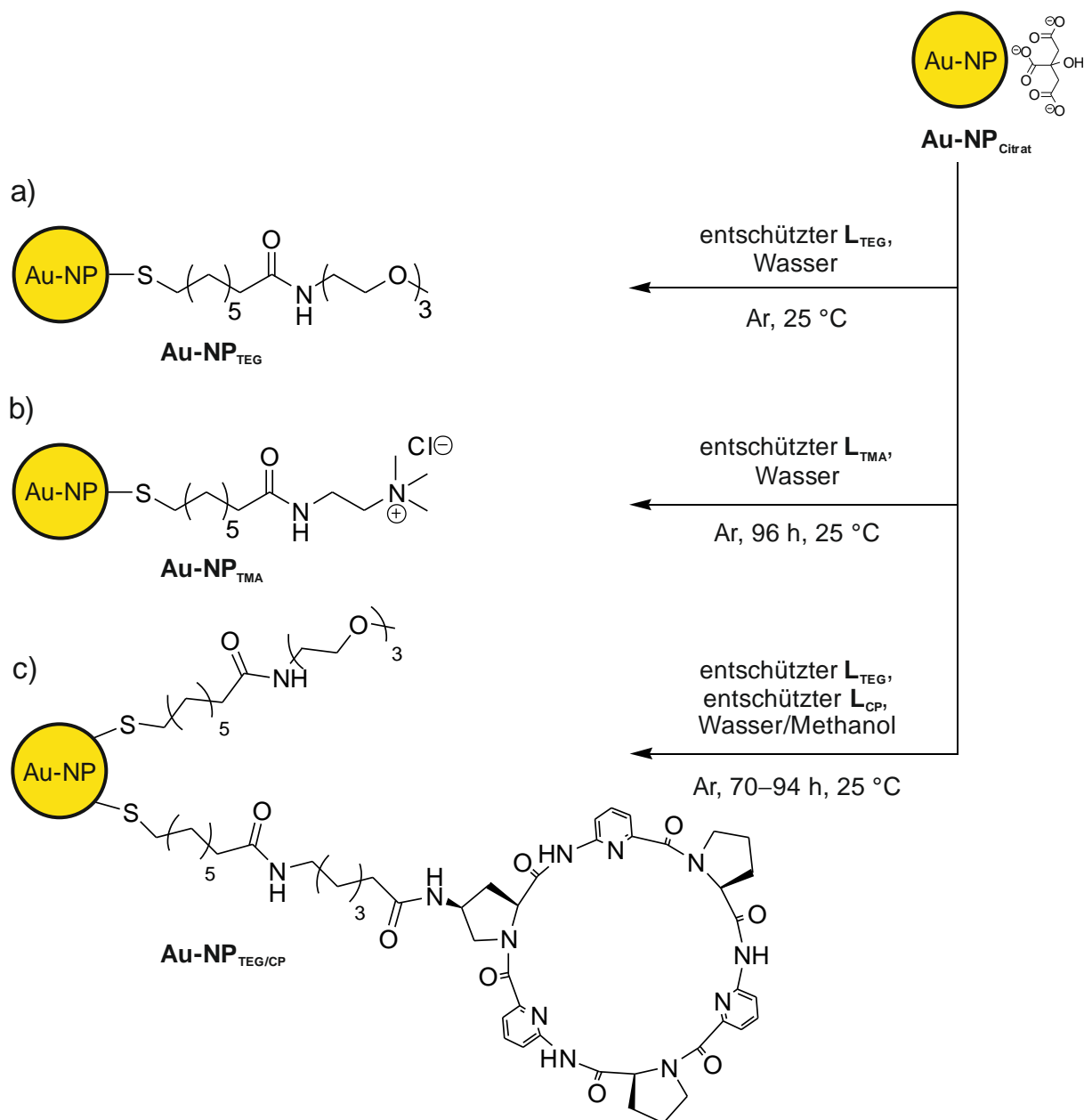
3.6.6.1 Austauschreaktionen mit Au-NP_{Citrat}

Die nach 3.6.5 dargestellten Au-NP_{Citrat} wurden unter den in Tabelle 8 angegebenen Bedingungen mit dem entschützten L_{TEG} gemäß Schema 41a) umgesetzt. In den Ansätzen 1–6 wurde die Menge an L_{TEG} variiert und die Reaktion typischerweise 2 d (Ansatz 2 zu Kontrollzwecken 4 d) gerührt, um möglichst einen vollständigen Austausch zu erreichen. Bei allen Reaktionen wurden die Nanopartikel nach Standardmethoden durch Zentrifugation mittels einer Molecular Weight Cut-Off (MWCO) Membran gereinigt, wobei die Zentrifugation bei 5 °C durchgeführt wurde, da sie bei höheren Temperaturen mit Ausbeuteverlusten verbunden war.

Tabelle 8 Für die Immobilisierung von L_{TEG} auf Au-NP_{Citrat} verwendete Reaktionsbedingungen.^{a)}

Ansatz	V (Au-NP _{Citrat}) / mL	V (L _{TEG}) / mL	c (L _{TEG}) / mM	Reaktionszeit / h
1	3.0	0.5	50	24
2	10	0.2	50	94
3	10	3.0	2.0	42
4	10	3.0	5.0	42
5	10	3.0	10	42
6	10	3.0	10	48

a) T = 25 °C, Wasser, Argonatmosphäre.



Schema 41 Immobilisierung von a) L_{TEG} auf $\text{Au-NP}_{\text{Citrat}}$ b) L_{TMA} auf $\text{Au-NP}_{\text{Citrat}}$ c) L_{TEG} und L_{CP} auf $\text{Au-NP}_{\text{Citrat}}$.

In Abbildung 37a) ist stellvertretend für die sechs durchgeführten Reaktionen das ^1H -NMR-Spektrum von Ansatz 5 und zum Vergleich das Spektrum des geschützten Liganden $\text{L}_{\text{TEG}}^{\text{Ac}}$ gezeigt (Abbildung 37b)). Die Variation der Menge des Liganden hatte keinen signifikanten Einfluss auf die erhaltenen NMR-Spektren. Die Signale bei ca. 1.2–1.6 ppm in Abbildung 37a) deuten auf die Alkylkette des L_{TEG} hin und das charakteristische Singulett für die endständige Methylgruppe des Triethylenglycolrests bei 3.35 ppm wurde ebenfalls beobachtet. Allerdings fehlen zwei Triplets bei 2.84 ppm und 2.15 ppm, welche zu den Methylengruppen in Nachbarschaft zum Schwefelatom und der Amidgruppe gehören. Eine

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

Aussage, ob die Immobilisierung erfolgreich war, konnte darum nicht getroffen werden. Jedoch gelang es, die erhaltenen Nanopartikel zu trocknen und erneut zu lösen, was mit citratgeschützten Nanopartikeln nicht gelingt, da sie nach Entfernen des wässrigen Mediums instabil werden und als schwarzer Feststoff beim Versuch eines erneuten Lösens in Wasser ausfallen.

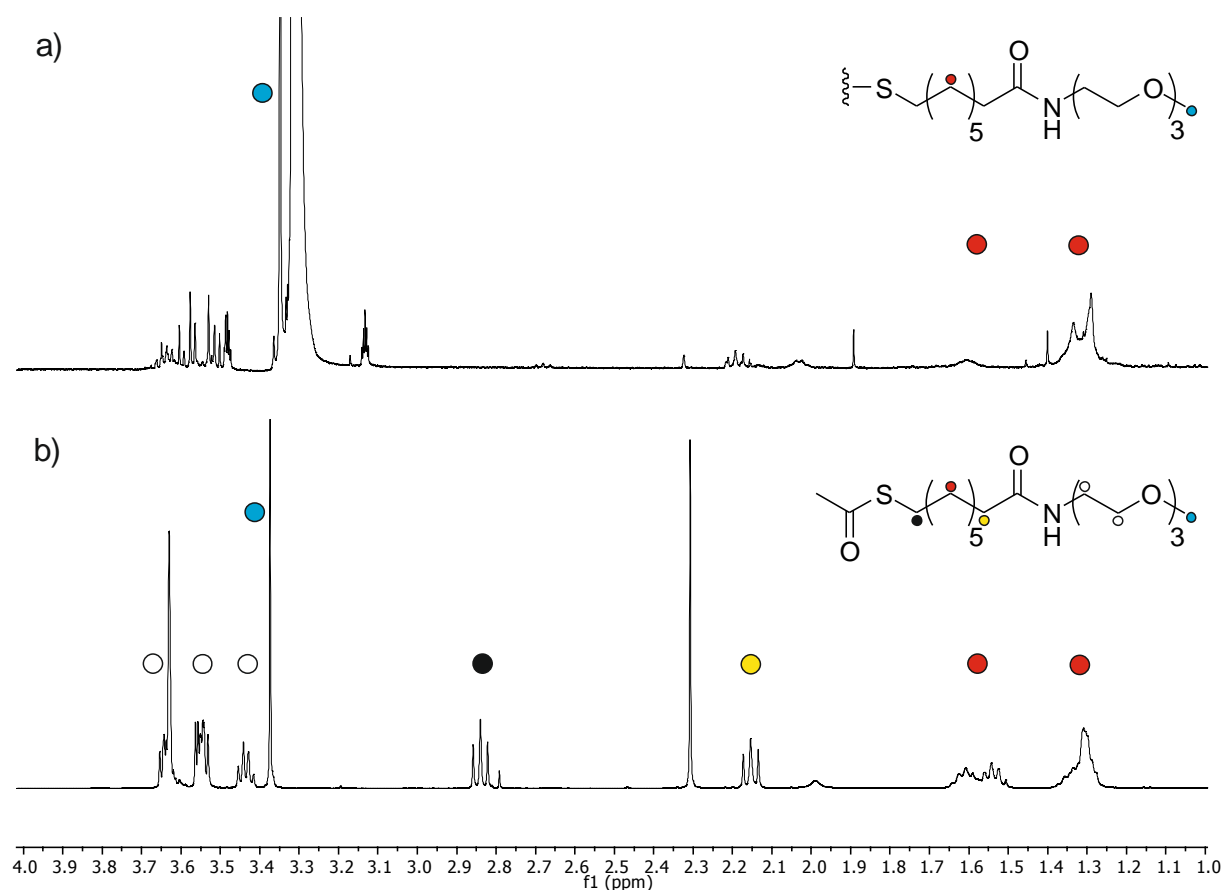


Abbildung 37 Ausschnitt der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von a) nach der Umsetzung von $\text{Au-NP}_{\text{Citrat}}$ mit L_{TEG} erhaltenen Nanopartikel (400 MHz, 25 °C, Methanol- d_4) und b) des freien Liganden L_{TEG} (400 MHz, 25 °C, CDCl_3).

Analoge Untersuchungen wurden mit dem Liganden L_{TMA} durchgeführt (Schema 41b)). Hierbei ergab sich, dass die Nanopartikel während der Austauschreaktionen stets agglomerieren (für eine Zusammenstellung aller durchgeführten Experimente siehe Kapitel 4.4.10). Der Austausch des Citratliganden gegen L_{TMA} gelang in keinem der durchgeführten Ansätze.

Schließlich wurde versucht, die beiden Liganden L_{TEG} und L_{CP} gemeinsam auf der Oberfläche von $\text{Au-NP}_{\text{Citrat}}$ zu immobilisieren (Schema 41c)). Bei diesen Reaktionen wurde

keine Agglomerisierung beobachtet. Allerdings konnten in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren keine charakteristischen Signale für das CP gefunden werden, wohl aber Signale, die dem Liganden L_{TEG} zuzuordnen sind (für eine Zusammenstellung aller durchgeführten Experimente siehe Kapitel 4.4.10). Es konnte also nur der Ligand L_{TEG} auf der Oberfläche der $\text{Au-NP}_{\text{Citrat}}$ immobilisiert werden.

Diskussion

Der Austausch von $\text{Au-NP}_{\text{Citrat}}$ mit L_{TEG} lieferte erste Hinweise auf einen erfolgreichen Austausch von Citrat. Die Beobachtung, dass die erhaltenen Nanopartikel getrocknet und wieder erneut gelöst werden können sowie die erhaltenen Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind typische Eigenschaften von Au-NPs und geben qualitative Hinweise, dass zumindest ein Teil des oberflächengebundenen Citrats durch L_{TEG} ausgetauscht wurde.

In allen Versuchen, Citrat gegen L_{TMA} auszutauschen wurde eine Aggregation beobachtet, was sich durch langsame Verfärbung der Lösung bis hin zu einem Ausfallen des Agglomerats bemerkbar machte. S. Otto beobachtete ebenfalls eine solche Verfärbung bei dem Austausch von Citrat gegen kationische Liganden.^[93] Diese Aggregation wurde durch die Kompensation der negativen Ladung auf den Nanopartikeln durch den Austausch mit positiv geladenen Liganden erklärt, die zu einem insgesamt ungeladenen Nanopartikel führt, der nicht mehr durch repulsive Coulomb-Wechselwirkungen mit anderen gleichsinnig geladenen Nanopartikeln stabilisiert wird.^[94] S. Otto konnte diesen Vorgang durch Zugabe von Salzsäure während dem Aggregationsprozess stoppen. Eine ähnliche Durchführung wurde ebenfalls von Mirkin berichtet.^[80] In dieser Arbeit wurde eine solche Vorgehensweise nicht versucht. Dies könnte das Problem der beschriebenen Aggregation lösen.

Ein gleichzeitiger Austausch von Citrat gegen L_{TEG} und L_{CP} gelang nicht, es konnte nur der Austausch gegen L_{TEG} im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigt werden. Möglicherweise wurde in den Untersuchungen eine zu geringe Menge des L_{CP} im Vergleich zu L_{TEG} verwendet. Es ist denkbar, dass der sterische Anspruch des L_{CP} die Immobilisierung negativ beeinflusst und daher der kompaktere L_{TEG} schneller ausgetauscht wird. Ein größeres Verhältnis von L_{CP} zu L_{TEG} könnte möglicherweise eine Immobilisierung von L_{CP} ermöglichen.

3.6.6.2 Austauschreaktionen mit Au-NP_{Amin}

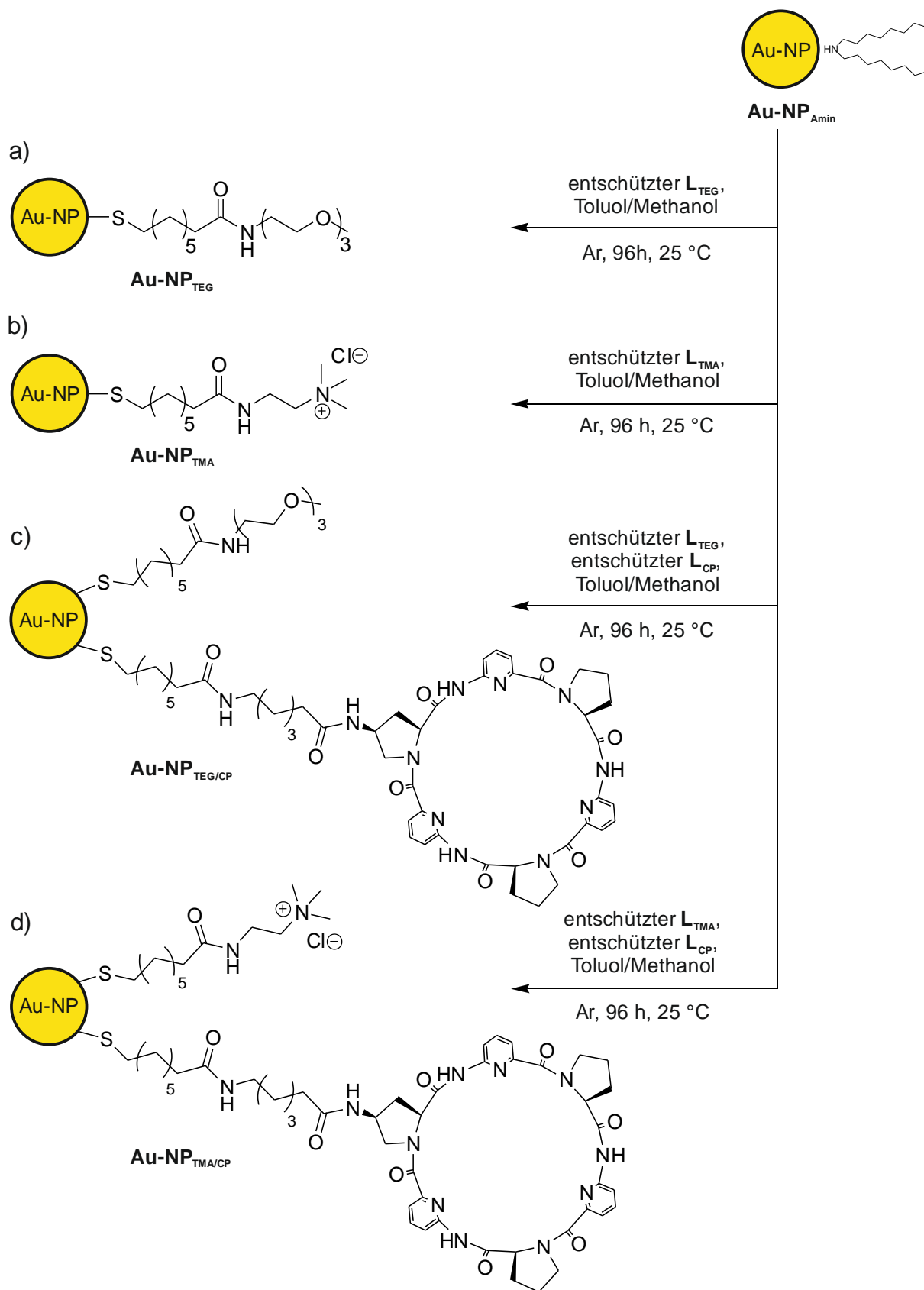
Gemäß Schema 42a)-d) sollten L_{TEG} und L_{TMA} jeweils alleine oder in Kombination mit L_{CP} auf Au-NP_{Amin} immobilisiert werden. Die Bedingungen der durchgeführten Experimente sind in Tabelle 9 zusammengefasst (für eine Zusammenstellung aller durchgeführten Experimente siehe Kapitel 4.4.10).

Bei allen Ansätzen wurde festgestellt, dass nach Zugabe der entschützten methanolischen Ligandenlösungen zu der Toluollösung der Au-NP_{Amin} jeweils rasch ein schwarzer Feststoff ausfiel, der nach der Reaktionszeit von 96 h in Wasser bzw. Wasser/Methanol aufgenommen werden konnte. Nach der Aufreinigung mittels Zentrifugation wurden die erhaltenen Produkte UV/Vis-spektroskopisch untersucht. In Abbildung 38 ist beispielhaft das entsprechende Spektrum von Ansatz 1 gezeigt. Für alle Ansätze wurden analoge Spektren mit SPR-Banden im Bereich zwischen 520 und 530 nm beobachtet. Dies zeigt, dass als Produkte Nanopartikel mit einer Größe von ca. 10 nm erhalten wurden.

Tabelle 9 Für die Immobilisierung von L_{TEG}, L_{TMA} und L_{CP} auf Au-NP_{Amin} verwendete Reaktionsbedingungen.^{a)}

Ansatz	Ligand	V (L _{TMA/TEG}) / mL	c (L _{TMA/TEG}) / mM	V (L _{CP}) / mL	c (L _{CP}) / mM	Verhältnis n(L _{TMA/TEG})/n(L _{CP})
1	L _{TEG}	2.0	200	-	-	-
2	L _{TEG}	1.6	100	-	-	-
3	L _{TMA}	2.0	200	-	-	-
4	L _{TMA}	1.6	100	-	-	-
5	L _{TEG}	1.5	200	0.5	20	30/1
6	L _{TMA}	1.5	200	0.5	20	30/1

a) T = 25 °C, Toluol/Methanol, Argonatmosphäre, 96 h.



Schema 42 Schematische Vorgehensweise der Immobilisierung von a) **L_{TEG}**, b) **L_{TMA}** und Gemischen von c) **L_{TEG}/L_{CP}** bzw. d) **L_{TMA}/L_{CP}** auf **Au-NP_{Amin}**.

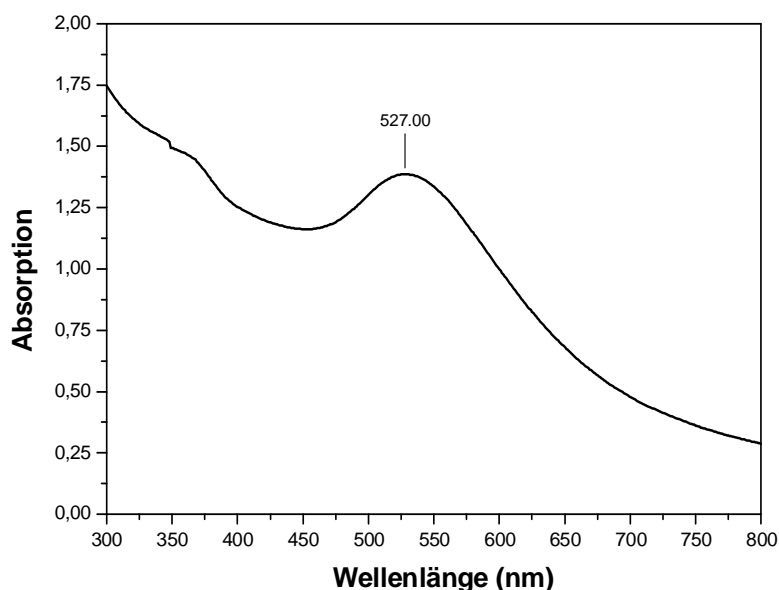


Abbildung 38 UV/Vis-Spektrum der Nanopartikel, die bei Ansatz 1 in Tabelle 9 erhalten wurden. 25 °C, Wasser.

Von allen aufgereinigten Nanopartikeln wurden zudem $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aufgenommen. In den Spektren der durch die Ansätze 1–4 erhaltenen Nanopartikel wurden Signale der Liganden beobachtet. In Abbildung 39a) und c) sind exemplarisch die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der in Ansatz 1 und 3 erhaltenen Nanopartikel gezeigt. Die Spektren weisen die typischen Signalverbreiterungen auf, die durch die Immobilisierung der organischen Liganden auf den Metallclustern hervorgerufen werden.^[95,96] Nach Iodabbau^[95,97–100] der Nanopartikel, bei dem die organischen Liganden von der Oberfläche desorbiert und in Disulfide überführt werden, während die Goldcluster aus der Lösung ausfallen, zeigen die Liganden scharfe Signale. Die zu den in Ansatz 1 und 3 erhaltenen Nanopartikel zugehörigen Spektren nach Iodabbau sind in Abbildung 39b) und d) gezeigt.

In dem in Abbildung 39b) gezeigten Spektrum sind die charakteristischen Signale der endständigen Methylgruppe von L_{TEG} bei $\delta = 3.23$ ppm sowie ein Triplett bei 2.04 ppm zu erkennen, das der Methylengruppe in Nachbarschaft zur Amidgruppe zuzuordnen ist. Desweiteren können im Bereich 1–2 ppm Multipletts der Alkylreste identifiziert werden. Das Spektrum in Abbildung 39d) zeigt ebenfalls für L_{TMA} charakteristische Signale. Bei $\delta = 3.00$ ppm ist das Singulett der Protonen der Trimethylaminogruppe erkennbar. Desweiteren werden die Triplets der Methylengruppen in Nachbarschaft zum Schwefelatom und der Amidgruppe bei 2.66 bzw. 2.10 ppm beobachtet. Die Protonen der Alkylreste befinden sich wiederum im Bereich von 1–2 ppm beobachtet.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

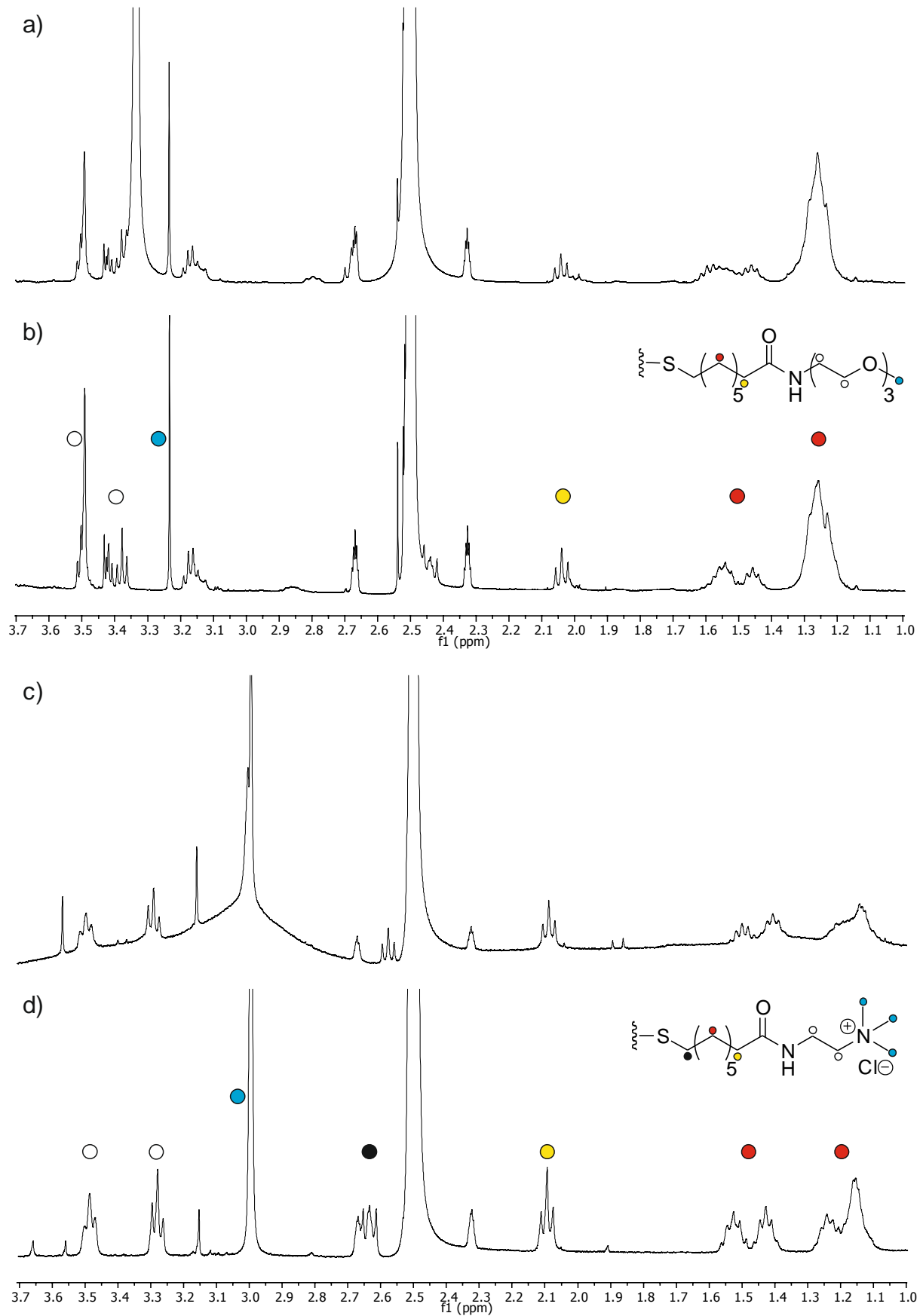


Abbildung 39 Ausschnitt der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der bei Immobilisierung von *LTEG* bzw. *LTMA* auf $\text{Au-NP}_{\text{Amin}}$ erhaltenen Nanopartikel jeweils vor (a, c) und nach (b, d) Iodabbau. 400 MHz, 25 °C, DMSO-d_6 .

Bei der ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchung der Nanopartikel von Ansatz 6 wurden keine für das CP typischen Signale nachgewiesen. Lediglich L_{TMA} konnte auf dem Nanopartikel gefunden werden.

Im Gegensatz dazu wurden im ^1H -NMR-Spektrum der in Ansatz 5 erhaltenen Nanopartikel sowohl L_{TEG} als auch L_{CP} identifiziert. Das ^1H -NMR-Spektrum dieses Nanopartikels vor und nach dem Iodabbau ist in Abbildung 40a) und b) gezeigt. Im nach dem Iodabbau erhaltenen Spektrum wurden im Bereich von 11 ppm Signale beobachtet, die den Amidprotonen zugeordnet wurden. Weiter werden im aromatischen Bereich Signale erhalten, welche zu den Aminopicolinsäureprotonen gehören. Die Signale im Bereich von 6 ppm werden den Prolin- C_α -Protonen zugeordnet. Zu höherem Feld sind bei 3.3 ppm Signale der endständigen Methylgruppe des L_{TEG} Liganden und im Bereich von 1–2 ppm der Alkylreste von L_{TEG} und L_{CP} erkennbar. Das Singulett bei 3.9 ppm ist dem internen Standard Trimethoxytriazin zuzuordnen, dessen Zusatz die Quantifizierung der oberflächengebundenen Liganden erlaubt. Da die Signale im ^1H -NMR-Spektrum allerdings schwer integrierbar sind, ist diese Quantifizierung nicht gelungen.

3 CYCLOPEPTIDE ZUR IMMOBILISIERUNG AUF GOLD

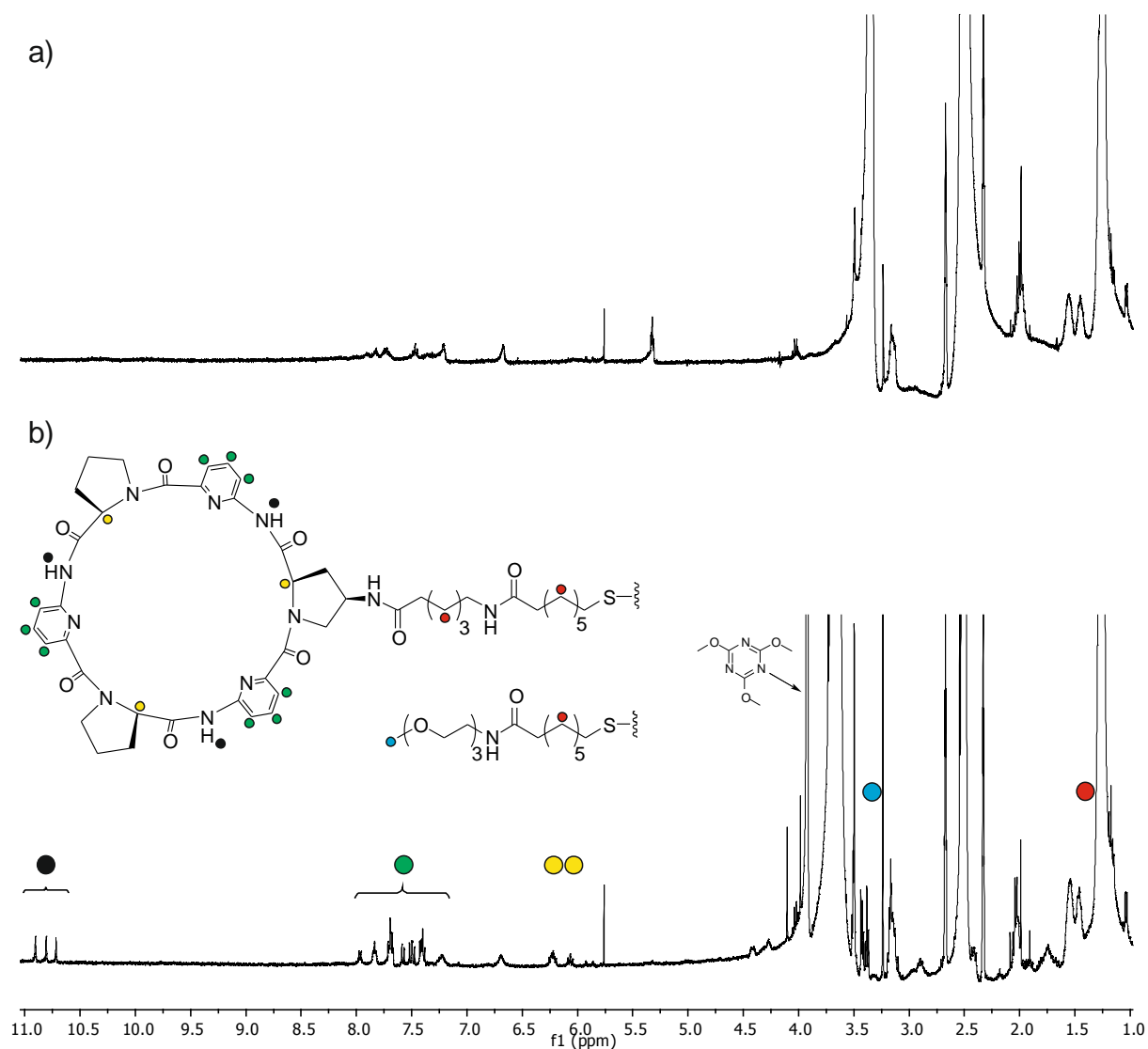


Abbildung 40 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der bei Immobilisierung von L_{TEG} und L_{CP} auf $\text{Au-NP}_{\text{Amin}}$ erhaltenen Nanopartikel a) vor und b) nach dem Iodabbau. 400 MHz, 25 °C, DMSO-d_6 .

Diskussion

Bei der Verwendung des $\text{Au-NP}_{\text{Amin}}$ wurde bei allen Austauschreaktionen ein Ausfallen eines schwarzen Feststoffes beobachtet. Dies ist ein typisches Indiz für den erfolgreichen Ligandenaustausch und die Bildung wasserlöslicher Nanopartikel.

Die spektroskopischen Daten weisen darauf hin, dass der Austausch von Amin gegen L_{TEG} erfolgreich war und die wasserlöslichen $\text{Au-NP}_{\text{TEG}}$ erhalten wurden.

Die Darstellung des wasserlöslichen $\text{Au-NP}_{\text{TMA}}$ durch Austausch mit L_{TMA} konnte ebenfalls spektroskopisch bestätigt werden.

Ein Austausch von Amin gegen L_{TEG} und L_{CP} war erfolgreich, was zu dem ebenfalls wasserlöslichen $Au-NP_{TEG/CP}$ führte. Aufgrund der geringen Intensität der Signale im 1H -NMR-Spektrum konnte keine quantitative Aussage zum Verhältnis der beiden Liganden auf der Oberfläche getroffen werden.

Im Gegensatz dazu führte die Kombination der L_{CP} in Kombination mit L_{TMA} nicht zu einer erfolgreichen Immobilisierung von CPs auf dem Nanopartikel. Die Ursache hierfür ist unbekannt. Es scheint, dass L_{TMA} eine deutlich höhere Triebkraft besitzt auf der Nanopartikeloberfläche gebunden zu werden als L_{CP} . Durch Variation der Reaktionsbedingungen, insbesondere des Verhältnisses der Liganden, muss genauer untersucht werden, unter welchen Voraussetzungen eine gemeinsame Immobilisierung von L_{TMA} und L_{CP} gelingt.

Momentan liegen noch wenig strukturelle Informationen über die dargestellten modifizierten Nanopartikel vor (zum Beispiel TEM-Aufnahmen, Quantifizierung der Oberflächenbelegung). Die hier durchgeführten Arbeiten, besonders im Bereich der Nanopartikelsynthese und -modifikation stellen lediglich Vorarbeiten dar, worauf weitere systematische Arbeiten basieren müssen.

3.6.7 Qualitative Untersuchung von $Au-NP_{TEG/CP}$ bezüglich der Anionenaffinität

Mit dem Nanopartikel $Au-NP_{TEG/CP}$ wurde anschließend qualitativ getestet, ob die Anwesenheit von Anionen (in diesem Fall SO_4^{2-}) in Lösung zu einer Agglomerisierung und damit dem angestrebten Farbumschlag bzw. einer bathochromen Verschiebung der SPR-Bande führt. Hierfür wurde zu der wässrigen Lösung von $Au-NP_{TEG/CP}$ ein Überschuss Natriumsulfat gegeben und nach 3 d Stehen der Lösung bei 25 °C ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen (Abbildung 41b)). Zum Vergleich ist in Abbildung 41a) das UV/Vis-Spektrum der Nanopartikel vor der Zugabe von SO_4^{2-} gezeigt.

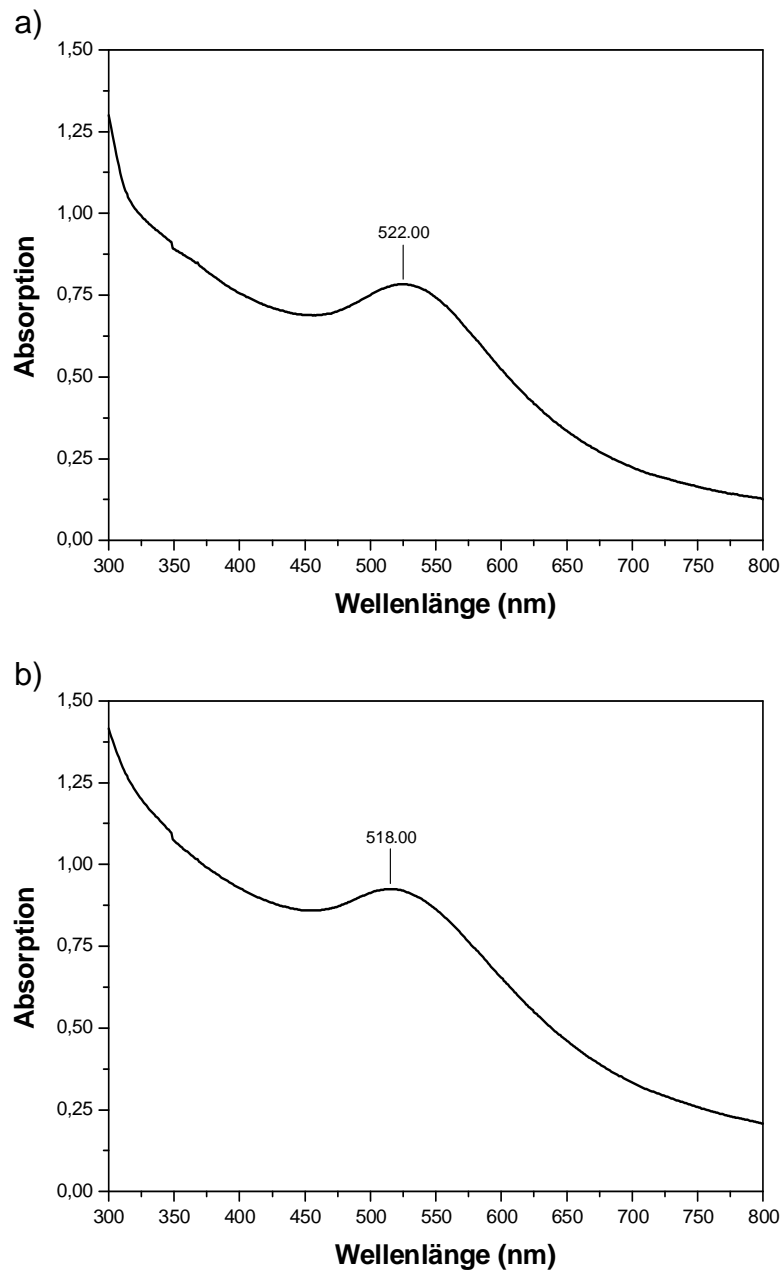


Abbildung 41 UV/Vis-Spektren von **Au-NP_{TEG/CP}** a) vor der Zugabe von Natriumsulfat und b) nach Zugabe von Natriumsulfat nach 3 d. 25 °C, Wasser.

Wie zu erkennen ist, unterscheiden sich die Maxima der SPR-Banden lediglich um 4 nm. Eine anioneninduzierte Aggregation der Nanopartikel konnte mit **Au-NP_{TEG/CP}** also wahrscheinlich nicht erreicht werden, was möglicherweise auf eine zu geringe Konzentration von **L_{CP}** auf dem Nanopartikel zurückzuführen ist.

3.7 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Teil der Arbeit wurden erstmals zwei CPs (**CP10** und **CP11**) synthetisiert, die als Ausgangsverbindungen für die Darstellung anionenerkennender Einheiten für die Immobilisierung auf Au-NPs verwendet werden können und daher als Ausgangspunkt für die Entwicklung optischer Sonden für Anionen dienen können, deren Wirkungsweise auf der anioneninduzierten Aggregation von Au-NPs beruht. Mit **CP11** wurden Vorarbeiten für die Darstellung solcher Sonden durchgeführt. Hierfür wurde **CP11** in den geschützten Liganden **CP13** (bzw. L_{CP}^{Ac}) überführt und die Liganden L_{TEG}^{Ac} und L_{TMA}^{Ac} dargestellt.

Die mittels der Turkevich-Methode dargestellten Nanopartikel erwiesen sich als im Durchschnitt zu groß für dieses Projekt, weshalb eine angepasste Au-NP-Synthese nach der Brust-Schiffrin Methode für die Synthese eines amingeschützten Nanopartikels verwendet wurde. Diese Nanopartikel dienen als Vorstufe zur Darstellung der mit den Liganden oberflächenmodifizierten Nanopartikel. Die Liganden L_{TEG} und L_{TMA} konnten jeweils einzeln auf diesen Nanopartikeln immobilisiert werden. Außerdem gelang die Synthese eines Nanopartikels, der die beiden Liganden L_{TEG} und L_{CP} enthielt. Erste qualitative Untersuchungen zeigten, dass eine Lösung dieses Nanopartikels in Wasser nicht zur gewünschten Farbveränderung führt.

Im weiteren Verlauf dieses Projektes wird es nötig sein, die Synthese der Nanopartikel und deren Modifizierung auf systematische Weise zu etablieren. Hauptaugenmerk sollte auf der Entwicklung einer robusten Methode liegen, die Nanopartikelvorstufen reproduzierbar und mit einer gegebenen Größenverteilung zugänglich macht. Daneben muss ein Verfahren entwickelt werden, verschiedene Liganden in unterschiedlichen Verhältnissen auf den Nanopartikeln zu immobilisieren. Erst wenn diese Methoden etabliert sind, sollten weitere Studien zur Immobilisierung der cyclopeptidbasierten Liganden durchgeführt werden, wobei in diesem Zusammenhang auch **CP10** berücksichtigt werden kann. Schließlich müssen die erhaltenen Materialien bezüglich Anionenaffinität und anioneninduzierter Aggregation untersucht werden. Hierfür müssen ebenfalls noch Methoden etabliert werden, die Struktur und die Eigenschaften der Nanopartikel zu charakterisieren.

4 Experimenteller Teil

4.1 Verwendete Chemikalien, Analytik und Apparatives

Die Ausgangsverbindungen sowie die verwendeten Chemikalien sind kommerziell erhältlich und wurden, soweit nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Trockene Lösungsmittel wurden nach gängigen Methoden erhalten. Das Kupplungsreagenz PyCloP wurde entsprechend der Literatur^[101] synthetisiert während andere Kupplungsreagenzien kommerziell erhältlich sind.

CHNS-Elementaranalysen: Für die Elementaranalysen wurde der Elementaranalysator vario Micro der Firma Analysensysteme GmbH in Hanau verwendet.

DC: Reaktionskontrollen wurden mit Aluminiumfolien mit dem Material Kieselgel 60 F₂₅₄ durchgeführt und für RP DCs Glasplatten mit dem RP-Material RP-8 F₂₅₄ der Firma Merck verwendet.

Drehwert: Drehwerte wurden mit dem Gerät JASCO P-2000 Polarimeter bestimmt und zur Auswertung das Programm SpectraManager verwendet.

ESI-MS: Die Spektren wurden an dem Gerät Esquire 6000 (oder amaZon SL) der Firma Bruker Daltonics aufgenommen. Zur Aufnahme wurde das Programm Esquire Control (bzw. Trapcontrol) und zur Auswertung der Daten Compass Data Analysis verwendet.

HPLC (analytisch): Es wurde ein System der Firma Dionex aus folgenden Komponenten verwendet:

ASI-100 Automated Sample Injector, P680 HPLC Pump, Thermostatted Column Compartment TCC-100, UVD170U; Säule: Supelco™ Ascentis® C18, 25 cm × 4.6 mm, 5 μm. Zur Auswertung der Chromatogramme wurde das Programm Chromeleon Version 6.7 verwendet.

HPLC (semipräparativ): Es wurde ein System der Firma Dionex aus folgenden Komponenten verwendet:

Ultimate 3000 Pump, Ultimate 3000 Autosampler, Ultimate 3000 Variable Wavelength Detector, Ultimate 3000 Fraction Collector Säule: Supelco™ Ascentis® C18, 25 cm × 21.2 mm, 5 μm, Flow: 10 mL/min. Ausgewertet wurden die Chromatogramme mit dem Programm Chromeleon Version 6.8. Die verwendeten Gradienten (wässriger Anteil „Wasser HPLC-Grade“, organischer Anteil „Acetonitril HPLC-Grade“) sind an entsprechender Stelle angegeben.

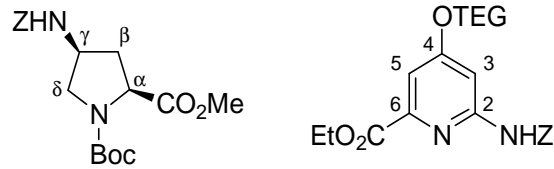
IR: Die IR-Spektren wurden an einem Perkin Elmer FT-IR-Spektrometer (gegebenenfalls mit der Universal ATR Sampling Accessory Einheit) gemessen. Zur Auswertung wurden die Programme Spectrum BX oder Spectrum v6.3.5 verwendet.

ITC: Bindungsstudien wurden mit dem Gerät MicroCal VP-ITC durchgeführt, die Roh-Thermogramme mit dem Programm NITPIC^[102] bearbeitet und mit dem Programm Sedphat^[103] ausgewertet.

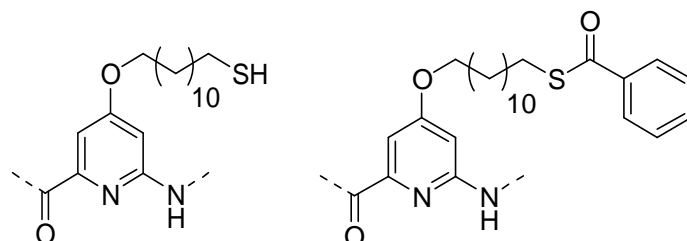
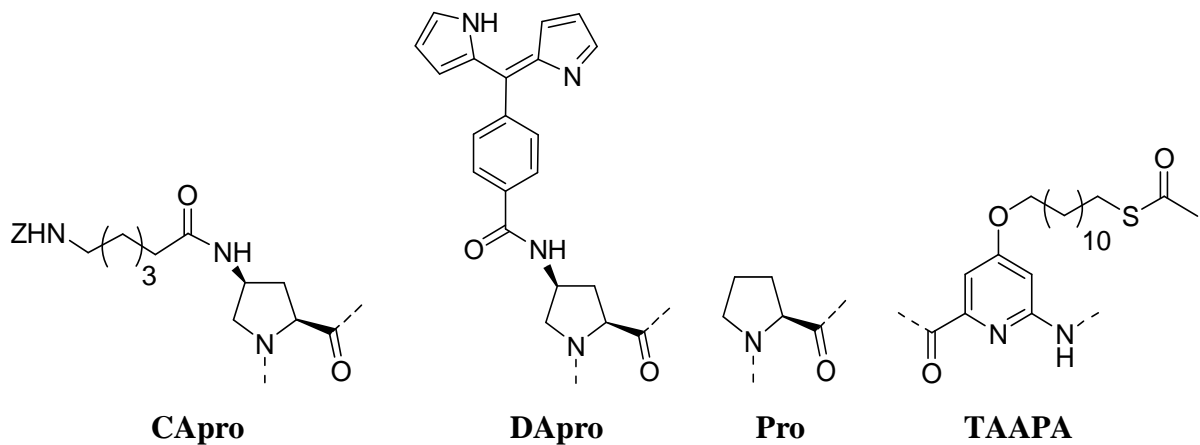
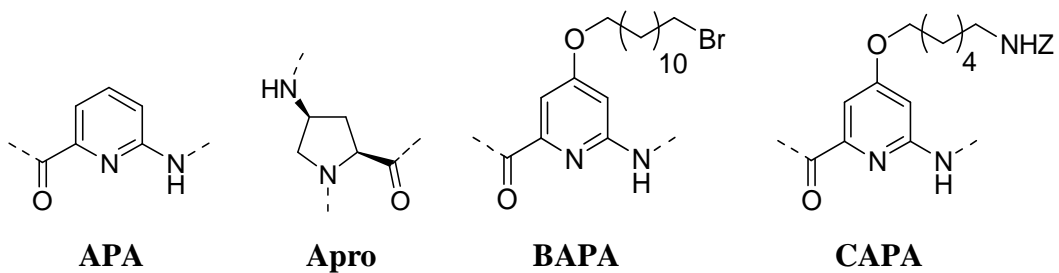
Kernresonanzspektren (¹H-NMR, ¹³C-NMR): Die NMR-Spektren wurden an den FT-NMR-Geräten AVANCE III 400 und 600 der Firma Bruker bei 25 °C bzw. 100 °C aufgenommen. Die chemische Verschiebung ist in der Einheit der δ-Skala (ppm) angegeben. Die Multiplizität der Signale wird wie folgt angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, br = breites Signal. Als interner Standard wurden die Resonanzsignale der Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel gesetzt (CDCl₃: δ_H = 7.26 ppm, δ_C = 77.16 ppm, DMSO-d₆: δ_H = 2.50 ppm, δ_C = 39.52 ppm, MeOD-d₄: δ_H = 3.31 ppm, δ_C = 49.00 ppm). Für ¹⁹F-Spektren wurde Trifluoressigsäure mit δ_F = -76.55 ppm als interner Standard verwendet. Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz (Hz) angegeben.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Signal-Zuordnung: Den Zuordnungen in den NMR-Spektren liegt folgende Benennung zu Grunde.



Weitere, hier nicht gezeigte Zuordnungen von Protonen oder Kohlenstoffatomen sind in den Spektren entsprechend gekennzeichnet. Es werden die folgenden Abkürzungen für die einzelnen Aminosäureeinheiten verwendet.



TAPA

TBAPA

MALDI-Spektren (MALDI/TOF): Die Massenspektren wurden mit dem Gerät Bruker Daltonics Ultraflex aufgenommen und dem Programm Bruker Daltonics flex Analysis ausgewertet.

Molecular Weight Cut-Off Membranen (MWCO): Zur Aufreinigung der Au-NP mittels Zentrifugation wurden die Membranen Vivaspin 15R 5000 MWCO der Firma Sartorius verwendet.

Säulenchromatographie: Säulenchromatographische Aufreinigungen wurden mit Kieselgel 60 von Fluka (nass gepackt) bzw. RP-Säulenchromatographie mit dem Säulenmaterial Lichroprep® RP-8 (40 – 63 µm) der Firma Merck durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmung: Die entsprechenden Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät SPM-X 300 der Firma Müller bestimmt.

UV/Vis: Absorptionsspektren im UV/Vis-Bereich wurden mit dem Zweistrahl-Fotometer Gerät Cary 100 der Firma Varian aufgenommen und dem Programm Scan ausgewertet.

Zentrifugation: Zur Aufreinigung der Au-NP mittels Zentrifugation wurde das Gerät Centrifuge 5702 R der Firma Eppendorf verwendet (bei 3000 rpm).

4 EXPERIMENTELLER TEIL

4.2 Allgemeine Vorschriften

4.2.1 Spaltung von Acetylgruppen unter sauren Bedingungen

Der geschützte Ligand (L_{TEG}^{Ac} bzw. L_{TMA}^{Ac} 100 μmol , L_{CP}^{Ac} 10 μmol) wurde in entgastem Methanol (1 mL) gelöst und unter einer Argonatmosphäre mit 6 N HCl in trockenem 1,4-Dioxan (1 mL) versetzt. Anschließend wurde 4 h bei 25 °C gerührt und dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde 30 min im Vakuum getrocknet. Das freie Thiol wurde schnellstmöglich (innerhalb 1 h) weiter umgesetzt.

4.2.2 Spaltung von Boc-Gruppen in 4 N HCl in 1,4-Dioxan

Das zu entschützende Amin wurde in trockenem 1,4-Dioxan (20 mL/mmol) gelöst und unter Eisbadkühlung langsam mit einer 6 N Lösung von HCl in trockenem 1,4-Dioxan (40 mL/mmol) versetzt. Es wurde in der Kälte bis zum vollständigen Umsatz weitergerührt (üblicherweise 2 h; im Fall von **63** 42 h), anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt im Vakuum getrocknet.

4.2.3 Spaltung von Estergruppen mit NaOH

Der zu entschützende Ester wurde in 1,4-Dioxan (20 mL/mmol) gelöst und mit 1.2–2 eq 1 N Natronlauge versetzt. Es wurde solange bei 25 °C gerührt, bis laut DC kein Edukt mehr vorhanden war (üblicherweise 2 h, gegebenenfalls 1 N Natronlauge nachdosieren). Zu der Lösung wurde Wasser gegeben und das organische Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die zurückbleibende wässrige Phase wurde mit 3 %iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung auf einen pH-Wert von ca. 2 eingestellt (bei der Synthese von **CP4** und **CP2** fällt ein Feststoff aus, der abfiltriert und im Fall von **CP4** vor der weiteren Umsetzung noch getrocknet wurde; bei **CP2** wurde das feuchte Produkt weiterverwendet). Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt.

4.2.4 Spaltung von Z-Gruppen mit H_2/Pd

Das Z-geschützte Amin wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (im Falle von Ethylestern Ethanol) (40 mL/mmol, 1:1 (v/v)) gelöst, mit einer Spatelspitze 10 %igem Palladium/Kohle-Katalysator (suspendiert in wenig Dichlormethan)

und 1.2 eq 1 N Salzsäure versetzt (bei der Synthese von **CP3** wurde keine Salzsäure zugesetzt) und unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck bis zur kompletten Entschützung gerührt (üblicherweise 18 h; bei der Synthese von **CP3** 2 d). Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert, der Filterkuchen mit Methanol (bzw. Ethanol) nachgewaschen und das Filtrat zur Trockne eingengt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

4.2.5 Iodabbau von Au-NPs^[98,100]

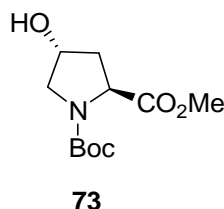
Um gut auswertbare ¹H-NMR-Spektren zu erhalten, wurden, wenn angegeben, die Nanopartikel einem Iodabbau unterworfen. Hierfür wurde eine Lösung der Au-NPs in DMSO-*d*₆ mit einem Überschuss Iod (200 μL, 100 mM in DMSO-*d*₆) versetzt und die Lösung bis zur vollständigen Agglomeration des Golds im Ultraschallbad behandelt. Die erhaltene klare Lösung über dem ausgefallenen Gold wurde anschließend ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht.

4.3 Synthesen zu „Bis(cyclopeptide) zur Anionenerkennung in wässrigen Medien“

4.3.1 Synthese von Boc-((2*S*, 4*S*)-4*Z*-Aminoprolin (17)

Boc-((2*S*, 4*R*)-4-Hydroxyprolin)-methylester (73).^[34] (2*S*, 4*R*)-4-Hydroxyprolin-methylester Hydrochlorid (5.1 g, 27.9 mmol) wurde in einem 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisch (75 mL, 2:1 (v/v)) suspendiert und bei 0 °C mit Di-*tert*-butyldicarbonat (6.8 g, 30.9 mmol) und Triethylamin (5.8 mL, 41.8 mmol) versetzt. Nach 3 h Rühren bei 25 °C wurde 1,4-Dioxan unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (150 mL) aufgenommen, mit Wasser (25 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit Ethylacetat (2 × 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit 0.5 N Salzsäure (12 mL), Wasser (12 mL), 10 %iger wässriger Natriumcarbonat-Lösung (12 mL), Wasser (12 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (12 mL) gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt. Das erhaltene farblose Öl wurde mit einem Impfkristall angeimpft, wonach das Produkt als Feststoff auskristallisierte.

Ausbeute: 6.2 g (25.3 mmol, 91 %), farbloser Feststoff.



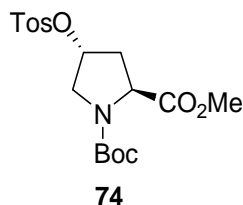
¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 4.48–4.36 (m, 2 H, Pro(C α)H + Pro(C γ)H), 3.71 (s, 3 H, -O-CH₃), 3.62–3.42 (m, 2 H, Pro(C δ)H), 2.32–2.22 (m, 1 H, Pro(C β)H), 2.08–2.01 (m, 1 H, Pro(C β)H), 1.44 + 1.39 (2 s, 9 H, Boc-H) ppm.

Boc-((2*S*, 4*R*)-4-Tosyloxyprolin)-methylester (74).^[35] **73** (8.7 g, 35.3 mmol) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (27.4 g, 0.14 mol) wurden in Pyridin (35.0 mL, 0.43 mol) und trockenem Dichlormethan (35 mL) gelöst und 19.5 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (140 mL) aufgenommen und die organische Phase nacheinander mit 10 %iger wässriger Natriumcarbonat-Lösung (3 × 75 mL) sowie Wasser (3 × 75 mL) gewaschen. Sie wurde über

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat/Hexan = 1:1 (v/v)] aufgereinigt. Es kristallisierte bei leichtem Erwärmen im Vakuum aus.

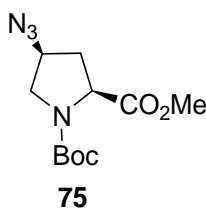
Ausbeute: 13.3 g (33.2 mmol, 94 %), farbloser Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 7.79–7.77 (m, 2 H, Tosyl(C2) H + Tosyl(C6) H), 7.38–7.35 (m, 2 H, Tosyl(C3) H + Tosyl(C5) H), 5.06–5.01 (m, 1 H, Pro(C α) H), 4.41–4.33 (m, 1 H, Pro(C γ) H), 3.71 (s, 3 H, $-\text{O}-\text{CH}_3$), 3.64–3.53 (m, 2 H, Pro(C δ) H), 2.57–2.38 (m, 1 H, Pro(C β) H), 2.46 (s, 3 H, Tosyl- CH_3), 2.19–2.04 (m, 1 H, Pro(C β) H), 1.42 + 1.39 (2 s, 9 H, Boc- H) ppm.

Boc-((2S, 4S)-4-Azidoprolin)-methylester (75).^[35] Zu einer Lösung aus **74** (13.3 g, 33.2 mmol) in DMF (85 mL) wurde Natriumazid (4.3 g, 66.4 mmol) zugegeben und das Gemisch für 3.5 h auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Wasser (140 mL) aufgenommen und mit Ethylacetat (3 × 60 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend nacheinander mit Wasser (70 mL), 10 %iger wässriger Natriumcarbonat-Lösung (70 mL) sowie gesättigter wässriger NaCl-Lösung (70 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt.

Ausbeute: 7.8 g (28.7 mmol, 86 %), farbloses Öl.

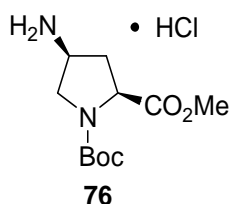


4 EXPERIMENTELLER TEIL

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 4.44–4.31 (m, 1 H, Pro(C_α)H), 4.17–4.13 (m, 1 H, Pro(C_γ)H), 3.76 (s, 3 H, -O- CH_3), 3.76–3.68 (m, 1 H, Pro(C_δ)H), 3.51–3.44 (m, 1 H, Pro(C_δ)H), 2.51–2.42 (m, 1 H, Pro(C_β)H), 2.20–2.15 (m, 1 H, Pro(C_β)H), 1.47 + 1.42 (2 s, 9 H, Boc-H) ppm.

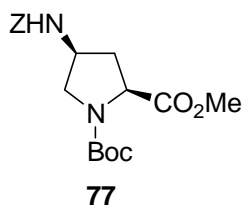
Boc-((2S, 4S)-4-Aminoprolin)-methylester Hydrochlorid (76).^[35] Zu einer Lösung aus **75** (7.8 g, 28.7 mmol) in Methanol (190 mL) wurde in wenig Dichlormethan suspendierter 10 %iger Palladium/Kohle-Katalysator (60 mg) sowie 1 N Salzsäure (31.5 mL, 31.5 mmol) zugegeben und die Mischung unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck 6 d gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und der Filterkuchen mit Methanol nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Feststoff im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

Ausbeute: Quantitativ, farbloser Feststoff.



Boc-((2S, 4S)-4Z-Aminoprolin)-methylester (77).^[35] Eine Lösung von **76** (8.1 g, 28.7 mmol) in trockenem Dichlormethan (290 mL) wurde in einem Eisbad gekühlt. Dazu wurde in der Kälte DIEA (13.0 mL, 74.4 mmol) und Benzylchlorformiat (8.2 mL, 57.4 mmol) gegeben und das Gemisch 15 h gerührt, wobei es langsam eine Temperatur von 25 °C erreichte. Es wurde anschließend mit 3 %iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung (2 × 200 mL) gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat/Hexan = 1:1 (v/v)] aufgereinigt.

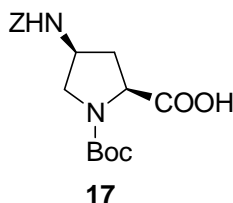
Ausbeute: 8.2 g (21.7 mmol, 76 %), farbloses Öl.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 7.38–7.30 (m, 5 H, Z-Ph-H), 5.84–5.73 (m, 1 H, Apro(C_α)H), 5.09 (s, 2 H, Z- CH_2), 4.42–4.23 (m, 2 H, Apro(C_γ)H + NHZ), 3.76 + 3.74 (2 s, 3 H, -O- CH_3), 3.66–3.44 (m, 2 H, Apro(C_δ)H), 2.50–2.40 (m, 1 H, Apro(C_β)H), 1.99–1.92 (m, 1 H, Apro(C_β)H), 1.45 + 1.41 (2 s, 9 H, Boc-H) ppm.

Boc-((2S, 4S)-4Z-Aminoprolin (17)). Verbindung **77** (5.7 g, 15 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift 4.2.3 am C-Terminus geschützt und das Produkt im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

Ausbeute: 4.9 g (13.4 mmol, 90 %), farbloser Feststoff.

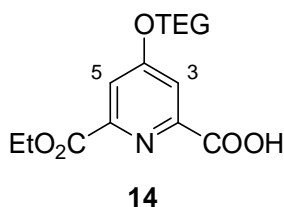


4.3.2 Benzyl-6-ethoxycarbonyl-4-[2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]-pyridin-2-ylcarbammat (15)

Diethyl-4-hydroxypyridin-2,6-dicarboxylat (12).^[33] Chelidamsäure **11** (20.1 g, 0.10 mol) wurde in Ethanol (360 mL) suspendiert und unter starkem Rühren bei 25 °C mit $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{konz.}}$ (12.0 mL) versetzt. Das Gemisch wurde anschließend 6 h zum Rückfluss erhitzt, währenddessen sich der Feststoff komplett löste. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck auf ca. 100 mL eingengt und mit Wasser (250 mL) verdünnt. Nun wurde mit Dichlormethan (5×100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (100 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt.

6-Ethoxycarbonyl-4-[2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]-pyridin-2-carbonsäure (14).^[33] Verbindung **13** (6.5 g, 16.9 mmol) wurde in ein Gemisch von 1 N Natronlauge (6.8 mL, 6.8 mmol) in Wasser (855 mL) gegeben und 22 h bei 25 °C gerührt. Die Lösung wurde anschließend mit Dichlormethan (2 × 200 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Durch Entfernen des Lösungsmittels konnte nicht umgesetztes Edukt zurückgewonnen werden. Die wässrige Phase wurde mit 0.1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 angesäuert und mit Dichlormethan (2 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend zur Trockne eingengt.

Ausbeute: 2.1 g (5.9 mmol, 87 %), farbloses Öl.



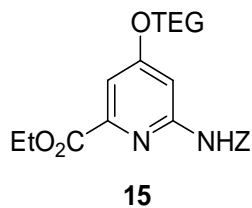
¹H-NMR (600 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 7.88 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1 H, Pyridin(C3)H), 7.85 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1 H, Pyridin(C5)H), 4.46 (q, ³J = 7.1 Hz, 2 H, -CO₂-CH₂-CH₃), 4.34–4.32 + 3.92–3.91 + 3.74–3.73 + 3.68–3.67 + 3.65–3.63 + 3.55–3.53 (m, 12 H, Ethylenglycol-H), 3.37 (s, 3 H, -O-CH₃), 1.44 (t, ³J = 7.1 Hz, 3 H, -CO₂-CH₂-CH₃) ppm.

Benzyl-6-ethoxycarbonyl-4-[2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]-pyridin-2-ylcarbamate (15).^[30,85] Zu einer Lösung von **14** (8.3 g, 23.2 mmol) in DMF/THF (120 mL, 2:3 (v/v)) wurde bei 0 °C Ethylchlorformiat (2.7 mL, 27.8 mmol) und *N*-Methylmorpholin (3.1 mL, 28.2 mmol) gegeben. Das erhaltene Gemisch wurde 25 min unter Kühlung gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von Natriumazid (2.3 g, 34.8 mmol) in wenig Wasser unter Kühlung zugegeben. Nach 2.5 h Rühren bei dieser Temperatur wurde das THF unter vermindertem Druck entfernt (bei 30 °C Wasserbadtemperatur), der leicht gelbe Rückstand in Dichlormethan (200 mL) aufgenommen und mit Wasser (3 × 200 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt (bei 30 °C Wasserbadtemperatur). Der Rückstand wurde in trockenem Toluol (185 mL) aufgenommen, mit Benzylalkohol (2.7 mL, 25.6 mmol) versetzt und 15.5 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Toluol unter

4 EXPERIMENTELLER TEIL

vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Dichlormethan (200 mL) aufgenommen und mit Wasser (2×200 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie [SiO_2 , Ethylacetat/Pentan = 3/1 (v/v)] aufgereinigt.

Ausbeute: 6.2 g (13.5 mmol, 58 %), farbloses Harz.



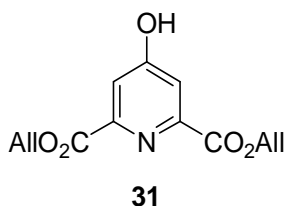
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 7.74 (d, $^4J = 2.0$ Hz, 1 H, Pyridin(C3)*H*), 7.72 (s, 1 H, *NH*), 7.39 (d, $^4J = 2.2$ Hz, 1 H, Pyridin(C5)*H*), 7.37–7.31 (m, 5 H, *Z-Ph-H*), 5.21 (s, 2 H, *Z-CH*₂), 4.42 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2 H, $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.25–4.23 + 3.89–3.86 + 3.74–3.72 + 3.69–3.64 + 3.56–3.54 (5 m, 12 H, Ethylenglycol-*H*), 3.37 (s, 3 H, $-\text{O}-\text{CH}_3$), 1.40 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3 H, $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ppm.

4.4 Synthesen zu „Cyclopeptide zur Immobilisierung auf Gold“

4.4.1 6-Allyloxycarbonyl-4-(12-bromdodecyloxy)-picolinsäure (34)

Diallyl-4-hydroxypyridin-2,6-dicarboxylat (31).^[83] Chelidamsäure **11** (2.1 g, 10.2 mmol) und *p*-Toluolsulfonsäure (4.6 g, 24.1 mmol) wurden in Benzol (60 mL) suspendiert. Unter Rühren wurde die Suspension mit Allylalkohol (13.8 mL, 0.20 mol) versetzt und die Reaktionsmischung mit aufgesetztem Wasserabscheider zum Rückfluss erhitzt, wobei sich das Edukt nach 2 h vollständig gelöst hatte. Nach 19 h wurde die Reaktionsmischung auf 25 °C abkühlen gelassen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde zunächst über eine Kieselgelsäule mit Aceton als Eluens vorgereinigt und anschließend säulenchromatographisch [SiO₂, Ethylacetat/Hexan = 3:2 (v/v)] aufgereinigt. Das erhaltene farblose Öl kristallisiert nach längerem Stehen bei 25°C.

Ausbeute: 2.3 g (8.7 mmol, 86 %), farbloser Feststoff.



¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-*d*₆): δ = 11.62 (s, 1 H, -OH), 7.61 (s, 2 H, Pyridin(C3)H + Pyridin(C5)H), 6.09–6.00 (m, 2 H, Allyl-*H*_{vic}), 5.44–5.39 (m, 2 H, Allyl-*H*_{trans}), 5.31–5.27 (m, 2 H, Allyl-*H*_{cis}), 4.84–4.82 (m, 4 H, Allyl-*CH*₂) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO-*d*₆): δ = 166.0 (PyridinC4), 163.9 (-CO₂-Allyl), 149.4 (PyridinC2 + PyridinC6), 132.4 (-CO₂-CH₂-CH=CH₂), 118.5 (-CO₂-CH₂-CH=CH₂), 115.4 (PyridinC3 + PyridinC5), 65.8 (-CO₂-CH₂-CH=CH₂) ppm.

IR (ATR): 3087 (w), 2931 (w), 2701 (w), 2591 (w), 2482 (w), 1737 (s), 1725 (s), 1608 (m), 1572 (m), 1372 (m), 1344 (s), 1244 (s), 1159 (s), 1108 (m), 986 (s), 924 (s), 889 (m), 788(m), 743 (w) cm⁻¹.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

C,H,N,S-Elementaranalyse: C₁₃H₁₃NO₅

Berechnet: C = 59.31 % H = 4.98 % N = 5.32 %

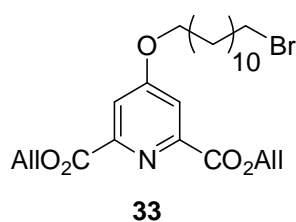
Gefunden: C = 59.21 % H = 5.14 % N = 5.23 %

Schmelzpunkt: 62–64 °C

MS MALDI/TOF (*m/z*): 264 [M+H]⁺ (100 %), 286 [M+Na]⁺ (26 %), 302 [M+K]⁺ (14 %).

Diallyl-4-(12-bromdodecyloxy)-pyridin-2,6-dicarboxylat (33).^[84] Das Dicarboxylat **31** (0.88 g, 3.3 mmol), 1,12-Dibromdodecan **32** (11.0 g, 33.4 mmol) und getrocknetes Kaliumcarbonat (0.92 g, 6.7 mmol) wurden in trockenem Aceton (25 mL) suspendiert. Nach 5 d Rühren bei 25 °C wurde die Reaktionsmischung mit 1 N Salzsäure auf pH 2 eingestellt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO₂, Ethylacetat/Hexan = 1:2 (v/v)] aufgereinigt. Nicht abreagiertes **32** wurde hierbei wieder zurückgewonnen. Nach Animpfen mit einem Impfkristall wurde das Produkt als Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.1 g (2.2 mmol, 67 %), farbloser Feststoff.



¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-*d*₆): δ = 7.72 (s, 2 H, Pyridin(C3)*H* + Pyridin(C5)*H*), 6.10–6.00 (m, 2 H, Allyl-*H*_{vic}), 5.45–5.40 (m, 2 H, Allyl-*H*_{trans}), 5.31–5.28 (m, 2 H, Allyl-*H*_{cis}), 4.86–4.84 (m, 4 H, Allyl-CH₂), 4.20 (t, ³*J* = 6.4 Hz, 2 H, -O-CH₂-), 3.50 (t, ³*J* = 6.7 Hz, 2 H, Br-CH₂-), 1.80–1.70 (m, 4 H, Alkyl-*H*), 1.44–1.24 (m, 16 H, Alkyl-*H*) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO-*d*₆): δ = 166.5 (PyridinC4), 163.8 (-CO₂-Allyl), 149.4 (PyridinC2 + PyridinC6), 132.3 (-CO₂-CH₂-CH=CH₂), 118.6 (-CO₂-CH₂-CH=CH₂), 114.2

4 EXPERIMENTELLER TEIL

(PyridinC3 + PyridinC5), 68.8 (-O-CH₂-), 65.9 (-CO₂-CH₂-CH=CH₂), 35.2 (Br-CH₂-), 32.2 + 28.9 + 28.6 + 28.2 + 28.1 + 27.5 + 25.3 (Alkyl-C) ppm.

IR (ATR): 3096 (w), 2944 (w), 2919 (m), 2851 (m), 1717 (s), 1595 (m), 1567 (w), 1444 (w), 1373 (s), 1337 (s), 1269 (m), 1235 (s), 1150 (m), 1104 (s), 1036 (s), 984 (m), 941 (m), 931 (m), 782 (w) cm⁻¹.

C,H,N,S-Elementaranalyse: C₂₅H₃₆BrNO₅

Berechnet: C = 58.82 % H = 7.11 % N = 2.74 %

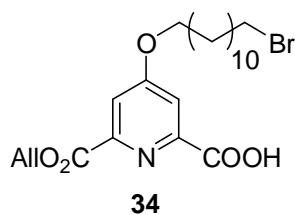
Gefunden: C = 58.96 % H = 7.25 % N = 2.74 %

Schmelzpunkt.: 32–33 °C

MS MALDI/TOF (*m/z*): 470 + 472 [M-Allyl+H]⁺ (18 %), 510 + 512 [M+H]⁺ (100 %), 532 + 534 [M+Na]⁺ (7 %), 548 + 550 [M+K]⁺ (2 %).

6-Allyloxycarbonyl-4-(12-bromdodecyloxy)-picolinsäure (34). Verbindung **33** (1.7 g, 3.3 mmol) wurde in 1,4-Dioxan (70 mL) gelöst und unter Rühren mit 1 N Natronlauge (1.7 mL, 1.7 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 22 h bei 25 °C gerührt, anschließend mit 1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von ca. 2 eingestellt und mit Wasser (15 mL) versetzt. Das organische Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3 × 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO₂, Ethylacetat/Hexan = 1:1 (v/v), 0.4 Vol% TFA] aufgereinigt. Nicht umgesetztes **33** wurde hierbei wieder zurückgewonnen.

Ausbeute: 0.46 g (0.98 mmol, 59 %), gelbes Öl.



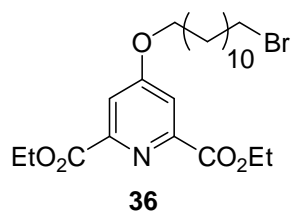
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 7.70 + 7.69$ (2 d, $^4J = 2.5$ Hz, $^4J = 2.6$ Hz, 2 H, Pyridin(C3)*H* + Pyridin(C5)*H*), 6.10–6.00 (m, 1 H, Allyl-*H*_{vic}), 5.45–5.39 (m, 1 H, Allyl-*H*_{trans}), 5.31–5.28 (m, 1 H, Allyl-*H*_{cis}), 4.86–4.84 (m, 2 H, Allyl-*CH*₂), 4.19 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2 H, -O-*CH*₂-), 3.51 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 2 H, Br-*CH*₂-), 1.80–1.70 (m, 4 H, Alkyl-*H*), 1.44–1.25 (m, 16 H, Alkyl-*H*) ppm.

MS MALDI/TOF (*m/z*): 430 + 432 [$\text{M-Allyl} + \text{H}$]⁺ (10 %), 470 + 472 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ (100 %), 494 + 496 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ (11 %).

4.4.2 *tert*-Butyl-6-(ethyloxycarbonyl)-4-(12-bromododecyloxy)-pyridin-2-ylcarbamat (38) und Benzyl-6-ethyloxycarbonyl-4-(bromododecyloxy)-pyridin-2-carbamat (39)

Diethyl-4-(12-bromododecyloxy)-pyridin-2,6-dicarboxylat (36).^[84] Unter einer Stickstoffatmosphäre wurde **12** (4.8 g, 20.0 mmol) und 1,12-Dibromdodecan **32** (66.2 g, 0.20 mol) in trockenem Aceton (500 mL) suspendiert und mit getrocknetem Kaliumcarbonat (5.5 g, 40.0 mmol) versetzt. Die Suspension wurde 14 d bei 25 °C gerührt, dann das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (200 mL) aufgenommen. Anschließend wurde nacheinander mit 1 N Salzsäure (200 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 × 200 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat/Hexan = 1:3 (v/v)] aufgereinigt.

Ausbeute: 7.8 g (16.0 mmol, 80 %), farbloser Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 7.75$ (s, 2 H, Pyridin(C3)*H* + Pyridin(C5)*H*), 4.46 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 4 H, $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.11 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$), 3.39 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2 H, $\text{Br}-\text{CH}_2-$), 1.88–1.79 (m, 4 H, Alkyl-*H*), 1.49–1.24 (m, 22 H, 16 Alkyl-*H* + 6 $-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 167.2$ (PyridinC4), 165.0 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 150.2 (PyridinC2 + PyridinC6), 114.5 (PyridinC3 + PyridinC5), 69.1 ($-\text{O}-\text{CH}_2-$), 62.5 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 34.2 ($\text{Br}-\text{CH}_2-$), 32.9 + 29.6 + 29.5 + 29.4 + 28.9 + 28.3 + 26.0 (Alkyl-C), 14.3 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ppm.

IR (ATR): 3111 (w), 2976 (w), 2920 (m), 2852 (m), 1747 (m), 1712 (s), 1592 (m), 1466 (m), 1445 (m), 1366 (m), 1340 (s), 1246 (s), 1229 (s), 1176 (m), 1159 (m), 1100 (s), 1032 (s), 1019 (s), 785 (w), 722 (w) cm^{-1} .

C,H,N,S-Elementaranalyse: $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{BrNO}_5$

Berechnet: C = 56.79 % H = 7.46 % N = 2.88 %

Gefunden: C = 56.83 % H = 7.56 % N = 2.99 %

Schmelzpunkt: 31–33 °C

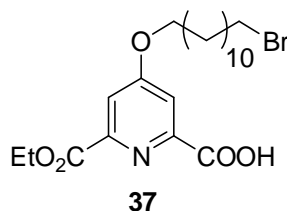
MS MALDI/TOF (m/z): 486 + 488 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %), 508 + 510 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (8 %), 524 + 526 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (4 %).

4-(12-Bromododecyloxy)-6-(ethoxycarbonyl)-picolinensäure (37).^[87] **36** (3.9 g, 8.0 mmol) wurde in Ethanol (50 mL) gelöst und zu einer Lösung von Kaliumhydroxid

4 EXPERIMENTELLER TEIL

(0.45 g, 8.0 mmol) in Ethanol (30 mL) gegeben. Die Lösung wurde kurz geschwenkt und anschließend 3 h bei 25 °C stehen gelassen, währenddessen ein farbloser Feststoff ausfiel. Das Gemisch wurde für 15 min auf –21 °C temperiert, der Feststoff abfiltriert und mit kaltem Ethanol (25 mL) nachgewaschen. Der Feststoff wurde in heißem Wasser (30 mL) gelöst und die Lösung mit 1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von ca. 2 angesäuert. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (2 × 60 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 × 50 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt.

Ausbeute: 3.1 g (6.8 mmol, 84 %), farbloser Feststoff.



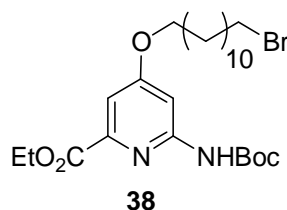
¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-*d*₆): δ = 7.69 + 7.67 (2 d, ⁴J = 2.5 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 2 H, Pyridin(C3)*H* + Pyridin(C5)*H*), 4.36 (q, ³J = 7.1 Hz, 2 H, -CO₂-CH₂-CH₃), 4.19 (t, ³J = 6.4 Hz, 2 H, -O-CH₂-), 3.51 (t, ³J = 6.7 Hz, 2 H, Br-CH₂-), 1.81–1.70 (m, 4 H, Alkyl-*H*), 1.44–1.25 (m, 19 H, 16 Alkyl-*H* + 3 -CO₂-CH₂-CH₃) ppm.

***tert*-Butyl-6-(ethyloxycarbonyl)-4-(12-bromododecyloxy)-pyridin-2-ylcarbamat (38).**^[30,85] **37** (0.66 g, 1.4 mmol) wurde in einem DMF/THF-Gemisch (10 mL, 2:3 (v/v)) gelöst, in einem Eisbad auf ca. 0 °C gekühlt und mit *N*-Methylmorpholin (0.19 mL, 1.7 mmol) gefolgt von Ethylchlorformiat (0.17 mL, 1.7 mmol) versetzt. Nach 35 min Rühren bei 0 °C wurde die Reaktionsmischung mit Natriumazid (0.14 g, 2.2 mmol) in wenig Wasser versetzt und für weitere 3 h bei 0 °C gerührt. Das THF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Dichlormethan (20 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde mit Wasser (20 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 × 20 mL) gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Azid über Phosphorpentoxid getrocknet. Unter einer Stickstoffatmosphäre wurde das erhaltene Öl in trockenem Toluol (14 mL) aufgenommen und mit *tert*-Butanol (0.16 mL, 1.6 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3.5 h zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Toluol unter vermindertem Druck

4 EXPERIMENTELLER TEIL

entfernt, der Rückstand in Dichlormethan (20 mL) aufgenommen und mit Wasser (20 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO₂, Ethylacetat/Hexan = 1:3 (v/v)] aufgereinigt.

Ausbeute: 0.24 g (0.45 mmol, 31 %), schwach gelbes Harz.



¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-*d*₆): δ = 10.10 (s, 1 H, NH), 7.59 (d, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1 H, Pyridin(C3)*H*), 7.20 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1 H, Pyridin(C5)*H*), 4.30 (q, ³*J* = 7.1 Hz, 2 H, -CO₂-CH₂-CH₃), 4.07 (t, ³*J* = 6.4 Hz, 2 H, -O-CH₂-), 3.50 (t, ³*J* = 6.7 Hz, 2 H, Br-CH₂-), 1.80–1.68 (m, 4 H, Alkyl-*H*), 1.45 (s, 9 H, Boc-*H*), 1.44–1.24 (m, 19 H, 16 Alkyl-*H* + 3 -CO₂-CH₂-CH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO-*d*₆): δ = 166.7 (PyridinC4), 164.4 (-CO₂-CH₂-CH₃), 154.2 + 152.9 (PyridinC2 + Boc-CO), 147.5 (PyridinC6), 107.3 (PyridinC5), 100.7 (PyridinC3), 79.7 (Boc-¹C), 68.1 (-O-CH₂-), 61.2 (-CO₂-CH₂-CH₃), 35.2 (Br-CH₂-), 32.3 + 28.9 + 28.7 + 28.2 + 28.1 + 28.0 + 27.5 + 25.3 (Alkyl-*C* + Boc-*C*), 14.2 (-CO₂-CH₂-CH₃) ppm.

IR (ATR): 3206 (w), 2979 (w), 2926 (m), 2854 (w), 1720 (m), 1603 (m), 1576 (m), 1531 (m), 1435 (m), 1367 (m), 1344 (m), 1231 (s), 1153 (s), 1041 (m), 992 (w), 862 (w), 786 (w) cm⁻¹.

C,H,N,S-Elementaranalyse: C₂₅H₄₁BrN₂O₅

Berechnet: C = 56.71 % H = 7.80 % N = 5.29 %

Gefunden: C = 57.21 % H = 7.78 % N = 5.35 %

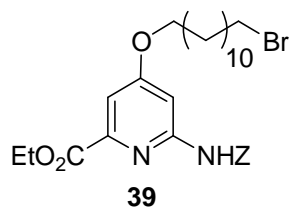
4 EXPERIMENTELLER TEIL

MS MALDI/TOF (m/z): 429 + 431 [M–Boc+H]⁺ (57 %), 473 + 475 [M–*iso*-Buten+H]⁺ (100 %), 529 + 531 [M+H]⁺ (24 %), 551 + 553 [M+Na]⁺ (17 %), 567 + 569 [M+K]⁺ (8 %).

Benzyl-6-(ethyloxycarbonyl)-4-(bromdodecyloxy)-pyridin-2-carbamat (39).^[30,85]

Verbindung **37** (6.2 g, 13.6 mmol) wurde in DMF/THF (140 mL, 2:3 (v/v)) gelöst, Die Lösung im Eisbad auf 0 °C abgekühlt, mit *N*-Methylmorpholin (1.8 mL, 16.4 mmol) und anschließend mit Ethylchlorformiat (1.6 mL, 16.3 mmol) versetzt und 45 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde Natriumazid (1.3 g, 20.5 mmol) in wenig Wasser dazugegeben und weitere 1.5 h bei 0 °C gerührt. Nun wurde THF unter vermindertem Druck entfernt (bei 30 °C Wasserbadtemperatur), der Rückstand in Ethylacetat (130 mL) aufgenommen und mit Wasser (130 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (2 × 70 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (130 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingeeengt (bei 30 °C Wasserbadtemperatur). Das erhaltene Harz wurde 1.5 h über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet und danach in trockenem Toluol (135 mL) gelöst, mit Benzylalkohol (1.6 mL, 15.0 mmol) versetzt und 15 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO₂, Ethylacetat/Hexan = 1:2 (v/v)] aufgereinigt

Ausbeute: 4.8 g (8.5 mmol, 62 %), farbloser Feststoff.



¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-d₆): δ = 10.57 (s, 1 H, NH), 7.62 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 1 H, Pyridin(C3)H), 7.49–7.29 (m, 5 H, Z-Ph-H), 7.22 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 1 H, Pyridin(C5)H), 5.16 (s, 2 H, Z-CH₂), 4.30 (q, ³J = 7.1 Hz, 2 H, -CO₂-CH₂-CH₃), 4.06 (t, ³J = 6.4 Hz, 2 H, -O-CH₂-), 3.48 (t, ³J = 6.7 Hz, 2 H, Br-CH₂-), 1.78–1.67 (m, 4 H, Alkyl-H), 1.30–1.22 (m, 19 H, 16 Alkyl-H + 3 -CO₂-CH₂-CH₃) ppm.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

^{13}C -NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO-*d*₆): δ = 166.8 (PyridinC4), 164.4 (-CO₂-CH₂-CH₃), 153.9 + 153.7 (PyridinC2 + Z-CO), 147.6 (PyridinC6), 136.6 (Z-C1), 128.5 + 128.0 + 127.6 (Z-C2-C6), 107.6 (PyridinC5), 100.9 (PyridinC3), 68.2 (-O-CH₂-), 65.8 (Z-CH₂-), 61.3 (-CO₂-CH₂-CH₃), 35.2 (Br-CH₂-), 32.3 + 28.9 + 28.7 + 28.2 + 28.1 + 27.5 + 25.3 (Alkyl-C), 14.2 (-CO₂-CH₂-CH₃) ppm.

IR (ATR): 3354 (w), 3208 (w), 3123 (w), 2922 (m), 2852 (m), 1725 (m), 1711 (m), 1604 (m), 1575 (m), 1537 (m), 1440 (m), 1367 (m), 1347 (m), 1246 (m), 1219 (s), 1145(m), 1132 (m) 1084 (m), 1071 (m), 1039 (m), 1023 (m), 996 (m), 736 (m) cm⁻¹.

C,H,N,S-Elementaranalyse: C₂₈H₃₉BrN₂O₅

Berechnet: C = 59.68 % H = 6.98 % N = 4.97 %

Gefunden: C = 59.89 % H = 7.24 % N = 4.95 %

Schmelzpunkt: 64 °C

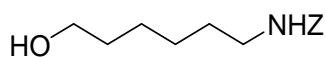
MS MALDI/TOF (*m/z*): 473 + 475 [M-Benzyl+2H]⁺ (13 %), 563 + 565 [M+H]⁺ (100 %), 585 + 587 [M+Na]⁺ (24 %).

4.4.3 *tert*-Butyl-6-(ethoxycarbonyl)-4-(benzylhexylcarbamat-1-yloxy)-pyridin-2-yl-carbamat (63)

Benzyloxycarbonyl-6-aminohexan-1-ol (60).^[90] Zu einer Lösung von 6-Aminohexan-1-ol **59** (10.4 g, 88.7 mmol) und Kaliumcarbonat (24.5 g, 0.18 mol) in Wasser (150 mL) wurde langsam Benzylchlorformiat (19.0 mL, 0.13 mol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei 25 °C gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und nacheinander mit Wasser (2 × 100 mL) und Hexan (2 × 100 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 21.1 g (83.8 mmol, 95 %), farbloser Feststoff.

4 EXPERIMENTELLER TEIL



60

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 7.36\text{--}7.29$ (m, 5 H, Z-Ph-H), 5.09 (s, 2 H, Z- CH_2), 4.76 (br s, 1 H, NH), 3.63 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2 H, HO- CH_2 -), 3.22–3.17 (m, 2 H, -NH- CH_2 -), 1.59–1.48 + 1.42–1.30 (2 m, 8 H, Alkyl-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 156.6$ (Z-CO), 136.7 (Z-C1), 128.2 + 128.6 (Z-C2-C6), 66.7 (Z- CH_2 -), 62.8 (HO- CH_2 -), 41.0 (-NH- CH_2 -), 25.4 + 26.5 + 30.0 + 32.6 (Alkyl-C) ppm.

C,H,N,S-Elementaranalyse: $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_3$

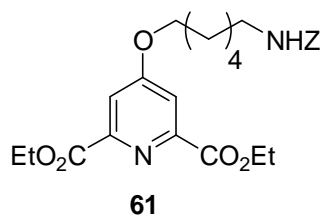
Berechnet: C = 66.91 % H = 8.42% N = 5.57 %

Gefunden: C = 66.82 % H = 8.44 % N = 5.53 %

MS MALDI/TOF (m/z): 252 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (62 %), 274 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100 %), 290 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (50 %).

Benzyl-6-(2,6-di(ethoxycarbonyl)pyridin-4-yloxy)-hexylcarbamat (61).^[33] **60** (9.9 g, 39.2 mmol), **12** (7.8 g, 32.7 mmol) und Triphenylphosphan (17.2 g, 65.3 mmol) wurden in THF (300 mL) gelöst. DIAD (12.9 mL, 65.3 mmol) wurde tropfenweise hinzugefügt und anschließend das Gemisch für 20 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Dichlormethan (200 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde nacheinander mit 0.5 N Natronlauge (200 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2×200 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde zweimal säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat/Hexan = 2:1 (v/v)] aufgereinigt.

Ausbeute: 13.2 g (28.0 mmol, 86 %), leicht gelbes Harz.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 7.76 (s, 2 H, Pyridin(C3)*H* + Pyridin(C5)*H*), 7.36–7.26 (m, 5 H, Z-Ph-*H*), 5.09 (s, 2 H, Z- CH_2), 4.75 (br s, 1 H, -NH), 4.47 (q, 3J = 7.1 Hz, 4 H, $-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 4.12 (t, 3J = 6.1 Hz, 2 H, $-\text{O-CH}_2-$), 3.24–3.19 (m, 2 H, $-\text{NH-CH}_2-$), 1.87–1.80 (m, 2 H, Alkyl-*H*), 1.60–1.38 (m, 12 H, 6 Alkyl-*H* + 6 $-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 167.1 (PyridinC4), 165.0 ($-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 156.5 (Z-CO), 150.3 (PyridinC2 + PyridinC6), 136.7 (Z-C1), 128.7 + 128.3 (Z-C2-C6), 114.5 (PyridinC3 + PyridinC5), 68.9 ($-\text{O-CH}_2-$), 66.8 (Z- CH_2-), 62.6 ($-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 41.1 ($-\text{NH-CH}_2-$), 30.1 + 28.8 + 26.5 + 25.7 (Alkyl-C), 14.3 ($-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) ppm.

IR (ATR): 3348 (w), 2981 (w), 2938 (w), 2869 (w), 1714 (s), 1594 (m), 1527 (m), 1446 (m), 1372 (m), 1341 (s), 1237 (s), 1155 (m), 1103 (s), 1027 (s), 787 (m), 734 (m), 699 (m) cm^{-1} .

C,H,N,S-Elementaranalyse: $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7 \times 0.25 \text{H}_2\text{O}$

Berechnet: C = 62.95 % H = 6.87% N = 5.87 %

Gefunden: C = 62.89 % H = 6.87 % N = 5.94 %

MS MALDI/TOF (m/z): 473 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %), 495 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (11 %).

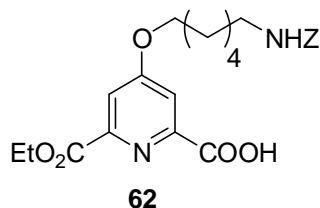
Benzyl-6-(2-ethoxycarbonyl-6-carboxypyridin-4-yloxy)-hexylcarbamate (62).^[91]

Es wurde **61** (4.7 g, 10.0 mmol) und gemörserte NaOH (0.44 g, 11.0 mmol) in Ethanol/1,4-Dioxan (90 mL, 1:2 (v/v)) gelöst und die Lösung 1 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser (20 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3 × 15 mL) gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Durch Entfernen des Lösungsmittels konnte nicht umgesetztes Edukt **61** zurückgewonnen werden. Die wässrige

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Phase wurde mit 3 %iger KHSO_4 -Lösung auf einen pH-Wert von ca. 2 eingestellt und mit Ethylacetat ($3 \times 15 \text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl -Lösung (30 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt.

Ausbeute: 3.3 g (7.5 mmol, 75 %), gelbes Harz.



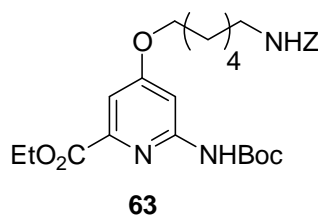
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 7.87$ (s, 1 H, $-\text{COOH}$), 7.82 + 7.78 (2 d, $^4J_1 = 2.3 \text{ Hz}$, $^4J_2 = 2.3 \text{ Hz}$, 2 H, Pyridin(C3)*H* + Pyridin(C5)*H*), 7.34–7.28 (m, 5 H, Z-Ph-*H*), 5.08 (s, 2 H, Z- CH_2), 4.85 (br s, 1 H, $-\text{NH}$), 4.46 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 2 H, $-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 4.14–4.12 (m, 2 H, $-\text{O-CH}_2\text{-}$), 3.23–3.19 (m, 2 H, $-\text{NH-CH}_2\text{-}$), 1.85–1.81 (m, 2 H, Alkyl-*H*), 1.57–1.37 (m, 9 H, 6 Alkyl-*H* + 3 $-\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) ppm.

***tert*-Butyl-6-(ethoxycarbonyl)-4-(benzylhexylcarbamate-1-yloxy)pyridin-2-yl-carbamate (63).**^[30,85] Es wurde **62** (3.8 g, 8.5 mmol) in DMF/THF (85 mL, 2/3 (v/v)) gelöst, die Lösung auf 0 °C im Eisbad abgekühlt, mit *N*-Methylmorpholin (1.1 mL, 10.2 mmol) gefolgt von Ethylchlorformiat (1.0 mL, 10.2 mmol) versetzt und 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde Natriumazid (0.83 g, 12.8 mmol) in wenig Wasser dazugegeben und weitere 3.5 h bei 0 °C gerührt. Nun wurde THF unter vermindertem Druck entfernt (bei 30 °C Wasserbadtemperatur), der Rückstand in Ethylacetat (50 mL) aufgenommen und mit Wasser ($2 \times 100 \text{ mL}$) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt (bei 30 °C Wasserbadtemperatur). Das erhaltene Harz wurde 1.5 h über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet und danach in trockenem Toluol (100 mL) gelöst, mit *tert*-Butanol (0.90 mL, 9.4 mmol) versetzt und 4.5 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat/Hexan = 1:2 (v/v)] aufgereinigt. Analysenreines Material wurde mittels präparativer HPLC erhalten (HPLC-Gradient zur

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Aufreinigung: 0–5 min, 60 % organisch; 5–15 min, linearer Anstieg auf 80 % organisch; 15–30 min, linearer Anstieg auf 95 % organisch; 30–45 min, 95 % organisch; 45–46 min, linearer Abstieg auf 60 % organisch; 46–51 min, 60 % organisch). Aufgrund der hohen Viskosität des Produktes konnten nicht alle Lösungsmittelreste aus dem Produkt entfernt werden (in ^1H -, ^{13}C -NMR sowie C,H,N,S-Elementaranalyse berücksichtigt).

Ausbeute: 1.3 g (2.5 mmol, 29 %), leicht gelbes Harz.



^1H -NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 7.68 (br s, 1 H, Pyridin(C3)*H*), 7.36–7.29 (m, 6 H, 5 *Z*-Ph-*H* + Pyridin(C5)*H*), 5.09 (s, 2 H, *Z*- CH_2), 4.76 (br s, 1 H, -*NH-Z*), 4.43 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2 H, - $\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 4.07 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 2 H, - O-CH_2 -), 3.23–3.18 (m, 2 H, -*NH-CH}_2*-), 2.10 (s, ACN), 1.83–1.76 (m, 2 H, Alkyl-*H*), 1.57–1.34 (m, 18 H, 9 Boc-*H* + 6 Alkyl-*H* + 3 - $\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) ppm.

^{13}C -NMR (101 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 167.8 (PyridinC4), 165.0 (- $\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 156.5 (*Z*-CO), 153.6 (PyridinC2), 152.5 (Boc-CO), 147.3 (PyridinC6), 136.7 (*Z*-C1), 128.6 + 128.2 (*Z*-C2-C6), 109.1 (PyridinC5), 100.3 (PyridinC3), 81.3 (Boc- ^1C), 68.5 (- O-CH_2 -), 66.7 (*Z*- CH_2 -), 62.0 (- $\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 41.1 (*NH-CH}_2*-), 30.0 + 28.8 (Alkyl-C), 28.3 (Boc-C), 26.5 + 25.7 (Alkyl-C), 14.4 (- $\text{CO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.1 (ACN) ppm.

IR (ATR): 3328 (w), 3204 (w), 3126 (w), 2979 (w), 2936 (w), 2863 (w), 2330 (w), 1715 (s), 1603 (m), 1575 (m), 1526 (m), 1450 (m), 1436 (m), 1368 (m), 1344 (m), 1231 (s), 1146 (s), 1077 (m), 1034 (s), 1027 (s), 991 (m), 865 (m), 773 (m), 751 (m), 734 (m), 696 (m) cm^{-1} .

C,H,N,S-Elementaranalyse: $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_7 \times 0.15 \text{ H}_2\text{O} \times 0.001 \text{ ACN}$

Berechnet: C = 62.62 % H = 7.25% N = 8.14 %

Gefunden: C = 62.38 % H = 6.76 % N = 7.99 %

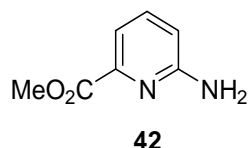
4 EXPERIMENTELLER TEIL

MS MALDI/TOF (m/z): 416 $[M\text{-Boc}+H]^+$ (100 %), 460 $[M\text{-}i\text{-}Buten+H]^+$ (92 %), 516 $[M+H]^+$ (83 %), 538 $[M+Na]^+$ (93 %), 554 $[M+K]^+$ (32 %).

4.4.4 Methyl-6-aminopyridin-2-carboxylat (42)

Es wurde 6-Aminopicolinsäure **41** (6.9 g, 50.0 mmol) in Methanol (70 mL) suspendiert und mit $H_2SO_{4\text{konz}}$ (5 mL) versetzt, wobei das Edukt in Lösung ging. Nun wurde 75 h zum Rückfluss erhitzt, das Gemisch nach Abkühlen auf 25 °C mit 10 %iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (150 mL) versetzt und mit Dichlormethan (4×150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösung anschließend zur Trockne eingeeengt.

Ausbeute: 5.0 g (32.6 mmol, 65 %), leicht gelber Feststoff.

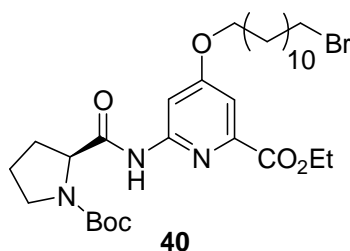


1H -NMR (400 MHz, 25 °C, $DMSO\text{-}d_6$): δ = 7.51 (dd, $^3J = 8.3$ Hz, $^3J = 7.3$ Hz, 1 H, Pyridin(C4)*H*), 7.18 (dd, $^3J = 7.3$ Hz, $^4J = 0.8$ Hz, 1 H, Pyridin(C5)*H*), 6.65 (dd, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 0.8$ Hz, 1 H, Pyridin(C3)*H*), 6.30 (s, 2 H, $-NH_2$), 3.79 (s, 3 H, $-CO_2\text{-}CH_3$) ppm.

4.4.5 Synthese der Dipeptide

Boc-[Pro-BAPA]-OEt 40. Verbindung **39** (0.36 g, 0.76 mmol) wurde entsprechend der allgemeinen Vorschrift 4.2.4 am *N*-Terminus entschützt und das erhaltene Produkt mit Boc-L-Pro-OH **16** (0.20 g, 0.91 mmol) und PyCloP (0.38 g, 0.91 mmol) in trockenem Dichlormethan (12 mL) gelöst. Nun wurde mit DIEA (0.41 mL, 2.4 mmol) ein pH-Wert von ca. 10 eingestellt und die Lösung 7 d bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat/Hexan = 1:1 (v/v)] aufgereinigt.

Ausbeute: 0.36 g (0.58 mmol, 76 %), farbloser Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 10.90 + 10.86 (2 s, 1 H, -NH), 7.94 + 7.89 (2 s, 1 H, Pyridin(C3)*H*), 7.28 (s, 1 H, Pyridin(C5)*H*), 4.48–4.40 (m, 1 H, Pro(C_α)*H*), 4.32 (q, 3J = 7.1 Hz, 2 H, -CO₂-CH₂-CH₃), 4.08 (t, 3J = 6.3 Hz, 2 H, -O-CH₂-), 3.50 (t, 3J = 6.7 Hz, 2 H, Br-CH₂-), 3.42–3.29 (m, 2 H, Pro(C_δ)*H*), 2.21–2.12 (m, 1 H, Pro(C_β)*H*), 1.89–1.69 (m, 7 H, 2 Pro(C_γ)*H* + 1 Pro(C_β)*H* + 4 Alkyl-*H*), 1.38–1.24 (m, 28 H, 9 Boc-*H* + 3 -CO₂-CH₂-CH₃ + 16 Alkyl-*H*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 173.1 + 172.5 (-NH-CO-Pro), 166.8 (PyridinC4), 164.3 (-CO₂-CH₂-CH₃), 153.6 + 153.5 (Boc-CO), 153.1 (PyridinC2), 147.5 + 147.4 (PyridinC6), 108.1 + 108.0 (PyridinC5), 101.9 + 101.8 (PyridinC3), 78.7 + 78.5 (Boc- ^1C), 68.2 (-O-CH₂-), 61.3 (-CO₂-CH₂-CH₃), 59.9 + 59.6 (Pro C_α), 46.8 + 46.6 (Pro C_δ), 35.2 (Br-CH₂-), 32.3 (Alkyl-C), 30.9 + 30.2 (Pro C_β), 28.9 + 28.7 + 28.2 + 28.1 (Alkyl-C), 27.9 (Boc-C), 27.5 + 25.3 (Alkyl-C), 23.9 + 23.3 (Pro C_γ), 14.2 (-CO₂-CH₂-CH₃) ppm.

IR (ATR): 3119 (w), 3055 (w), 2972 (w), 2922 (m), 2851 (w), 1739 (m), 1711 (m), 1655 (m), 1577 (m), 1547 (m), 1475 (w), 1427 (s), 1362 (m), 1342 (m), 1204 (s), 1163 (m), 1132 (s), 1112 (m), 1026 (m), 859 (m) cm^{-1} .

C,H,N,S-Elementaranalyse: C₃₀H₄₈BrN₃O₆

Berechnet: C = 57.50 % H = 7.72% N = 6.71 %

Gefunden: C = 57.42 % H = 7.72 % N = 6.71 %

Schmelzpunkt: 80–81 °C

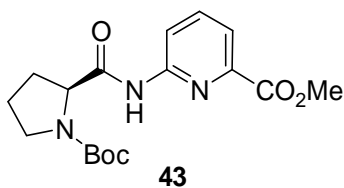
4 EXPERIMENTELLER TEIL

MS MALDI/TOF (m/z): 570 + 572 [M -*iso*-Buten+ H] $^+$ (14 %), 627 + 629 [M + H] $^+$ (100 %), 649 + 651 [M +Na] $^+$ (15 %), 665 + 667 [M +K] $^+$ (2 %).

Drehwert ($c = 1$, Chloroform): $[\alpha]_D^{22} = -50.6$

Boc-[Pro-APA]-OMe 43.^[81] Verbindung **42** (3.1 g, 20.2 mmol), Boc-L-Pro-OH **16** (5.4 g, 25.1 mmol) und PyCloP (10.6 g, 25.1 mmol) wurden in trockenem Dichlormethan (400 mL) gelöst und die Lösung mit DIEA (9.2 mL, 52.5 mmol) auf einen pH-Wert von ca. 10 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde 8 d bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat] aufgereinigt.

Ausbeute: 7.0 g (20.1 mmol, 99 %), farbloser Feststoff.



1H -NMR (600 MHz, 100 °C, DMSO- d_6): $\delta = 10.45$ (s, 1 H, -NH), 8.27 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, Pyridin(C3)H), 7.95 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, Pyridin(C4)H), 7.74 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1 H, Pyridin(C5)H), 4.49–4.47 (m, 1 H, Pro(C α)H), 3.89 (s, 3 H, -CO $_2$ -CH $_3$), 3.48–3.37 (m, 2 H, Pro(C δ)H), 2.25–2.19 (m, 1 H, Pro(C β)H), 1.96–1.88 (m, 2 H, 1 Pro(C γ)H + 1 Pro(C β)H), 1.85–1.79 (m, 1 H, Pro(C γ)H), 1.35 (s, 9 H, Boc-H) ppm.

^{13}C -NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): $\delta = 172.6$ (-NH-CO-Pro), 164.8 (-CO $_2$ -CH $_3$), 153.3 (Boc-CO), 152.7 (PyridinC2), 145.7 (PyridinC6), 139.6 (PyridinC4), 120.3 (PyridinC5), 117.2 (PyridinC3), 78.5 (Boc- 1C), 59.7 (ProC α), 52.3(-CO $_2$ -CH $_3$), 46.6 (ProC δ), 30.5 (ProC β), 28.0 (Boc-C), 23.6 (ProC γ) ppm.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

IR (ATR): 3208 (w), 3053 (w), 2980 (w), 2879 (w), 1745 (w), 1729 (m), 1713 (m), 1658 (m), 1577 (m), 1542 (m), 1457 (m), 1425 (s), 1367 (m), 1302 (s), 1244 (m), 1184 (m), 1152 (s), 1132 (s), 1077 (m), 771 (s) cm^{-1} .

C,H,N,S-Elementaranalyse: $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5$

Berechnet: C = 58.44 % H = 6.64% N = 12.03 %

Gefunden: C = 58.14 % H = 6.72 % N = 11.75 %

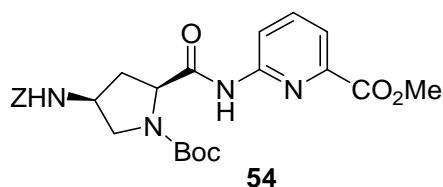
Schmelzpunkt: 115 °C

MS MALDI/TOF (m/z): 350 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %), 372 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (21 %), 388 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (1 %).

Drehwert ($c = 2$, Chloroform): $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -177.5$

Boc-(((4S)-Z-Apro)-APA)-OMe 54.^[81] Verbindung **17** (4.9 g, 13.4 mmol) wurde mit **42** (2.0 g, 13.4 mmol) in trockenem Dichlormethan (270 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde PyCloP (6.8 g, 16.1 mmol) gegeben und das Gemisch mit DIEA (6.1 mL, 34.9 mmol) auf einen pH-Wert von ca. 10 eingestellt. Es wurde 11 d bei 25 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulen-chromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat] aufgereinigt.

Ausbeute: 6.3 g (12.7 mmol, 85 %), farbloser Feststoff.



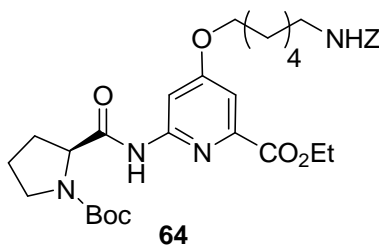
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, DMSO-d_6): $\delta = 11.03 + 10.97$ (2 s, 1 H, -NH), 8.36–8.29 (m, 1 H, Pyridin(C3)H), 8.03–7.96 (m, 1 H, Pyridin(C4)H), 7.79 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1 H, Pyridin(C5)H), 7.51–7.33 (m, 5 H, Z-Ph-H), 5.01 (s, 2 H, Z- CH_2 -) 4.45–4.41 (m, 1 H,

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Pro(C_αH), 4.07–3.99 (m, 1 H, Aro(C_γH)), 3.87 (s, 3 H, -CO₂-CH₃), 3.74–3.63 (m, 1 H, Apro(C_δH)), 3.15–3.10 (m, 1 H, Pro(C_δH)), 2.53–2.46 (m, 1 H, Apro(C_βH)), 1.82–1.74 (m, 1 H, 1 Pro(C_βH)), 1.38 + 1.23 (2 s, 9 H, Boc-H) ppm.

Boc-[Pro-CAPA]-OEt 64. Verbindung **63** (0.52 g, 1.0 mmol) wurde entsprechend 4.2.2 am *N*-Terminus entschützt und das Produkt mit Boc-L-Pro-OH **16** (0.28 g, 1.3 mmol) in trockenem Dichlormethan (20 mL) gelöst. Zu der Lösung wurde PyCloP (0.55 g, 1.3 mmol) gegeben und das Gemisch mit DIEA (0.58 mL, 1.3 mmol) auf einen pH-Wert von ca. 10 eingestellt. Es wurde 10 d bei 25 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO₂, Ethylacetat/Hexan = 2:1 (v/v)] aufgereinigt.

Ausbeute: 0.30 g (0.49 mmol, 48 %), farbloses Harz.



¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-d₆): δ = 10.88 + 10.84 (2 s, 1 H, NH), 7.94 + 7.88 (2 s, 1 H, Pyridin(C3H)), 7.36–7.22 (m, 6 H, 5 *Z*-Ph-H + 1 Pyridin(C5H)), 5.09 + 4.99 (2 s, 2 H, *Z*-CH₂-), 4.47–4.40 (m, 1 H, Pro(C_ωH)), 4.32 (q, ³J = 7.1 Hz, 2 H, -CO₂-CH₂-CH₃), 4.07 (t, ³J = 6.0 Hz, 2 H, -O-CH₂-), 3.41–3.28 (m, 2 H, Pro(C_δH)), 3.01–2.96 (m, 2 H, -NH-CH₂-), 2.20–2.12 (m, 1 H, Pro(C_βH)), 1.88–1.65 (m, 5 H, 2 Pro(C_γH) + 2 Alkyl-H + 1 Pro(C_βH)), 1.43–1.25 (m, 18 H, 9 Boc-H + 6 Alkyl-H + 3 -CO₂-CH₂-CH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO-d₆): δ = 173.2 + 172.6 (NH-CO-Pro), 166.9 (PyridinC4), 164.4 (-CO₂-CH₂-CH₃), 156.2 (*Z*-CO), 153.6 (PyridinC2), 153.2 (Boc-CO), 147.6 (PyridinC6), 137.4 (*Z*-C1), 128.4 + 127.8 (*Z*-C2-C6), 108.1 (PyridinC5), 101.9 (PyridinC3), 78.8 + 78.6 (Boc-^tC), 68.2 (-O-CH₂-), 65.2 (*Z*-CH₂-), 61.4 (-CO₂-CH₂-CH₃), 60.0 + 59.7 (ProC_α), 46.6 (ProC_δ), 40.2 (-NH-CH₂-), 31.0 + 30.3 (ProC_β), 29.4 (Alkyl-C), 28.3 + 28.0 (Boc-C + Alkyl-C), 26.0 + 25.1 (Alkyl-C), 24.0 + 23.4 (ProC_γ), 14.2 (-CO₂-CH₂-CH₃) ppm.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

IR (ATR): 3311 (w), 2937 (w), 2873 (w), 1691 (s), 1603 (m), 1573 (m), 1531 (m), 1435 (m), 1395 (s), 1368 (s), 1342 (s), 1242 (s), 1199 (s), 1162 (s), 1121 (s), 1034 (m), 863 (w), 788 (w), 773 (w), 754 (w), 697 (m) cm^{-1} .

C,H,N,S-Elementaranalyse: $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_8 \times 0.5 \text{H}_2\text{O}$

Berechnet: C = 61.82 % H = 7.30% N = 9.01 %

Gefunden: C = 61.79 % H = 7.23 % N = 8.74 %

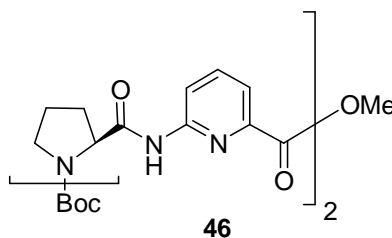
MS MALDI/TOF (m/z): 613 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %), 635 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (41 %), 651 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (15 %).

Drehwert ($c = 1$, Methanol): $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -47.8$

4.4.6 Synthese des Tetrapeptids und der linearen Hexapeptide

Boc-[Pro-APA]₂-OMe 46.^[81] Es wurde ein Äquivalent **43** (0.70 g, 2.0 mmol) am *N*-Terminus entsprechend 4.2.2 entschützt und ein weiteres Äquivalent **43** (0.70 g, 2.0 mmol) am *C*-Terminus entsprechend 4.2.3 entschützt. Die erhaltenen Produkte wurden in trockenem Dichlormethan (40 mL) gelöst, mit PyCloP (1.0 g, 2.4 mmol) versetzt und die Lösung mit DIEA (1.2 mL, 6.8 mmol) auf einen pH-Wert von ca. 9 eingestellt. Sie wurde 1 d bei 25 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO_2 , Dichlormethan/Methanol = 30:1 (v/v)] aufgereinigt. Der erhaltene Feststoff wurde im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 1.1 g (1.9 mmol, 97 %), farbloser Feststoff.

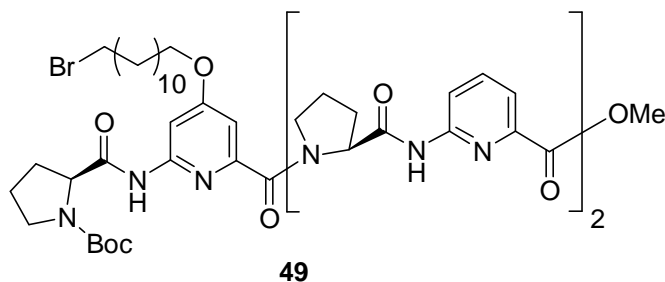


4 EXPERIMENTELLER TEIL

MS MALDI/TOF (m/z): 552 $[M-CH_3]^+$ (2 %), 568 $[M+H]^+$ (100 %), 590 $[M+Na]^+$ (51 %), 606 $[M+K]^+$ (16 %).

Boc-[Pro-BAPA]-[Pro-APA]₂-OMe 49. Es wurde **40** (0.31 g, 0.50 mmol) entsprechend 4.2.3 am C-Terminus sowie **46** (0.28 g, 0.50 mmol) entsprechend 4.2.2 am N-Terminus entschützt. Die erhaltenen Produkte wurden in entgastem DMF (15 mL) gelöst, mit TBTU (0.17 g, 0.53 mmol) versetzt und die Lösung mit DIEA (0.27 mL, 1.6 mmol) auf einen pH-Wert von ca. 10 eingestellt. Das Gemisch wurde 3.5 h bei 25 °C gerührt und anschließend auf Wasser (75 mL) gegossen. Der pH-Wert der Suspension wurde mit 1 N Salzsäure auf ca. 4 eingestellt und es wurde 10 min gerührt. Der ausgefallene, oben schwimmende Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.43 g (0.41 mmol, 81 %), farbloser Feststoff.

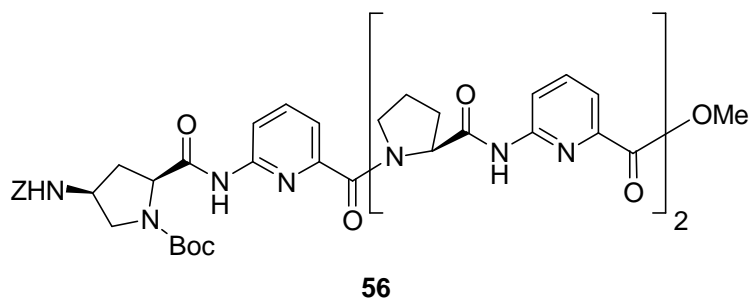


MS MALDI/TOF (m/z): 947 + 949 $[M-Boc+H]^+$ (9 %), 1047 + 1049 $[M+H]^+$ (33 %), 1069 + 1071 $[M+Na]^+$ (100 %), 1085 + 1087 $[M+K]^+$ (61 %).

Boc-[(4S)-Z-Apro)-APA]-[Pro-APA]₂-OMe 56.^[81] Verbindung **54** (3.0 g, 6.0 mmol) wurde entsprechend 4.2.3 am C-Terminus und **46** (3.8 g, 6.7 mmol) entsprechend 4.2.2 am N-Terminus entschützt und die Produkte in entgastem DMF (120 mL) gelöst. Nach Zugabe von TBTU (2.1 g, 6.6 mmol) wurde die Lösung mit DIEA (5.8 mL, 33.2 mmol) auf einen pH-Wert von ca. 10 eingestellt. Nun wurde 3 h bei 25 °C gerührt und anschließend das Gemisch unter Rühren auf Wasser (900 mL) gegossen. Der pH-Wert der Suspension wurde mit 1 N Salzsäure auf ca. 2 eingestellt und der ausgefallene, oben schwimmende, farblose Feststoff abfiltriert. Der Feststoff wurde mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

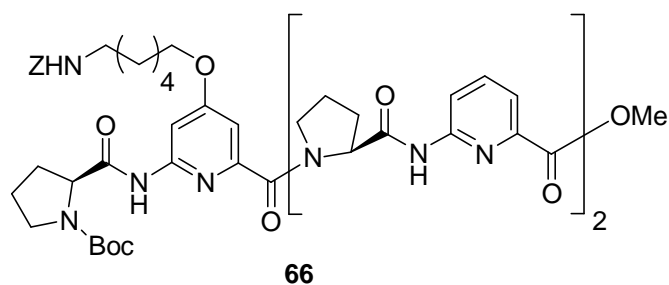
Ausbeute: 4.4 g (4.7 mmol, 79 %), farbloser Feststoff.



MS MALDI/TOF (m/z): 933 $[M+H]^+$ (28 %), 955 $[M+Na]^+$ (100 %), 971 $[M+K]^+$ (41 %).

Boc-[Pro-CAPA]-[Pro-APA]₂-OMe 66. Verbindung **64** (0.31 g, 0.50 mmol) wurde entsprechend 4.2.3 am C-Terminus sowie **46** (0.34 g, 0.60 mmol) entsprechend 4.2.2 am N-Terminus entschützt. Die erhaltenen Produkte wurden in entgastem DMF (10 mL) gelöst, mit TBTU (0.16 g, 0.50 mmol) versetzt und die Lösung mit DIEA (0.40 mL, 2.3 mmol) auf einen pH-Wert von ca. 10 eingestellt. Das Gemisch wurde 3 h bei 25 °C gerührt und anschließend auf Wasser (100 mL) gegossen. Der pH-Wert wurde mit 1 N Salzsäure auf ca. 4 eingestellt und 2.5 h gerührt. Der ausgefallene, oben schwimmende Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.41 g (0.39 mmol, 78 %), farbloser Feststoff.



MS MALDI/TOF (m/z): 933 $[M-Boc+H]^+$ (6 %), 1033 $[M+H]^+$ (22 %), 1055 $[M+Na]^+$ (100 %), 1071 $[M+K]^+$ (9 %).

4.4.7 Synthese und Derivatisierung der Cyclopeptide

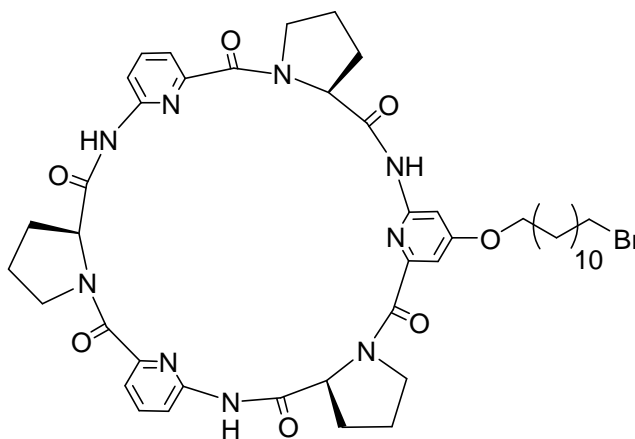
cyclo-[Pro-BAPA]-[Pro-APA]₂ CP4. Verbindung **49** (0.22 g, 0.21 mmol) wurde zunächst am C-Terminus gemäß 4.2.3 und anschließend am N-Terminus nach 4.2.2

4 EXPERIMENTELLER TEIL

entschützt. Das erhaltene Produkt (0.15 g, 0.14 mmol) wurde unter einer Stickstoffatmosphäre in entgastem DMF (6.5 mL) gelöst und mit DIEA (0.15 mL, 0.86 mmol) versetzt. Diese Lösung wurde bei 80 °C unter einer Stickstoffatmosphäre mittels eines Perfusors innerhalb von 40 min zu einer Lösung von TBTU (0.24 g, 0.75 mmol) und DIEA (60 µL, 0.34 mmol) in entgastem DMF (30 mL) zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 2.5 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit Aceton als Eluens vorgereinigt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Chromatographie [RP-8, Gradient H₂O/1,4-Dioxan = 10:1 → 5:1 → 1:1 → 1:5 → 1:10 (v/v)] und schließlich mittels präparativer HPLC aufgereinigt (HPLC-Gradient zur Aufreinigung: 0 min, 30 % organisch; 0–3 min, linearer Anstieg auf 50 % organisch; 3–25 min, linearer Anstieg auf 70 % organisch; 25–40 min, 70 % organisch; 40–42 min, linearer Anstieg auf 100 % organisch; 42–47 min, 100 % organisch; 47–49 min, linearer Abstieg auf 30 % organisch; 49–54 min, 30 % organisch).

Ausbeute: 18 mg (20 µmol, 14 %), farbloser Feststoff; Produkt **CP4**.

18 mg (19 µmol, 13 %), farbloser Feststoff; Nebenprodukt **CP5**.



CP4

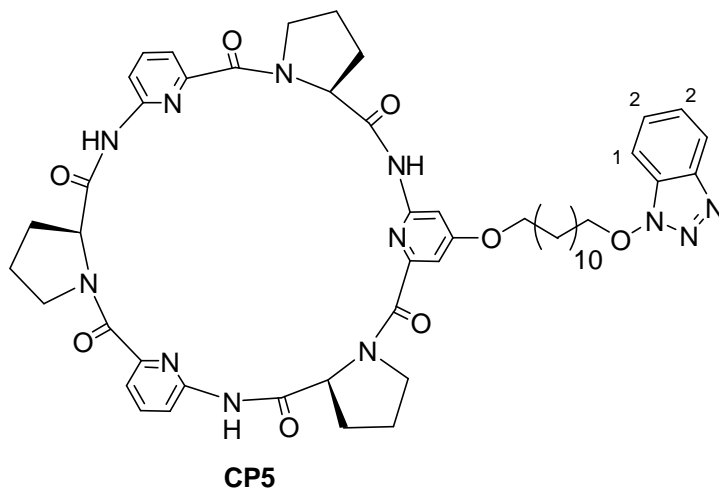
¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-d₆): δ = 9.83 (br s, 3 H, -NH), 7.76–7.70 (m, 2 H, APA(C₄)H), 7.46–7.42 (m, 2 H, APA(C₃)H), 7.37 + 7.26 (2 d, ³J₁ = 8.0 Hz, ³J₂ = 7.9 Hz, 2 H, APA(C₅)H), 6.98 + 6.87 (d + s, ⁴J = 2.0 Hz, BAPA(C₃ + C₅)H), 5.73–5.63 (m, 3 H, Pro(C_α)H), 3.92 (t, ³J = 6.3 Hz, 2 H, -O-CH₂-), 3.72–3.54 (m, 8 H, 6 Pro(C_δ)H + 2 Br-CH₂-), 2.60–2.54 (m, 3 H, Pro(C_β)H), 2.07 (s, ACN), 2.06–1.95 (m, 3 H, Pro(C_β)H), 1.88–1.60 (m, 10 H, 6 Pro(C_γ)H + 4 Alkyl-H), 1.37–1.25 (m, 16 H, Alkyl-H) ppm.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

C,H,N,S-Elementaranalyse: $C_{45}H_{56}BrN_9O_7 \times 0.25 H_2O \times 0.02 ACN$

Berechnet: C = 59.36 % H = 6.20% N = 14.13 %

Gefunden: C = 59.69 % H = 6.69 % N = 13.80 %



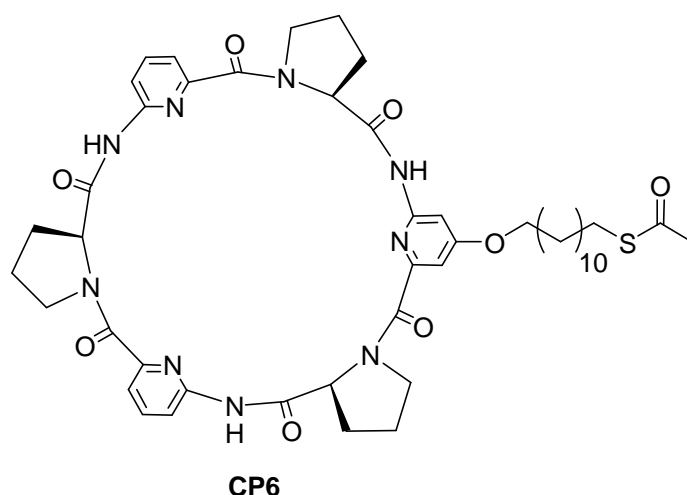
1H -NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 9.73 (br s, 3 H, -NH), 8.06 + 7.81 (2 d, $^3J_1 = 8.4$ Hz, $^3J_2 = 8.3$ Hz, 2 H, Benzotriazol(C1)H), 7.76–7.69 (m, 2 H, APA(C4)H), 7.60 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 1 H, Benzotriazol(C2)H), 7.48–7.42 (m, 3 H, 2 APA(C3)H + 1 Benzotriazol(C2)H), 7.37 + 7.26 (2 d, $^3J_1 = 7.9$ Hz, $^3J_2 = 8.2$ Hz, 2 H, APA(C5)H), 6.99 + 6.88 (d + s, $^4J = 1.7$ Hz, BAPA(C3 + C5)H), 5.78–5.63 (m, 3 H, Pro(C_α)H), 4.54 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2 H, Benzotriazol-O-CH $_2$ -), 3.92 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2 H, -O-CH $_2$ -), 3.71–3.52 (m, 6 H, Pro(C_β)H), 2.07 (s, ACN), 2.05–1.94 (m, 3 H, Pro(C_β)H), 1.87–1.72 (m, 6 H, Pro(C_γ)H), 1.60–1.45 (m, 4 H, Alkyl-H), 1.37–1.19 (m, 16 H, Alkyl-H) ppm.

MS MALDI/TOF (m/z): 837 [M–O-Benzotriazol+H] $^+$ (18 %), 852 [M–Benzotriazol+H] $^+$ (75 %), 874 [M–Benzotriazol+Na] $^+$ (77 %), 890 [M–Benzotriazol+K] $^+$ (31 %), 969 [M+H] $^+$ (92 %), 991 [M+Na] $^+$ (100 %), 1007 [M+K] $^+$ (43 %).

cyclo-{{[Pro-TAAPA]-[Pro-APA] $_2$ } **CP6**. Verbindung **CP4** (6.0 mg, 6.5 μ mol) wurde in DMF (1 mL) gelöst, mit Kaliumthioacetat (2.4 mg, 21.0 μ mol) versetzt und die Lösung 6 d bei 80 °C gerührt. Aufgrund des kleinen Ansatzes wurde keine Aufarbeitung durchgeführt.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Ausbeute: Produkt qualitativ im Massenspektrum nachgewiesen.



MS MALDI/TOF (m/z): 911 $[M+H]^+$ (99 %), 933 $[M+Na]^+$ (100 %), 949 $[M+K]^+$ (44 %).

cyclo-{{[Pro-TAAPA]-[Pro-APA]₂} **CP6**. Verbindung **CP5** (8.2 mg, 8.5 μ mol) wurde in DMF (1 mL) gelöst, die Lösung mit Kaliumthioacetat (2.9 mg, 25.4 μ mol) versetzt und 6 d bei 80 °C gerührt. Aufgrund des kleinen Ansatzes wurde keine Aufarbeitung durchgeführt.

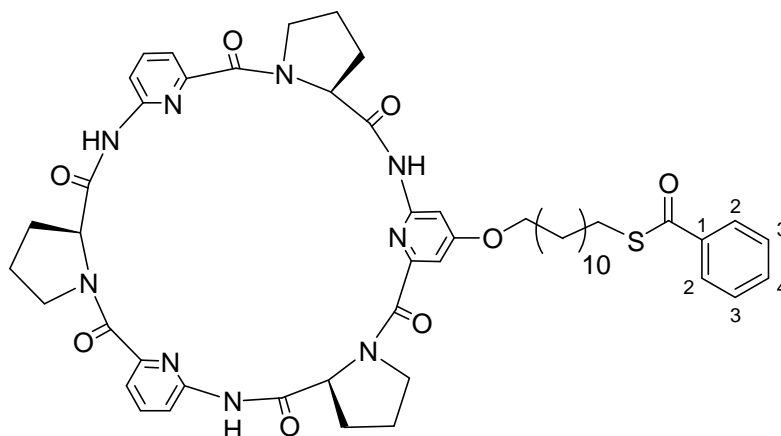
Ausbeute: Verfolgung mittels Massenspektrometrie und HPLC zeigte, dass kein Umsatz stattfand.

cyclo-{{[Pro-TBAPA]-[Pro-APA]₂} **CP2**. Verbindung **49** (0.62 g, 0.59 mmol) wurde gemäß 4.2.3 am C-Terminus entschützt und das noch feuchte Produkt mit Kaliumthiobenzoat (0.12 g, 0.65 mmol) in 1,4-Dioxan (20 mL) gelöst. Das Gemisch wurde 21 h bei 25 °C gerührt, danach mit H₂O (20 mL) versetzt und das 1,4-Dioxan unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Suspension wurde mit Ethylacetat (4 \times 30 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt. Das erhaltene gelbe Harz wurde entsprechend 4.2.2 am N-Terminus entschützt und das erhaltene Produkt (0.79 g, 0.59 mmol) unter einer Stickstoffatmosphäre in entgastem DMF (26 mL) gelöst und mit DIEA (0.63 mL, 3.6 mmol) versetzt. Diese Lösung wurde bei 80 °C unter einer Stickstoffatmosphäre mittels eines Perfusors innerhalb von 5 h zu einer Lösung von TBTU (1.0 g, 3.1 mmol) und DIEA (0.25 mL, 1.4 mmol) in entgastem DMF (120 mL) zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde

4 EXPERIMENTELLER TEIL

noch 1 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit Aceton als Eluens vorgereinigt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Chromatographie [RP-8, Gradient H₂O/1,4-Dioxan = 10:1 → 5:1 → 2:1 → 1:1 → 1:1.5 → 1:2 (v/v)] und schließlich mittels präparativer HPLC aufgereinigt (HPLC-Gradient zur Aufreinigung: 0 min, 30 % organisch; 0–10 min, linearer Anstieg auf 73 % organisch; 10–25 min, linearer Anstieg auf 75 % organisch; 25–35 min, 75 % organisch; 35–45 min, linearer Anstieg auf 95 % organisch; 45–55 min, 95 % organisch; 55–57 min, linearer Abstieg auf 30 % organisch; 57–62 min, 30 % organisch).

Ausbeute: 28 mg (28 μmol, 5 %), farbloser Feststoff.



CP2

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-d₆): δ = 9.66 + 9.58 (2 br s, 3 H, -NH), 7.91 (d, ³J = 7.7 Hz, 2 H, Thiobenzoat(C2)H), 7.75–7.65 (m, 3 H, 2 APA(C4)H + 1 Thiobenzoat(C4)H), 7.56–7.52 (m, 2 H, Thiobenzoat(C3)H), 7.45–7.42 (m, 2 H, APA(C3)H), 7.36 + 7.25 (2 d, ³J₁ = 8.0 Hz, ³J₂ = 8.1 Hz, 2 H, APA(C5)H), 6.98 (s, 1 H TBAPA(C5)H), 6.86 (s, 1 H, TBAPA(C3)H), 5.66–5.58 (m, 3 H, Pro(C_α)H), 3.93–3.88 (m, 2 H, -O-CH₂-), 3.73–3.56 (m, 6 H, Pro(C_δ)H), 3.04 (t, ³J = 7.1 Hz, 2 H, Thiobenzoat-CH₂-), 2.60–2.54 (m, 3 H, Pro(C_β)H), 2.04–1.99 (m, 3 H, Pro(C_β)H), 1.89–1.76 (m, 6 H, Pro(C_γ)H), 1.65–1.56 (m, 4 H, Alkyl-H), 1.36–1.23 (m, 16 H, Alkyl-H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO-d₆): δ = 191.2 (-S-CO-), 171.2 -(NH-CO-Pro), 166.3 + 165.9 + 165.6 (APA-CO- + TBAPA-CO- + TBAPA-C4), 153.4 (TBAPA-C2), 152.0 (APA-

4 EXPERIMENTELLER TEIL

C2), 150.4 (TBAPA-C6), 148.7 + 148.6 (APA-C6), 139.0 (APA-C4), 136.5 (Thiobenzoat-C1), 133.9 (Thiobenzoat-C4), 129.1 (Thiobenzoat-C3), 126.8 (Thiobenzoat-C2) 119.8 (APA-C5), 115.8 (APA-C3), 106.4 (TBAPA-C5), 101.5 (TBAPA-C3), 68.0 (-O-CH₂-), 61.6 (ProC_α), 48.23+ 48.2 (ProC_δ), 32.6 (ProC_β), 29.1 + 29.0 + 28.7 + 28.5 + 28.4 + 28.3 + 25.2 (Alkyl-C + Thiobenzoat-CH₂-), 22.4 + 22.3 (ProC_γ) ppm.

IR (ATR): 3259 (w), 3066 (w), 2927 (m), 2856 (m), 1704 (m), 1629 (m), 1596 (s), 1571 (s), 1530 (s), 1460 (s), 1425 (s), 1396 (s), 1298 (m), 1204 (s), 1173 (s), 1154 (s), 1084 (m), 1044 (m), 993 (m), 912 (m), 821 (w), 759 (m), 689 (m) cm⁻¹.

C,H,N,S-Elementaranalyse: C₅₂H₆₁N₉O₈S × 1.4 H₂O

Berechnet: C = 62.62 % H = 6.45% N = 12.64 % S = 3.30 %

Gefunden: C = 62.92 % H = 6.45 % N = 12.29 % S = 3.24 %

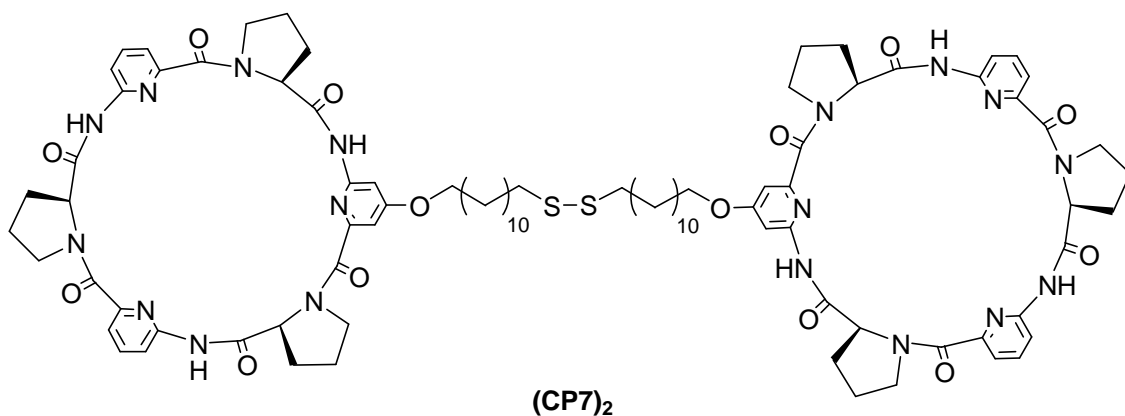
Schmelzpunkt: 101–105 °C

MS MALDI/TOF (*m/z*): 973 [M+H]⁺ (100 %), 995 [M+Na]⁺ (92 %), 1010 [M+K]⁺ (26 %).

Drehwert (c = 1, Methanol): [α]_D²² = -255.8

{*cyclo*-{[Pro-TAPA]-[Pro-APA]₂}}-Disulfid (CP7)₂. Verbindung **CP2** (10 mg, 10.3 μmol) wurde unter einer Argonatmosphäre in entgastem, trockenem Methanol (5 mL) gelöst und die Lösung wurde nach Zugabe von DIEA (18 μL, 0.10 mmol) 9 d bei 25 °C gerührt bis durch MALDI-MS und HPLC kein Edukt mehr nachgewiesen werden konnte. Das Lösungsmittel wurde zur Trockne eingengt und das Produkt im Vakuum getrocknet.

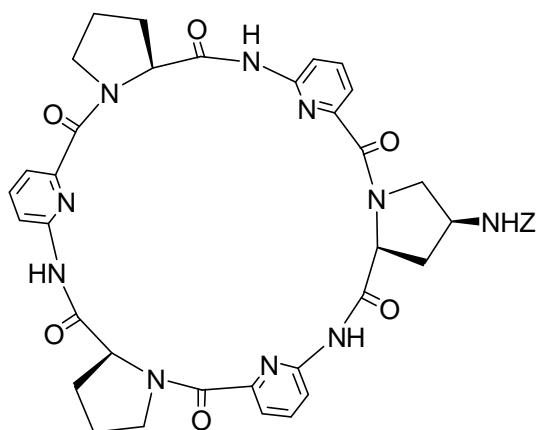
Ausbeute: 6.5 mg (7.5 μmol, 73 %), leicht gelber Feststoff.



MS MALDI/TOF (m/z): 869 [Monomer+H]⁺ (49 %), 891 [Monomer+Na]⁺ (100 %), 907 [Monomer+K]⁺ (22 %), 1734 [Disulfid+H]⁺ (7 %), 1756 [Disulfid+Na]⁺ (99 %), 1772 [Disulfid+K]⁺ (23 %).

cyclo-[[((4S)-Z-Apro)-APA]-[Pro-APA]₂] CP8.^[81] Verbindung **56** (1.9 g, 2.0 mmol) wurde zunächst am C-Terminus gemäß 4.2.3 und anschließend am N-Terminus nach der Standardvorschrift 4.2.2 entschützt. Das erhaltene Produkt (2.1 g, 2.0 mmol) wurde unter einer Stickstoffatmosphäre in entgastem DMF (80 mL) gelöst und die Lösung mit DIEA (2.1 mL, 12.0 mmol) versetzt. Diese Lösung wurde bei 80 °C unter einer Stickstoffatmosphäre mittels eines Perfusors innerhalb von 4.5 h zu einer Lösung von TBTU (3.3 g, 10.4 mmol) und DIEA (0.84 mL, 4.8 mmol) in entgastem DMF (400 mL) zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 30 min bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit Aceton als Eluens vorgereinigt. Das Rohprodukt wurde anschließend über RP-Chromatographie [RP-8, Gradient H₂O/1,4-Dioxan = 10:1 → 5:1 → 2:1 → 1:1 (v/v)] aufgereinigt. Der erhaltene Rückstand wurde in Aceton aufgenommen und das Produkt mit Diethylether ausgefällt und getrocknet.

Ausbeute: 0.86 g (1.1 mmol, 53 %), farbloser Feststoff.



CP8

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 9.71 + 9.65 + 9.61 (3 br s, 3 H, -NH), 7.76–7.70 (m, 3 H, APA(C4)H), 7.56–7.54 (m, 1 H, -NH-Z), 7.44–7.40 (m, 3 H, APA(C3)H), 7.22 + 7.16 (dd + d, 3J_d = 8.3 Hz, $^3J_{dd}$ = 8.2 Hz, $^4J_{dd}$ = 2.0 Hz, 3 H, APA(C5)H), 5.61–5.50 (m, 3 H, Pro(C_α)H + Apro(C_ω)H), 5.04–4.97 (m, 2 H, Z-CH $_2$ -), 4.21–4.12 (m, 1 H, Apro(C_γ)H), 3.92–3.87 (m, 1 H, Apro(C_δ)H), 3.73–3.65 + 3.60–3.55 (2 m, 4 H, Pro(C_δ)H), 3.40–3.36 (m, 1 H, Apro(C_δ)H), 2.91–2.84 (m, 1 H, Apro(C_β)H), 2.61–2.54 (m, 2 H, Pro(C_β)H), 2.06–1.99 (m, 2 H, 1 Apro(C_β)H + 1 Pro(C_β)H), 1.95–1.76 (m, 5 H, 4 Pro(C_γ)H + 1 Pro(C_β)H) ppm.

C,H,N-Analyse: C $_{41}$ H $_{40}$ N $_{10}$ O $_8$ × 3 H $_2$ O

Berechnet: C = 57.60 % H = 5.42% N = 16.38 %

Gefunden: C = 57.44 % H = 5.31 % N = 16.36 %

MS MALDI/TOF (m/z): 801 [M+H] $^+$ (51 %), 823 [M+Na] $^+$ (100 %), 840 [M+K] $^+$ (49 %).

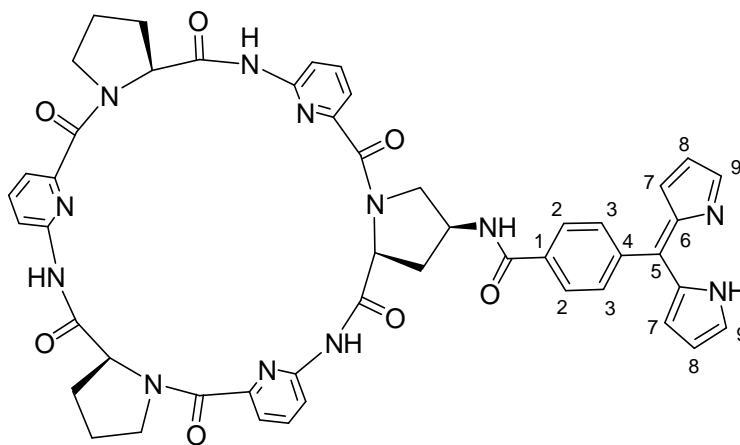
Drehwert (c = 1, Chloroform): $[\alpha]_D^{22} = -395.9$

cyclo-}{[((4S)-DApro)-APA]-[Pro-APA] $_2$ } CP3. Verbindung CP8 (0.16 g, 0.20 mmol) wurde entsprechend 4.2.4 zum freien Amin entschützt und das erhaltene Produkt (0.12 g, 0.18 mmol) unter einer Stickstoffatmosphäre zusammen mit Dipyrromethen 58 (69 mg, 0.19 mmol) in einem Gemisch aus trockenem Dichlormethan und trockenem Methanol (11 mL, 10:1 (v/v)) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 47 h bei 25 °C gerührt.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO₂, Gradient Dichlormethan/Methanol = 10:0.25 → 10:0.5 → 10:0.75 (v/v), 0.1 Vol.-% 7 N Ammoniak in Methanol] aufgereinigt.

Ausbeute: 0.12 g (0.14 mmol, 74 %), braun-oranger Feststoff.



CP3

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-d₆): δ = 12.60 (br s, 1 H, Dipyrrromethen-NH), 9.85 + 9.75 + 9.74 (3 br s, 3 H, -NH), 8.61 (d, ³J = 6.2 Hz, 1 H, NH-Dipyrrromethen), 7.87 (d, ³J = 8.0 Hz, 2 H, Dipyrrromethen(C2)H), 7.79–7.69 (m, 5 H, 3 APA(C4)H + 2 Dipyrrromethen(C7)H), 7.51–7.39 (m, 5 H, 3 APA(C3)H + 2 Dipyrrromethen(C3)H), 7.31 + 7.22 (2 d, ³J₁ = 8.3 Hz, ³J₂ = 8.3 Hz, 3 H, APA(C5)H), 6.45 (br s, 2 H, Dipyrrromethen(C8)H), 6.39 (br s, 2 H, Dipyrrromethen(C9)H), 5.77–5.73 (m, 1 H, DApro(C_α)H + Dichlormethan), 5.64–5.58 (m, 2 H, Pro(C_α)H), 4.64–4.56 (m, 1 H, DApro(C_γ)H), 4.00–3.95 (m, 1 H, DApro(C_δ)H), 3.76–3.65 (m, 3 H, 2 Pro(C_δ)H + 1 DApro(C_δ)H), 3.62–3.54 (m, 2 H, Pro(C_δ)H), 2.98–2.92 (m, 1 H, DApro(C_β)H), 2.63–2.54 (m, 2 H, Pro(C_β)H), 2.32–2.25 (m, 1 H, DApro(C_β)H), 2.09–1.99 (m, 2 H, Pro(C_β)H), 1.91–1.75 (m, 4 H, Pro(C_γ)H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO-d₆): δ = 171.1 + 170.9 (-NH-CO-Pro + -NH-CO-DApro), 166.1 + 166.0 (APA-CO- + -NH-CO-Dipyrrromethen), 152.0 + 151.6 (APA-C2), 148.7 + 148.6 (APA-C6), 144.9 (Dipyrrromethen-C7), 139.7 + 139.5 + 139.4 + 139.2 + 139.0 (Dipyrrromethen-C1/C4/C6 + APA-C4), 134.6 (Dipyrrromethen-C5), 130.5 (Dipyrrromethen-C3), 128.5 (Dipyrrromethen-C9), 126.8 (Dipyrrromethen-C2), 119.8 + 119.7 + 118.2 (Dipyrrromethen-C8 + APA-C3), 115.8 + 115.5 (APA-C5), 61.6 + 61.5 (ProC_α), 60.6

4 EXPERIMENTELLER TEIL

(DAproC α), 55.0 (Dichlormethan), 51.9 (DAproC δ), 48.2 (ProC δ), 47.0 (DAproC γ), 37.3 (DAproC β), 32.6 (ProC β), 22.4 (ProC γ) ppm.

IR (ATR): 3251 (m), 2955 (w), 2881 (w), 2348 (w), 1698 (m), 1625 (s), 1571 (s), 1523 (s), 1461 (s), 1414 (s), 1386 (s), 1294 (s), 1153 (s), 1125 (m), 1095 (m), 1044 (m), 1004 (m), 989 (m), 937 (w), 815 (m), 756 (s) cm⁻¹.

C,H,N,S-Elementaranalyse: C₄₉H₄₄N₁₂O₇ × 2.25 H₂O × 0.01 Dichlormethan

Berechnet: C = 61.84 % H = 5.13% N = 17.62 %

Gefunden: C = 61.90 % H = 5.01 % N = 17.35 %

Schmelzpunkt: 240–243 °C (Zersetzung)

MS MALDI/TOF (*m/z*): 913 [M+H]⁺ (19 %), 935 [M+Na]⁺ (100 %), 951 [M+K]⁺ (14 %).

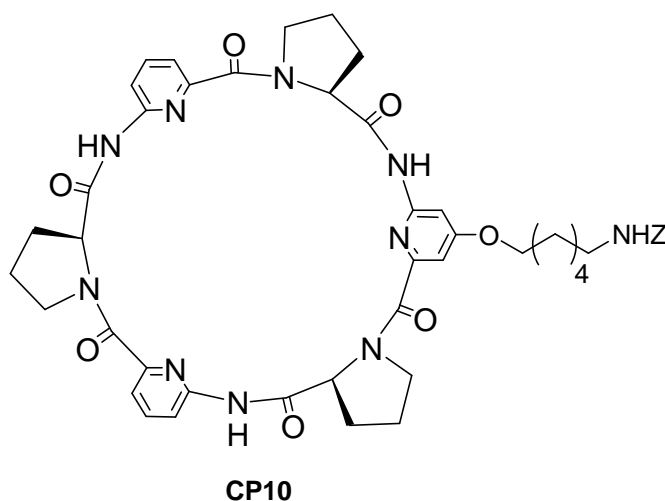
Drehwert (*c* = 0.25, DMSO): $[\alpha]_D^{22} = -515.8$

***cyclo*-{[Pro-CAPA]-[Pro-APA]₂} CP10.** Verbindung **66** (0.41 g, 0.39 mmol) wurde zunächst am *C*-Terminus gemäß 4.2.3 und anschließend am *N*-Terminus nach der Standardvorschrift 4.2.2 entschützt. Das erhaltene Produkt (0.48 g, 0.39 mmol) wurde unter einer Stickstoffatmosphäre in entgastem DMF (16 mL) gelöst und mit DIEA (0.41 mL, 2.4 mmol) versetzt. Diese Lösung wurde bei 80 °C unter einer Stickstoffatmosphäre mittels eines Perfusors innerhalb von 4 h zu einer Lösung von TBTU (0.62 g, 1.9 mmol) und DIEA (0.17 mL, 0.97 mmol) in entgastem DMF (80 mL) zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 2 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit Dichlormethan/Methanol = 10:1 (*v/v*) als Eluens vorgereinigt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-Chromatographie [RP-8, Gradient H₂O/1,4-Dioxan = 20:1 → 10:1 → 5:1 → 2:1 → 1:1 (*v/v*)] und schließlich über Kieselgel [Gradient Dichlormethan/Aceton = 10:1 → 5:1 → 2:1 → 1:1 (*v/v*)] aufgereinigt. Das erhaltene Produkt

4 EXPERIMENTELLER TEIL

wurde in einem Dichlormethan/Ethylacetat-Gemisch (20 mL, 1:1 (v/v)) aufgenommen, mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (3×20 mL) gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt mit Diethylether ausgefällt und getrocknet. Kleine Reste von Diethylether konnten aus dem Feststoff durch Trocknung nicht entfernt werden und wurden in den ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektren und der CHNS-Analyse berücksichtigt.

Ausbeute: 95 mg (0.11 mmol, 27 %), farbloser Feststoff.



^1H -NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 9.69 + 9.67 + 9.60 (3 br s, 3 H, -NH), 7.77–7.70 (m, 2 H, APA(C4)H), 7.45 (t, 3J = 6.7 Hz, 2 H, APA(C3)H), 7.37–7.23 (m, 7 H, 5 Z-Ph-H + 2 APA(C5)H), 6.99 (s, 1 H, CAPA(C5)H),), 6.88 (br s, 1 H, CAPA(C3)H), 5.70–5.63 (m, 3 H, Pro(C α)H), 5.00 (s, 2 H, Z-CH $_2$ -), 3.94–3.88 (m, 2 H, -O-CH $_2$ -), 3.72–3.63 + 3.61–3.54 (2 m, 4 H, Pro(C δ)H), 3.36–3.29 (m, Diethylether), 3.01–2.96 (m, 2 H, -NH-CH $_2$ -), 2.61–2.52 (m, 3 H, Pro(C β)H), 2.07–1.97 (m, 3 H, Pro(C β)H), 1.89–1.74 (m, 6 H, Pro(C γ)H), 1.66–1.58 + 1.44–1.23 (2 m, 8 H, Alkyl-H), 1.08 (t, Diethylether) ppm.

^{13}C -NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 171.2 + 171.1 (-NH-CO-Pro), 166.4 + 165.9 + 165.5 (APA-CO- + CAPA-C4), 156.1 (Z-CO-), 153.3 (CAPA-C2), 151.9 (APA-C2), 150.4 (CAPA-C6) 148.67+ 148.6 (APA-C6), 139.0 (APA-C4), 137.4 (Z-C1), 128.4 + 127.8 (Z-C2-C6), 119.8 (APA-C3), 115.9 + 115.7 (APA-C5), 106.4 (CAPA-C5), 101.5 (CAPA-C3), 68.0 (O-CH $_2$ -), 65.1 (Z-CH $_2$ -), 65.0 (Diethylether), 61.6 (ProC α), 48.3 + 48.2 (ProC δ), 40.2 (NH-

4 EXPERIMENTELLER TEIL

CH₂-), 32.6 (ProC_β), 29.3 + 28.2 + 25.9 + 25.0 (Alkyl-C), 22.4 + 22.3 + 22.2 (ProC_γ), 15.2 (Diethylether) ppm.

IR (ATR): 3275 (w), 3035 (w), 2939 (m), 2882 (w), 1700 (s), 1628 (s), 1597 (s), 1571 (s), 1522 (s), 1458 (s), 1425 (s), 1397 (s), 1296 (m), 1241 (m), 1200 (m), 1173 (s), 1155 (s), 1086 (w), 1043 (w), 992 (w), 821 (w), 759 (m), 698 (w) cm⁻¹.

C,H,N,S-Elementaranalyse: C₄₇H₅₂N₁₀O₉ × 2 H₂O × 0.02 Diethylether

Berechnet: C = 61.38 % H = 6.12% N = 14.92 %

Gefunden: C = 61.40 % H = 6.12 % N = 14.75 %

Schmelzpunkt: 126–130 °C

MS MALDI/TOF (*m/z*): 901 [M+H]⁺ (62 %), 923 [M+Na]⁺ (100 %), 939 [M+K]⁺ (58 %).

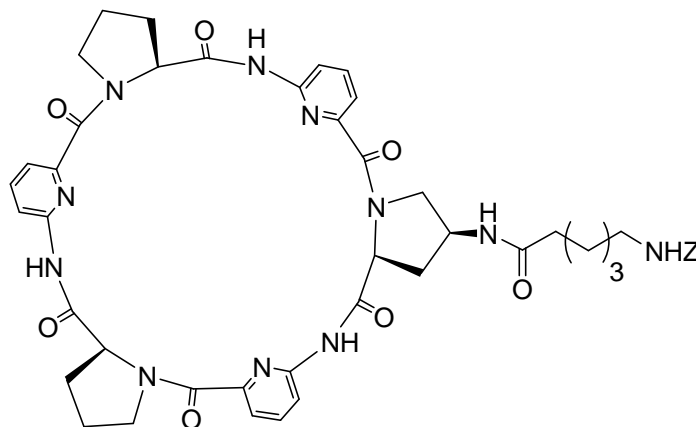
Drehwert (c = 1, Methanol): [α]_D²² = -366.4

cyclo-[[((4S)-CApro)-APA]-[Pro-APA]₂] CP11. Verbindung **CP8** (0.80 g, 1.0 mmol) wurde entsprechend 4.2.4 an der Aminofunktion entschützt und das Produkt (0.70 g, 1.0 mmol), zusammen mit 6-Z-Aminohexansäure **68** (0.32 g, 1.2 mmol) und TBTU (0.39 g, 1.2 mmol) in entgastem DMF (40 mL) gelöst. Das Gemisch wurde mit DIEA (0.52 mL, 3.0 mmol) versetzt und 45 min bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO₂, Dichlormethan/Methanol = 5:1 (v/v)] aufgereinigt. Das Rohprodukt wurde in Dichlormethan (30 mL) aufgenommen, mit Wasser (30 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (30 mL) gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt. Analysenreines Material wurde durch anschließende präparative HPLC erhalten (HPLC-Gradient zur Aufreinigung: 0–5 min, 30 % organisch; 5–30 min, linearer Anstieg auf 60 % organisch; 30–35 min, 60 % organisch;

4 EXPERIMENTELLER TEIL

35–36 min, linearer Anstieg auf 95 % organisch; 36–41 min, 95 % organisch; 41–42 min, linearer Abstieg auf 30 % organisch; 42–47 min, 30 % organisch).

Ausbeute: 0.76 g (0.83 mmol, 83 %), farbloser Feststoff.



CP11

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 9.85 + 9.79 (2 br s, 3 H, -NH), 7.93 (d, 3J = 6.0 Hz, 1 H, CApro-NH), 7.76–7.70 (m, 3 H, APA(C4)H), 7.46–7.41 (m, 3 H, APA(C3)H), 7.37–7.18 (m, 8 H, 5 Z-Ph-H + 3 APA(C5)H), 5.69–5.59 (m, 3 H, 2 Pro(C α)H + 1 CApro(C α)H), 4.99 (s, 2 H, Z-CH $_2$ -), 4.31–4.25 (m, 1 H, CApro(C γ)H), 3.89–3.85 (m, 1 H, CApro(C δ)H), 3.72–3.65 + 3.61–3.55 (2 m, 4 H, Pro(C δ)H), 3.42–3.38 (m, 1 H, CApro(C δ)H), 2.93–2.87 (m, 2 H, Alkyl-H), 2.86–2.80 (m, 1 H, CApro(C β)H), 2.59–2.53 (m, 2 H, Pro(C β)H), 2.04–1.92 (m, 5 H, 2 Pro(C β)H + 2 Alkyl-H + 1 CApro(C β)H), 1.91–1.76 (m, 4 H, Pro(C γ)H), 1.38–1.25 + 1.15–1.08 (2 m, 6 H, Alkyl-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 172.5 (CApro-CO-), 171.2 + 171.1 + 170.7 (-NH-CO-Pro + -NH-CO-CApro), 166.0 + 165.9 (APA-CO-), 156.1 (Z-CO-), 152.0 + 151.6 (APA-C2), 148.7 + 148.6 (APA-C6), 139.2 + 139.1 (APA-C4), 137.4 (Z-C1), 128.4 + 127.8 (Z-C2-C6), 119.7 (APA-C3), 115.9 + 115.6 (APA-C5), 65.1 (Z-CH $_2$ -), 61.5 (ProC α), 60.5 (CAproC α), 52.0 (CAproC δ), 48.2 (ProC δ), 46.2 (CAproC γ), 37.5 (CAproC β), 35.3 (Alkyl-C) 32.6 (ProC β), 29.2 + 25.9 + 24.9 + 22.4 (Alkyl-C + ProC γ) ppm.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

IR (ATR): 3421 (w), 3276 (w), 3051 (w), 2948 (w), 2880 (w), 1701 (m), 1626 (m), 1573 (s), 1528 (s), 1465 (s), 1424 (s), 1399 (s), 1298 (m), 1255 (m), 1181 (m), 1172 (m), 1157 (m), 1083 (w), 992 (w), 823 (w), 758 (m) cm^{-1} .

C,H,N,S-Elementaranalyse: $\text{C}_{47}\text{H}_{51}\text{N}_{11}\text{O}_9 \times 3 \text{H}_2\text{O}$

Berechnet: C = 58.32 % H = 5.94% N = 15.92 %

Gefunden: C = 58.35 % H = 5.63 % N = 15.75 %

Schmelzpunkt: 159–164 °C

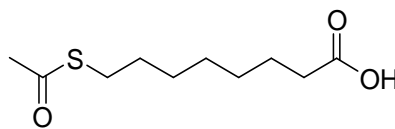
MS MALDI/TOF (m/z): 915 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (6 %), 937 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100 %), 953 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (7 %).

Drehwert ($c = 1$, Chloroform): $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -366.0$

4.4.8 Synthese der Liganden zur Modifikation von Au-Nanopartikeln

8-S-(Acetylthio)-octansäure (70).^[92] Natriummethanolat (2.2 g, 41.5 mmol) wurde in Methanol (100 mL) vorgelegt. Diese Mischung wurde mit einer Lösung von 8-Bromooctansäure **69** (4.5 g, 20.0 mmol) in Methanol (100 mL) und anschließend mit Thioessigsäure (2.9 mL, 40.0 mmol) versetzt. Das Gemisch wurde 25 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Reaktionslösung auf Wasser (40 mL) gegossen und mit 1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von ca. 2–3 gebracht. Nun wurde mit Dichlormethan ($3 \times 150 \text{ mL}$) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser ($2 \times 200 \text{ mL}$) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde zur Trockne eingengt und das erhaltene gelbe Öl im Kühlschrank gelagert, wobei es zu einem gelben Feststoff auskristallisierte.

Ausbeute: 4.2 g (19.1 mmol, 96 %), gelber Feststoff.

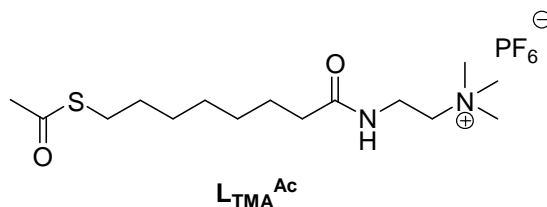


70

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 2.85 (t, 3J = 7.3 Hz, 2 H, -S- CH_2 -), 2.36–2.32 (m, 5 H, 3 -SCO- CH_3 + 2 HOOC- CH_2 -), 1.66–1.52 + 1.39–1.28 (2 m, 10 H, Alkyl- H) ppm.

Ligand $\text{L}_{\text{TMA}}^{\text{Ac}}$. Unter einer Stickstoffatmosphäre wurden **70** (0.22 g, 1.0 mmol) und PyCloP (0.47 g, 1.1 mmol) in entgastem DMF (5 mL) gelöst und mit DIEA (0.26 mL, 1.5 mmol) versetzt. Zu dieser Mischung wurde eine Suspension von gemörsertem (2-Aminoethyl)trimethylammoniumchlorid Hydrochlorid **71** (0.23 g, 1.3 mmol) in entgastem DMF (5 mL) und DIEA (0.61 mL, 3.5 mmol) gegeben und das Gemisch 2 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in wenig Wasser/Aceton (1:1 (v/v)) aufgenommen und das Produkt mittels RP-Chromatographie [RP-8, Gradient $\text{H}_2\text{O}/1,4\text{-Dioxan}$ = 30:1 → 20:1 → 10:1 → 5:1 → 2:1 (v/v)] isoliert.

Ausbeute: 0.32 g (0.72 mmol, 72 %), farbloser Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 6.66 (t, 3J = 6.0 Hz, 1 H, -NH), 3.72–3.67 (m, 2 H, -NH- CH_2 -), 3.49 (t, 3J = 6.1 Hz, 2 H, NMe_3 - CH_2 -), 3.18 (s, 9 H, -N-(CH_3) $_3$), 2.84 (t, 3J = 7.3 Hz, 2 H, -S- CH_2 -), 2.32 (s, 3 H, -SCO- CH_3), 2.20 (t, 3J = 7.6 Hz, 2 H, -NH-CO- CH_2 -), 1.63–1.49 + 1.36–1.25 (2 m, 10 H, Alkyl- H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, 25 °C, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 196.1 (-SCO), 174.5 (-NH-CO), 65.1 (NMe_3 - CH_2 -), 53.5 (-N-(CH_3) $_3$), 35.9 (-NH-CO- CH_2 -), 33.8 (-NH- CH_2 -), 30.6 (-SCO- CH_3), 29.3 (Alkyl-C), 28.9 (-S- CH_2 -), 28.7 + 28.4 + 25.2 (Alkyl-C) ppm.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

^{19}F -NMR (377 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = -68.99 + -70.88$ (2 s, 6 F, PF_6^-) ppm.

IR (ATR): 3379 (w), 2926 (w), 2856 (w), 1665 (s), 1536 (m), 1493 (m), 1484 (m), 1469 (w), 1423 (w), 1355 (w), 1254 (w), 1149 (w), 1118 (m), 965 (w), 821 (s) cm^{-1} .

C,H,N,S-Elementaranalyse: $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{PS}$

Berechnet: C = 40.17 % H = 6.97% N = 6.25 % S = 7.15 %

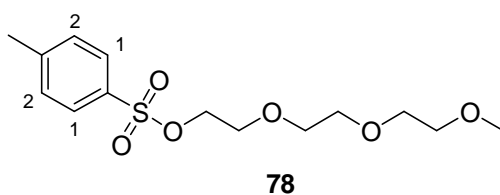
Gefunden: C = 40.18 % H = 7.04 % N = 6.28 % S = 7.15 %

Schmelzpunkt: 112 °C

MS MALDI/TOF (m/z): 303 [$\text{M}-\text{PF}_6^-$] $^+$ (100 %), [$\text{M}-\text{PF}_6^-+\text{K}$] $^+$ (4 %).

2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]-1-ethyl-*p*-toluolsulfonat (78).^[92] Unter einer Stickstoffatmosphäre wurde Triethylenglycolmonomethylether (6.0 g, 36.5 mmol) in Triethylamin (10.1 mL, 72.9 mmol) vorgelegt und innerhalb von 15 min mit einer Lösung von *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (7.3 g, 38.3 mmol) in trockenem Dichlormethan (11 mL) versetzt. Das zähe Reaktionsgemisch wurde 20 h bei 25 °C gerührt und anschließend mit Dichlormethan (15 mL) verdünnt. Nun wurde nacheinander mit 6 N Salzsäure (2 × 50 mL), 10 %iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50 mL) und Wasser (50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat/Hexan = 2:1 (v/v)] aufgereinigt.

Ausbeute: 8.6 g (27.0 mmol, 74 %), farbloses Öl.

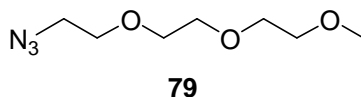


4 EXPERIMENTELLER TEIL

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 7.79$ (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2 H, Tosyl(C1)H), 7.33 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2 H, Tosyl(C2)H), 4.15 (t, $^3J = 4.8$ Hz, 2 H, Tosyl- CH_2 -), 3.68 (t, $^3J = 4.9$ Hz, 2 H, -O- CH_2 -), 3.61–3.58 + 3.53–3.51 (m, 8 H, -O- CH_2 -), 3.36 (s, 3 H, -O- CH_3), 2.44 (s, 3 H, Tosyl- CH_3) ppm.

2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethylazid (79).^[92] Verbindung **78** (8.6 g, 27.0 mmol) und Natriumazid (2.5 g, 37.8 mmol) wurden in DMF (300 mL) gelöst und die Lösung 3 h auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Wasser/Dichlormethan (200 mL, 1:1 (v/v)) versetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (2×100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit 10 %iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 mL), gesättigter wässriger NaCl-Lösung (100 mL) und Wasser (2×100 mL) gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt.

Ausbeute: 3.6 g (19.0 mmol, 70 %), farbloses Öl.

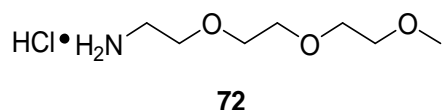


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 3.68$ – 3.64 + 3.56 – 3.54 (2 m, 10 H, -O- CH_2 -), 3.40–3.37 (m, 5 H, 3 -O- CH_3 + 2 -O- CH_2 -) ppm.

2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethylamin Hydrochlorid (72).^[104] Verbindung **79** (3.60 g, 19.0 mmol) wurde in Methanol (120 mL) gelöst und mit 1 N Salzsäure (21.0 mL, 21.0 mmol) versetzt. Anschließend wurde eine Suspension aus 10 %igem Palladium/Kohle-Katalysator (60 mg) in wenig Dichlormethan zugegeben und das Gemisch 2 d unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck gerührt. Nun wurde der Katalysator über Celite abfiltriert, der Filterkuchen mit Methanol gewaschen und das Filtrat unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (50 mL) aufgenommen und mit 0.5 N Salzsäure (2×50 mL) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden zur Trockne eingeeengt.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Ausbeute: 3.6 g (17.9 mmol, 94 %), schwarzes Harz.

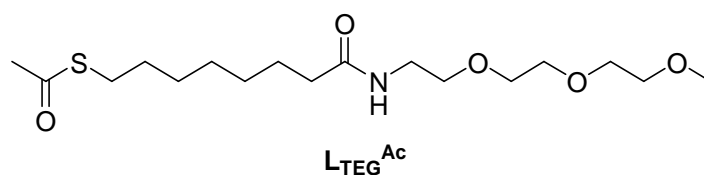


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 3.86\text{--}3.84 + 3.70\text{--}3.64 + 3.57\text{--}3.55$ (3 m, 10 H, -O- CH_2 -), 3.41 (s, 3 H, -O- CH_3), 3.25–3.20 (m, 2 H, $\text{NH}_2\text{-CH}_2$ -) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 71.7 + 70.2 + 66.8$ (-O- CH_2 -), 59.1 (-O- CH_3), 39.9 ($\text{NH}_2\text{-CH}_2$ -) ppm.

Ligand $\text{L}_{\text{TEG}}^{\text{Ac}}$.^[92] Unter einer Stickstoffatmosphäre wurden **70** (1.1 g, 5.0 mmol), **72** (1.2 g, 6.1 mmol) und TBTU (1.9 g, 6.0 mmol) in entgastem DMF (100 mL) gelöst und mit DIEA (2.6 mL, 15.0 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 2 h auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Dichlormethan (150 mL) aufgenommen, mit 1 N Salzsäure (3 × 150 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch [SiO_2 , Gradient Ethylacetat/Petrolether = 2:1 (v/v) → Aceton] aufgereinigt.

Ausbeute: 1.5 g (4.0 mmol, 80 %), gelbes Öl.



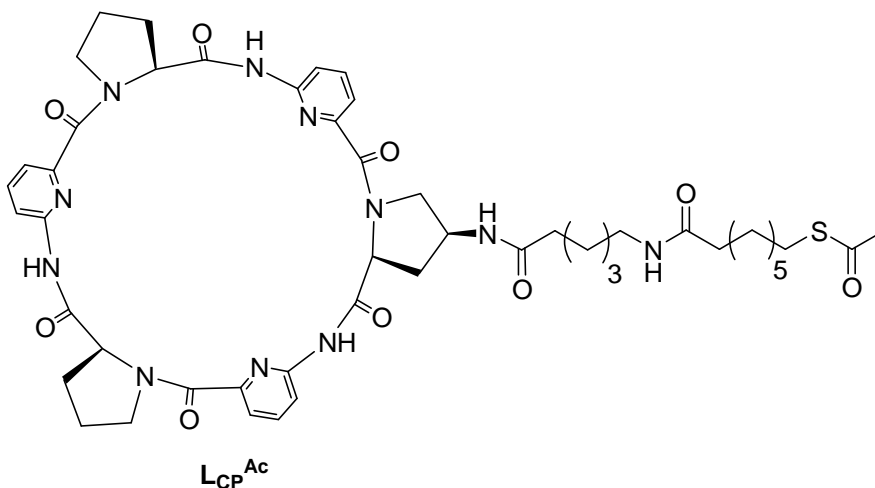
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 6.10$ (s, 1 H, -NH-) 3.65–3.61 + 3.56–3.53 (2 m, 10 H, -O- CH_2 -), 3.44 (q, $^3J = 5.2$ Hz, 2 H, -NH- CH_2 -), 3.37 (s, 3 H, -O- CH_3), 2.84 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, -S- CH_2 -), 2.31 (s, 3 H; -SCO- CH_3), 2.15 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, - CH_2 -CO-), 1.64–1.51 + 1.37–1.26 (2 m, 10 H, Alkyl-*H*) ppm.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

^{13}C -NMR (101 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 196.2 (-SCO-), 173.3 (-CO-NH-), 72.1 + 70.6 + 70.3 + 70.1 (-O-CH₂-), 59.2 (-O-CH₃), 39.2 (-NH-CH₂-), 36.7 (-SCO-CH₃), 30.8 + 29.6 + 29.2 + 29.0 + 28.7 (Alkyl-C), 25.7 (-S-CH₂-) ppm.

Ligand $\text{L}_{\text{CP}}^{\text{Ac}}$. CP11 (87 mg, 95 μmol) wurde gemäß 4.2.4 an der Aminofunktion geschützt und das Produkt (73 mg, 89 μmol) zusammen mit DIEA (50 μL , 0.29 mmol) unter einer Stickstoffatmosphäre in entgastem DMF (3 mL) gelöst. Anschließend wurde eine Lösung von TBTU (35 mg, 0.11 mmol) und **70** (25 mg, 0.11 mmol) in entgastem DMF (2 mL) zugegeben. Nach 1 h Rühren bei 25 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO_2 , Dichlormethan/Methanol = 5:1 (v/v)] aufgereinigt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mit Hexan ausgefällt, zentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Anschließend wurde der Feststoff erneut in Hexan aufgeschlämmt und nach Zentrifugieren die überstehende Lösung abdekantiert. Der erhaltene Feststoff wurde im Vakuum getrocknet. Analysenreines Material wurde durch erneute Säulenchromatographie [SiO_2 , Dichlormethan/Aceton = 10:1 (v/v)] erhalten.

Ausbeute: 60 mg (61 μmol , 64 %), farbloser Feststoff.



^1H -NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-d_6): δ = 10.1 (br s, 3 H, -NH), 7.93 (d, 3J = 6.0 Hz, 1 H, Apro-NH), 7.76–7.70 (m, 4 H, 3 APA(C₄)H + -NH-CO-CH₂-), 7.46–7.41 (m, 3 H, APA(C₃)H), 7.36–7.25 (m, 3 H, APA(C₅)H), 5.81–5.69 (m, 3 H, 2 Pro(C _{α})H + 1 Apro(C _{α})H), 4.31–4.22 (m, 1 H, Apro(C _{γ})H), 3.90–3.86 (m, 1 H, Apro(C _{δ})H), 3.71–3.55 (m, 4 H, Pro(C _{δ})H), 3.44–3.35 (m, 1 H, Apro(C _{δ})H), 2.95–2.90 (m, 2 H, -CH₂-NH-CO-),

4 EXPERIMENTELLER TEIL

2.84–2.78 (m, 3 H, 2 $-CH_2-SCO-$ + 1 $Apro(C_\beta)H$), 2.58–2.50 (m, 2 H, $Pro(C_\beta)H$), 2.29 (s, 3 H, $-SCO-CH_3$), 2.02–1.91 (m, 7 H, 4 $-CH_2-CO-NH-$ + 2 $Pro(C_\beta)H$ + 1 $Apro(C_\beta)H$), 1.89–1.75 (m, 4 H, $Pro(C_\gamma)H$), 1.47–1.06 (m, 16 H, $Alkyl-H$) ppm.

^{13}C -NMR (101 MHz, 25 °C, $DMSO-d_6$): δ = 195.5 ($-SCO-$), 172.6 + 172.1 + 171.4 + 171.0 ($Apro-NH-CO-$ + $-NH-CO-CH_2-$ + $-NH-CO-Pro-$ + $-NH-CO-Apro-$) 166.0 ($APA-CO-$), 152.0 + 151.5 ($APA-C2$), 148.8 + 148.7 ($APA-C6$), 139.3 + 139.1 ($APA-C4$), 119.7 ($APA-C3$), 115.8 + 115.6 ($APA-C5$), 61.6 + 61.5 ($ProC_\alpha$), 60.5 ($AproC_\alpha$), 52.1 ($AproC_\delta$), 48.3 ($ProC_\delta$), 46.3 ($AproC_\gamma$), 38.3 ($-CH_2-NH-CO-$), 37.6 ($AproC_\beta$), 35.5 + 35.4 ($-CH_2-CO-NH-$), 32.7 ($ProC_\beta$), 30.7 ($-SCO-CH_3$), 29.2 + 28.9 + 28.6 + 28.4 ($Alkyl-C$), 28.3 ($-CH_2-SCO-$), 28.1 + 26.1 + 25.3 + 25.0.4 ($Alkyl-C$), 22.4 ($ProC_\gamma$) ppm.

IR (ATR): 3332 (w), 3063 (w), 2935 (w), 2862 (w), 1701 (m), 1626 (m), 1573 (s), 1529 (s), 1463 (s), 1417 (s), 1397 (s), 1298 (m), 1258 (m), 1174 (m), 1153 (m), 1081 (m), 991 (m), 821 (m), 760 (m) cm^{-1} .

C,H,N,S-Elementaranalyse: $C_{49}H_{61}N_{11}O_9S \times 2.5 H_2O$

Berechnet: C = 57.41 % H = 6.49% N = 15.03 % S = 3.13 %

Gefunden: C = 57.49 % H = 6.35 % N = 14.91 % S = 2.98 %

Schmelzpunkt: 168–172 °C

MS MALDI/TOF (m/z): 965 $[M-CH_3]^+$ (20 %), 981 $[M+H]^+$ (77 %), 1003 $[M+Na]^+$ (100 %), 1019 $[M+K]^+$ (2 %).

Drehwert ($c = 1$, Chloroform): $[\alpha]_D^{22} = -278.6$

4.4.9 Synthese der Au-NPs

(Turkevich-Methode) Citratgeschützte Nanopartikel Au-NP_{Citrat}^[77]

KAuCl₄ × H₂O (59 mg, 0.15 mmol) wurde in H₂O (50 mL) vorgelegt und der pH Wert mit 1 N Salzsäure bzw. 1 N Natronlauge auf 7 eingestellt. Die Lösung wurde zum Sieden erhitzt und eine 0.15 M wässrige Lösung Natriumcitrat in H₂O (1.4 mL) zugegeben. Das Gemisch wurde weitere 5 min zum Rückfluss erhitzt und dann auf 25 °C abkühlen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde in einen Dialyseschlauch überführt und 48 h gegen eine 0.1 mM wässrige Natriumcitrat-Lösung (2.5 L) dialysiert.

Ausbeute: Nicht bestimmt. Produkt wurde als weinrote bis lila gefärbte Lösung erhalten.

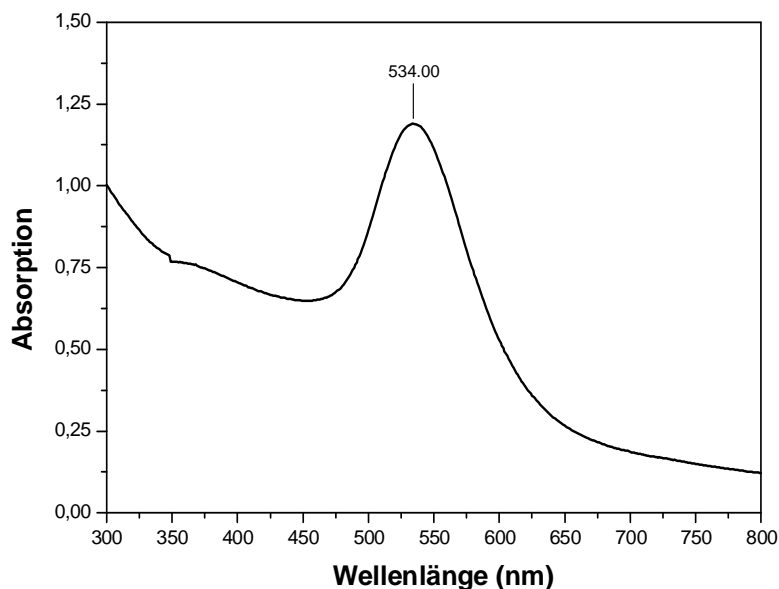
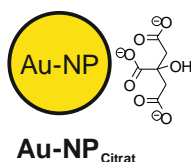


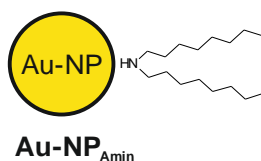
Abbildung 42 UV/Vis-Spektrum von Au-NP_{Citrat}. 25 °C, 0.1 mm Natriumcitratlösung.

(Brust-Schiffrin-Methode) Di-*n*-octylamin-geschützte Nanopartikel Au-NP_{Amin}^[67] Unter einer Stickstoffatmosphäre wurde eine Lösung von H₂AuCl₄ (80 mg, 0.24 mmol) in entgastem H₂O (30 mL) zu einer Lösung von Tetra-*n*-octylammoniumbromid (1.6 g, 2.9 mmol) in entgastem Toluol (200 mL) gegeben. Das Gemisch wurde bei 25 °C gerührt bis sich die wässrige Phase entfärbt hatte. Anschließend wurde Di-*n*-octylamin

4 EXPERIMENTELLER TEIL

(0.11 mL, 0.36 mmol) zum Reaktionsgemisch gegeben und für 1 h bei 25 °C gerührt. Danach wurde innerhalb von 20 s eine Lösung von NaBH₄ (91 mg, 2.4 mmol) in entgastem H₂O (6 mL) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 3 h bei 25 °C gerührt. Die wässrige Phase wurde entfernt und die organische Phase bei 5 °C unter einer Stickstoffatmosphäre gelagert.

Ausbeute: Nicht bestimmt. Produkt wird als braun-orange Lösung in Toluol erhalten.



4.4.10 Immobilisierung der Liganden auf den Au-NPs

Die Liganden wurden nach der Entschützung gemäß 4.2.1 zunächst in Lösung gebracht und anschließend zur Lösung der synthetisierten **Au-NP_{Amin}** bzw. **Au-NP_{Citrat}** gegeben. Es wurde in allen Arbeitsschritten mit entgasten Lösungsmitteln und unter Argonatmosphäre gearbeitet. In den Austauschreaktionen unter Verwendung von **Au-NP_{Citrat}** wurden sowohl das Lösungsmittel, die Konzentration der Ligandenlösung und die Reaktionszeit variiert. Die jeweils verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 10, 11 und 12 angegeben.

Austausch von Citrat gegen L_{TEG}

Au-NP_{TEG}. Die nach 4.4.9 synthetisierte wässrige **Au-NP_{Citrat}**-Lösung wurde mit einer Lösung des entschützten Liganden **L_{TEG}** versetzt. In Tabelle 10 sind die verschiedenen Ansätze aufgelistet.

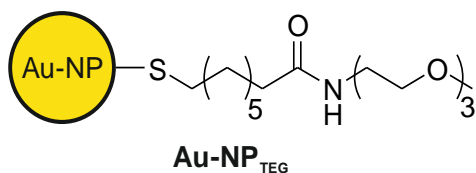
4 EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 10 Durchgeführte Reaktionsansätze für die Immobilisierung von L_{TEG} auf $Au-NP_{Citrat}$.

Ansatz	V ($Au-NP_{Citrat}$) / mL	V (L_{TEG}) / mL	c (L_{TEG}) / mM	Lösungsmittel von L_{TEG}	Reaktionszeit / h
1	3.0	0.5	50	H ₂ O	24
2	10	0.2	50	H ₂ O	94
3	10	3.0	2.0	H ₂ O	42
4	10	3.0	5.0	H ₂ O	42
5	10	3.0	10	H ₂ O	42
6	10	3.0	10	H ₂ O	48
7	10	3.0	10	MeOH	48

Die Reaktionslösung wurde nach der Reaktion mittels Zentrifugation bei 5 °C durch eine Molecular Weight Cut-Off (MWCO) Membran aufgereinigt. Die Nanopartikel wurden anschließend in H₂O (10 mL) gelöst und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das auf diese Weise gereinigte Material wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute (Ansätze 2-7): 4.6–5.2 mg, goldener Feststoff.



4 EXPERIMENTELLER TEIL

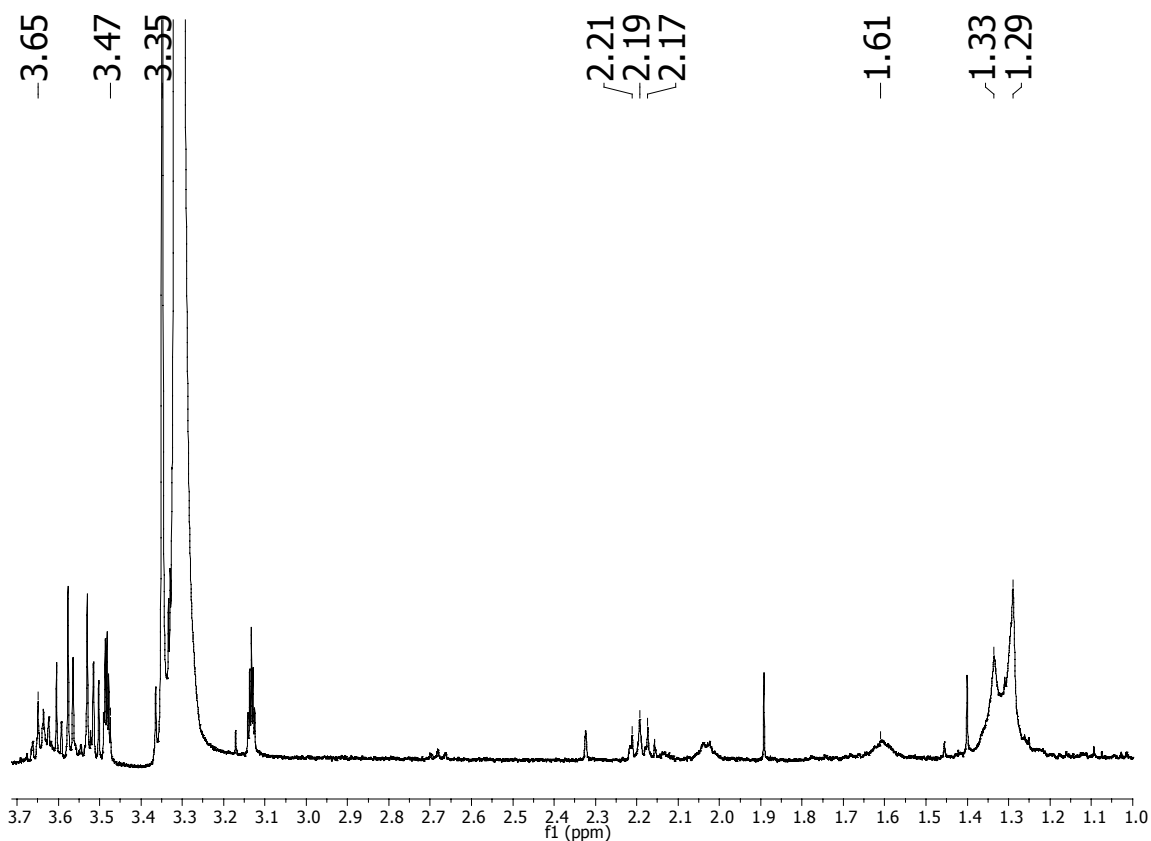


Abbildung 43 Beispielhaftes $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{Au-NP}_{\text{Citrat}}$ nach Austausch mit L_{TEG} (Ansatz 5 in Tabelle 10). 400 MHz, 25 °C, MeOD-d_4 .

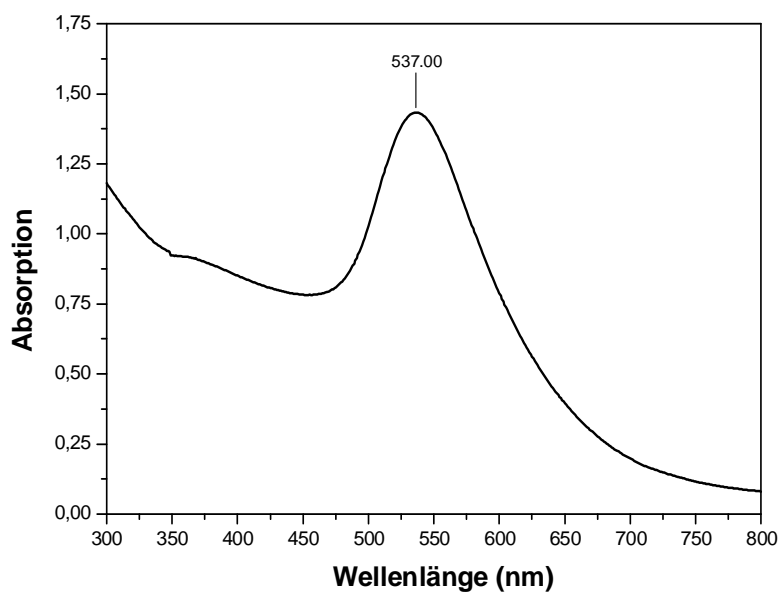


Abbildung 44 Beispielhaftes UV/Vis-Spektrum von $\text{Au-NP}_{\text{Citrat}}$ nach Austausch mit L_{TEG} (Ansatz 5 in Tabelle 10). 25 °C, H_2O .

Austausch von Citrat gegen L_{TMA}

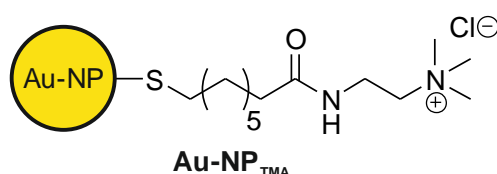
Au-NP_{TMA}. Die nach 4.4.9 synthetisierte wässrige **Au-NP_{Citrat}**-Lösung wurde mit einer Lösung des entschützten Liganden **L_{TMA}** versetzt. In Tabelle 11 sind die verschiedenen Ansätze aufgelistet.

*Tabelle 11 Durchgeführte Reaktionsansätze für die Immobilisierung von L_{TMA} auf **Au-NP_{Citrat}**.*

Ansatz	V (Au-NP _{Citrat}) / mL	V (L _{TMA}) / mL	c (L _{TMA}) / mM	Lösungsmittel von L _{TMA}	Reaktionszeit / h
1	3.0	0.5	50	H ₂ O	24
2	15	1.15	50	H ₂ O	47
3	8.5	3.0	5.0	H ₂ O + DIEA	116
4	8.5	3.0	5.0	H ₂ O	116
5	10	3.0	10	MeOH	48
6	10	3.0	10	H ₂ O	48

Die Reaktionslösung wurde nach der Reaktion mittels Zentrifugation bei 5 °C durch eine MWCO-Membran aufgereinigt. Die Nanopartikel wurden anschließend in H₂O (10 mL) gelöst und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Beim Resuspendieren fiel sukzessive Gold als schwarzes Agglomerat aus.

Ausbeute (Ansätze 1-6): Es konnte wegen Agglomerisierung kein Produkt erhalten werden.

**Austausch von Citrat gegen L_{TEG} und L_{CP}**

Au-NP_{TEG/CP}. Die nach 4.4.9 synthetisierte wässrige **Au-NP_{Citrat}**-Lösung wurde mit einer wässrigen Lösung des entschützten **L_{TEG}** und einer Lösung des entschützten **L_{CP}** in Methanol versetzt (Tabelle 12). Dabei wurden die Konzentrationen der Lösungen sowie das Stoffmengenverhältnis der Liganden variiert. Bei den Ansätzen 4–7 wurden die Cyclopeptid-Lösungen mit DIEA versetzt (ca. 20 μmol), um eine mögliche Protonierung des CP während

4 EXPERIMENTELLER TEIL

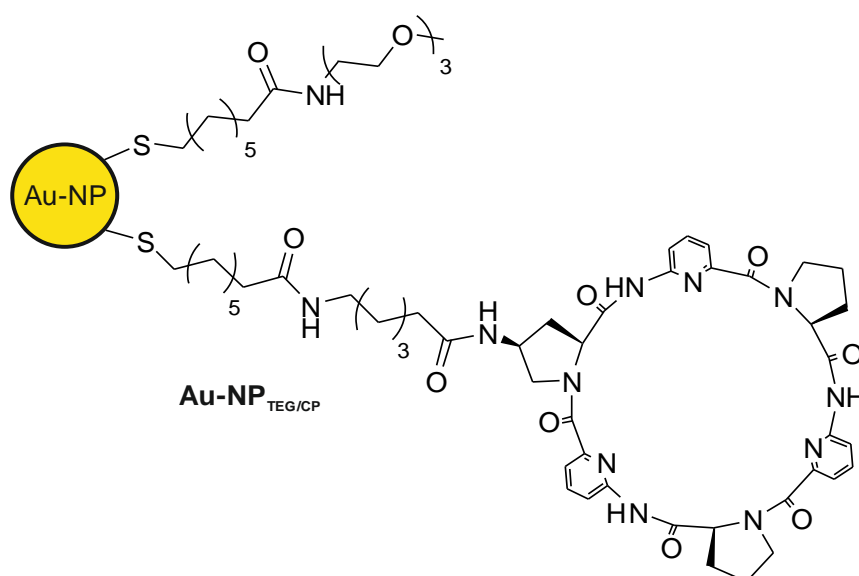
der Entschützung rückgängig zu machen. In Tabelle 12 sind die verschiedenen Ansätze aufgelistet.

Tabelle 12 Durchgeführte Reaktionsansätze für die Immobilisierung von L_{TEG} und L_{CP} auf $Au-NP_{Citrat}$.

Ansatz	V (Au-NP _{Citrat}) / mL	V (L_{TEG}) / μ L	V (L_{CP}) / μ L	c (L_{TEG}) / mM	c (L_{CP}) / mM	n (L_{TEG}) / n (L_{CP})	Reaktionszeit / h
1	10	100	980	50	5.1	1 : 1	94
2	10	133	655	50	5.1	2 : 1	94
3	3.0	100	200	50	5.1	2 : 1	70
4	10	200	1000	25	5.0	1 : 1	70
5	10	267	667	25	5.0	2 : 1	70
6	5	100	1000	16	1.6	1 : 1	94
7	5	100	1000	16	1.6	1 : 1	94

Die Reaktionslösung wurde nach der Reaktion mittels Zentrifugation bei 5 °C (Ansatz 7 bei 25 °C) durch eine MWCO-Membran aufgereinigt. Die Nanopartikel wurden anschließend in H₂O (10 mL) gelöst und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das auf diese Weise gereinigte Material wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute (Ansätze 1-6): 2.8–3.0 mg, goldener Feststoff.



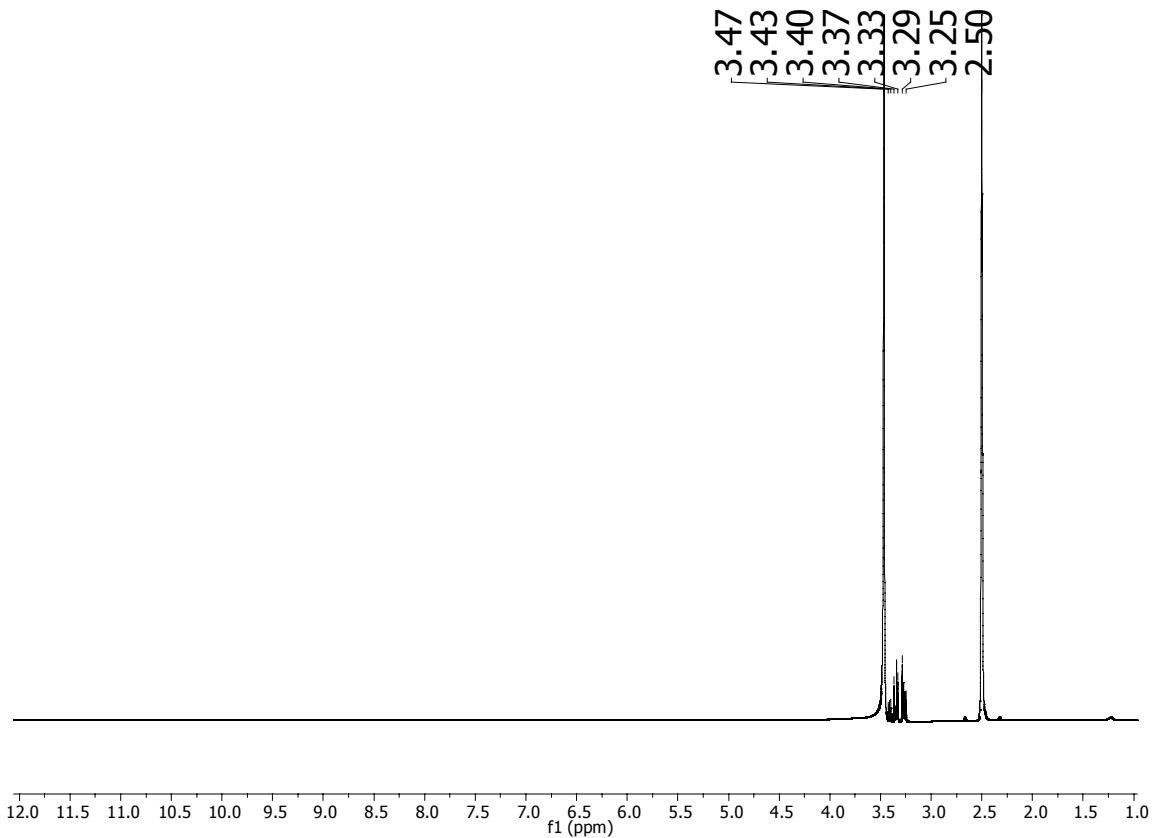


Abbildung 45 Beispielhaftes ¹H-NMR-Spektrum von Au-NP_{Citrat} nach Austausch mit L_{TEG} und L_{CP} (Ansatz 3 in Tabelle 12). 400 MHz, 25 °C, DMSO-d₆.

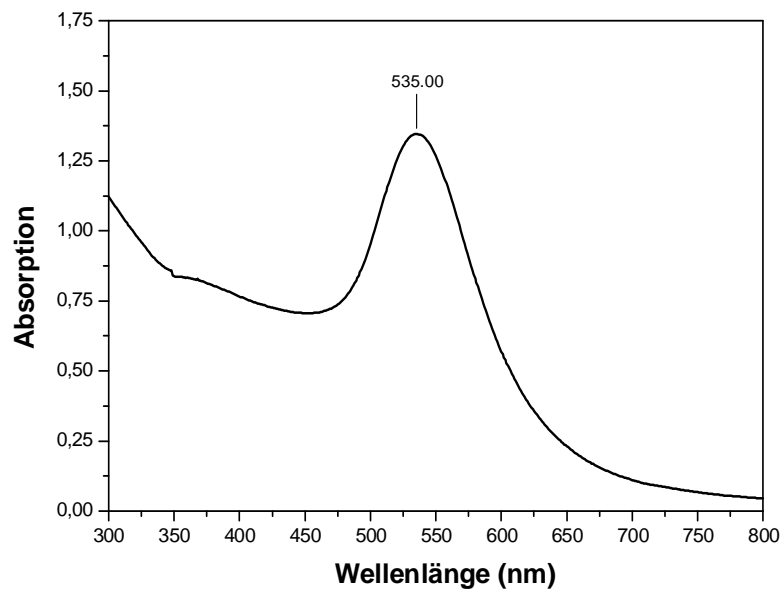


Abbildung 46 Beispielhaftes UV/Vis-Spektrum von Au-NP_{Citrat} nach Austausch mit L_{TEG} und L_{CP} (Ansatz 3 in Tabelle 12). 25 °C, H₂O.

Austausch von Di-*n*-octylamin gegen L_{TEG}

Au-NP_{TEG}. Die nach 4.4.9 synthetisierte **Au-NP_{Amin}**-Lösung (40 mL) wurde mit einer 0.2 M Lösung des entschützten **L_{TEG}** in Methanol (2.0 mL) versetzt und für 96 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde die organische Phase abdekantiert und der ausgefallene Feststoff im Vakuum getrocknet. Der zurückgebliebene Feststoff wurde in H₂O (15 mL) gelöst und die Lösung mittels Zentrifugation bei 5 °C durch eine MWCO-Membran aufgereinigt. Die Nanopartikel wurden anschließend in H₂O (10 mL) gelöst und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das auf diese Weise gereinigte Material wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 7.6 mg, goldener Feststoff.

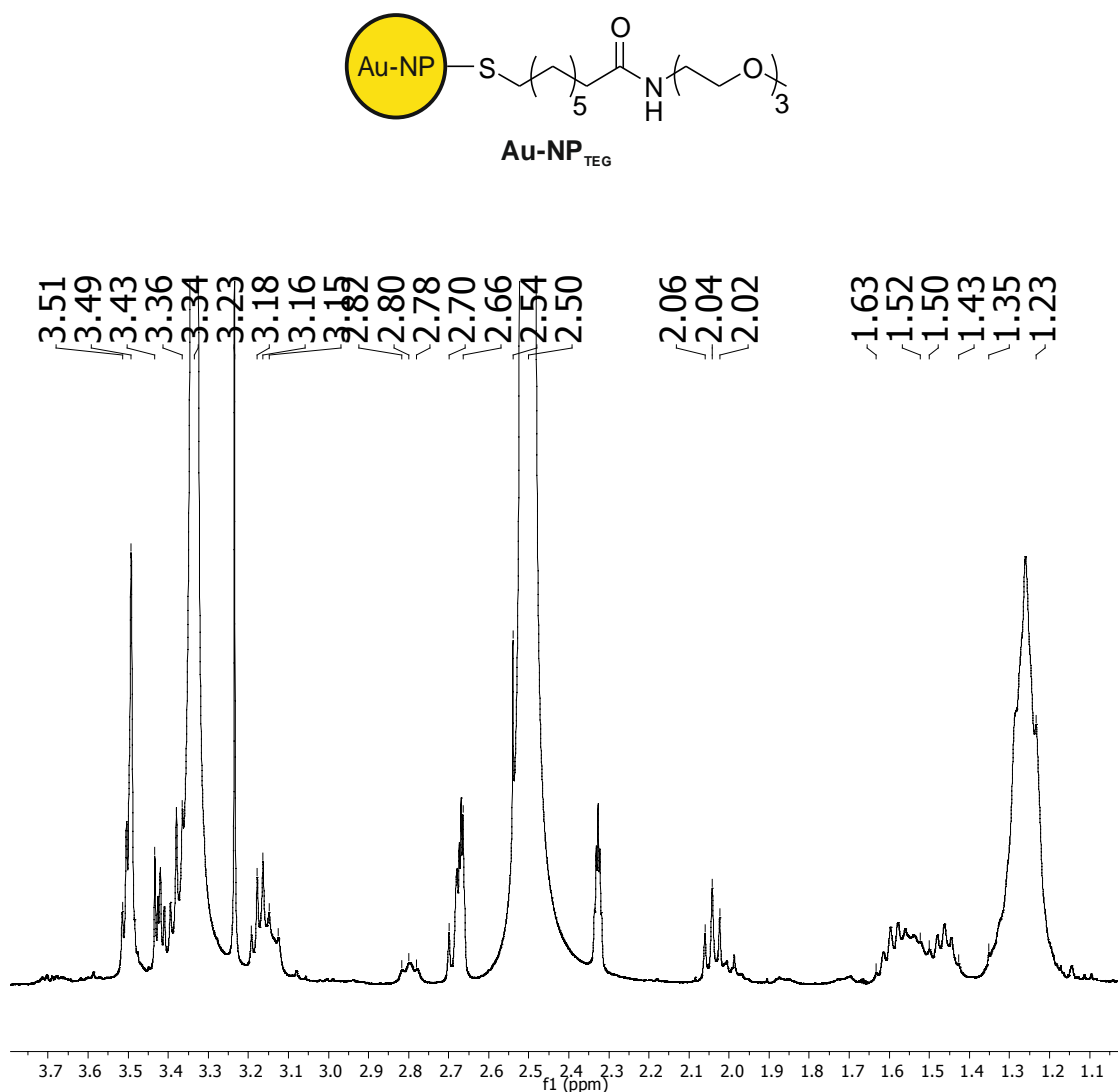


Abbildung 47 ¹H-NMR-Spektrum von **Au-NP_{TEG}**. 400 MHz, 25 °C, DMSO-d₆.

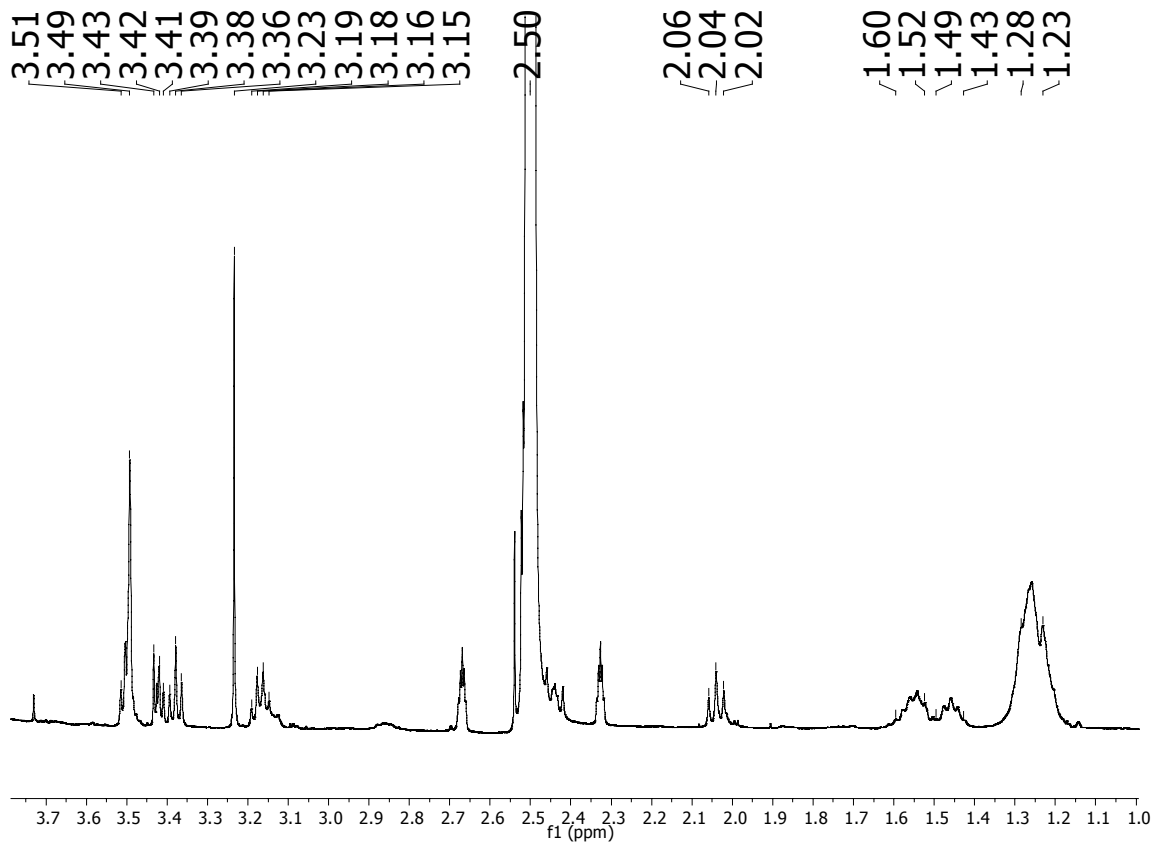


Abbildung 48 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{Au-NP}_{\text{TEG}}$ nach Iodabbau gemäß 4.2.5. 400 MHz, 25 °C, DMSO-d_6 .

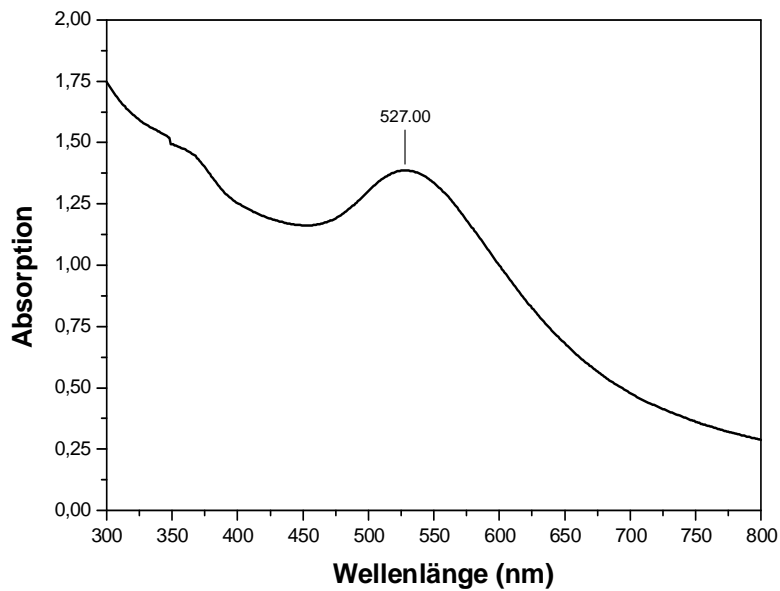


Abbildung 49 UV/Vis-Spektrum von $\text{Au-NP}_{\text{TEG}}$. 25 °C, H_2O .

Austausch von Di-*n*-octylamin gegen L_{TMA}

$\text{Au-NP}_{\text{TMA}}$. Die nach 4.4.9 synthetisierte $\text{Au-NP}_{\text{Amin}}$ -Lösung (40 mL) wurde mit einer 0.2 M Lösung des entschützten L_{TMA} in Methanol (2.0 mL) versetzt und für 96 h bei

4 EXPERIMENTELLER TEIL

25 °C gerührt. Anschließend wurde die organische Phase abdekantiert und der ausgefallene Feststoff im Vakuum getrocknet. Der zurückbleibende Feststoff wurde in H₂O (15 mL) gelöst und die Lösung mittels Zentrifugation bei 5 °C durch eine MWCO-Membran aufgereinigt. Die Nanopartikel wurden anschließend in H₂O (10 mL) gelöst und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das auf diese Weise gereinigte Material wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 9.2 mg, goldener Feststoff.

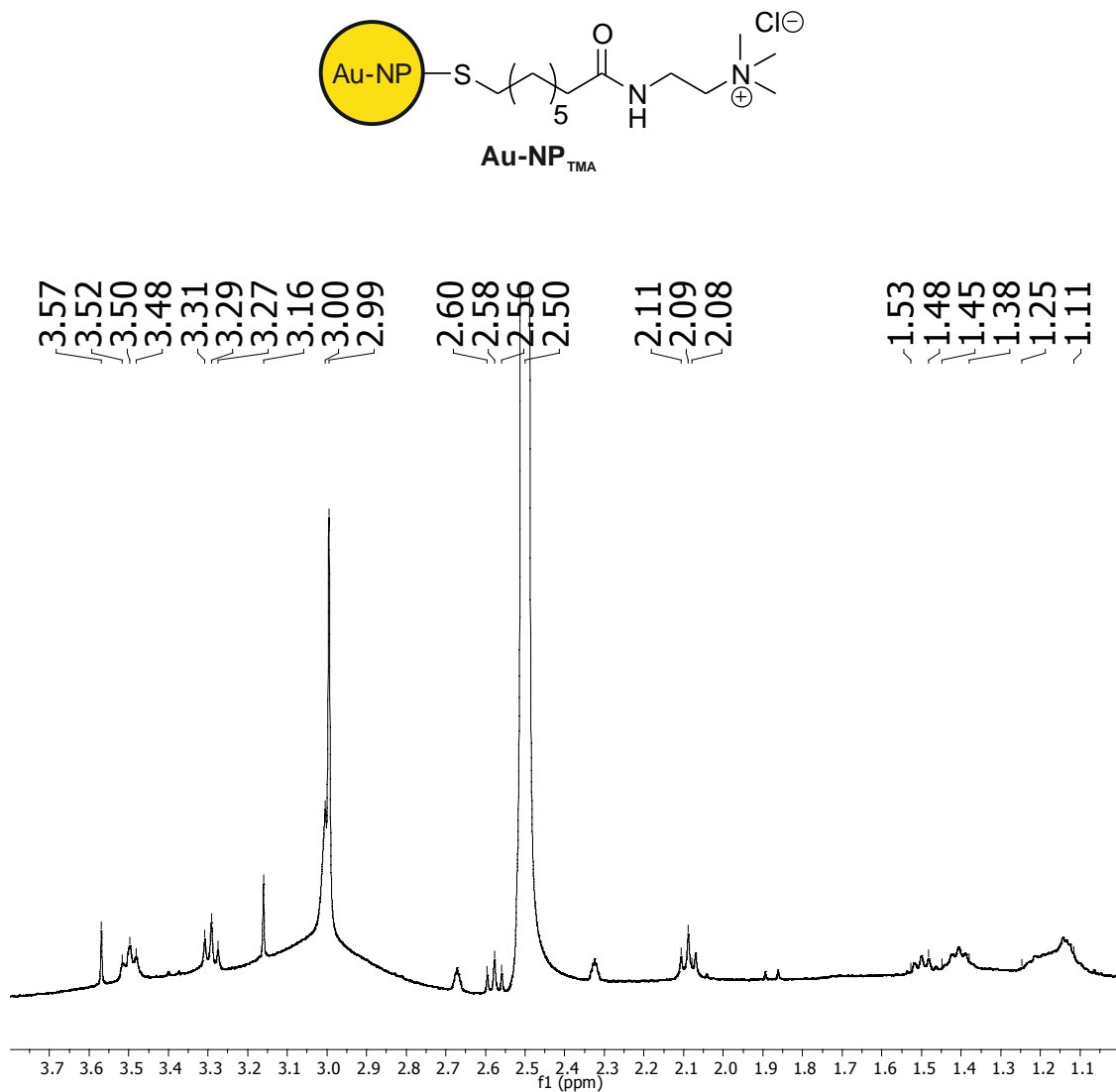


Abbildung 50 ¹H-NMR-Spektrum von Au-NP_{TMA}. 400 MHz, 25 °C, DMSO-d₆.

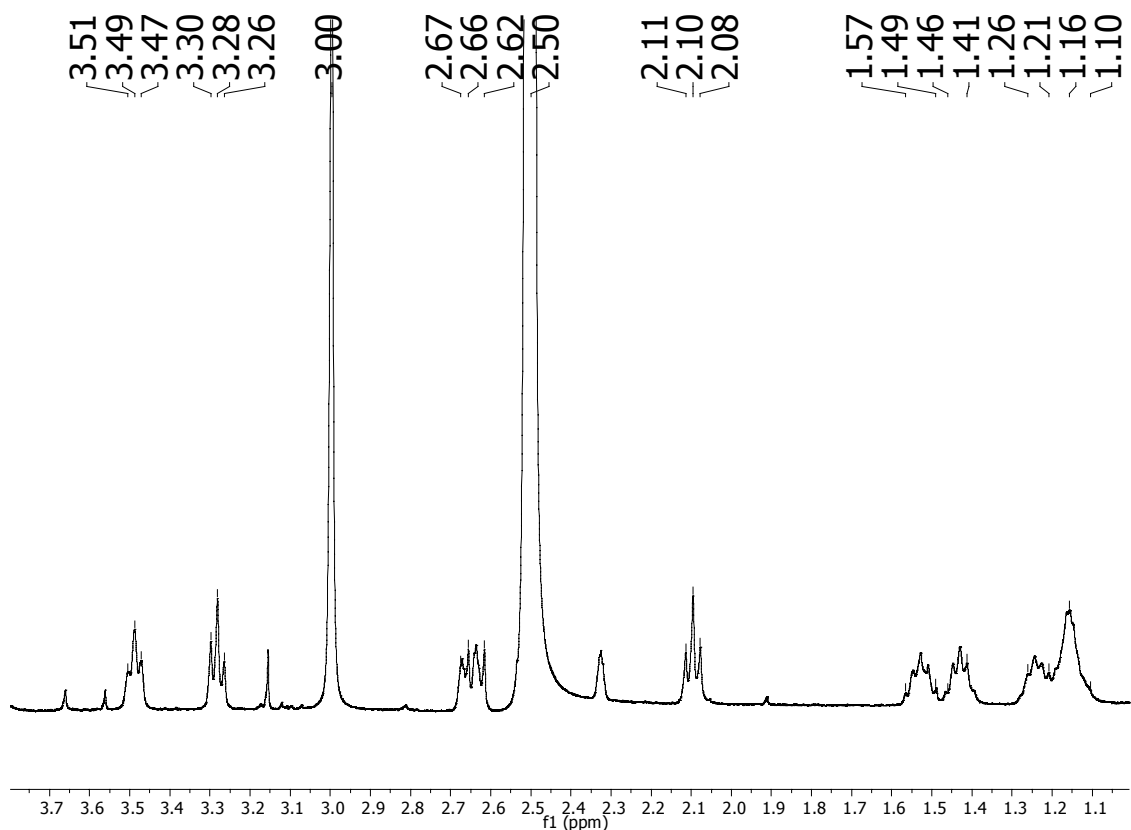


Abbildung 51 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{Au-NP}_{\text{TMA}}$ nach Iodabbau gemäß 4.2.5. 400 MHz, 25 °C, DMSO-d_6 .

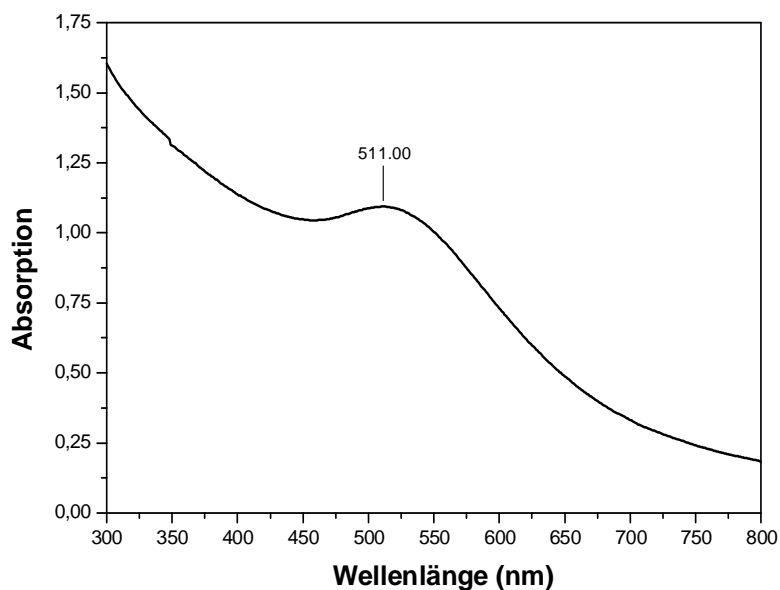


Abbildung 52 UV/Vis-Spektrum von $\text{Au-NP}_{\text{TMA}}$. 25 °C, H_2O .

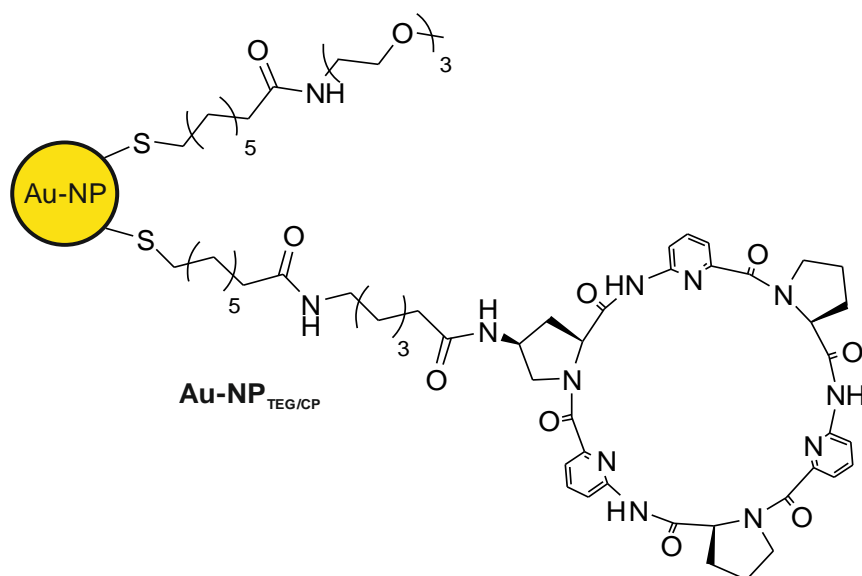
Austausch von Di-*n*-octylamin gegen L_{TEG} und L_{CP}

Au-NP_{TEG/CP}. Die nach 4.4.9 synthetisierte $\text{Au-NP}_{\text{Amin}}$ -Lösung (40 mL) wurde mit einer 0.2 M Lösung des entschützten L_{TEG} in Methanol (1.5 mL) und einer 20 mM Lösung des entschützten L_{CP} in Methanol (0.5 mL) versetzt und für 96 h bei 25 °C gerührt. Anschließend

4 EXPERIMENTELLER TEIL

wurde die organische Phase abdekantiert und der ausgefallene Feststoff im Vakuum getrocknet. Der zurückbleibende Feststoff wurde in H₂O (15 mL) gelöst und die Lösung mittels Zentrifugation bei 5 °C durch eine MWCO-Membran aufgereinigt. Die Nanopartikel wurden anschließend in H₂O (10 mL) gelöst und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das auf diese Weise gereinigte Material wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.3 mg, goldener Feststoff.



4 EXPERIMENTELLER TEIL

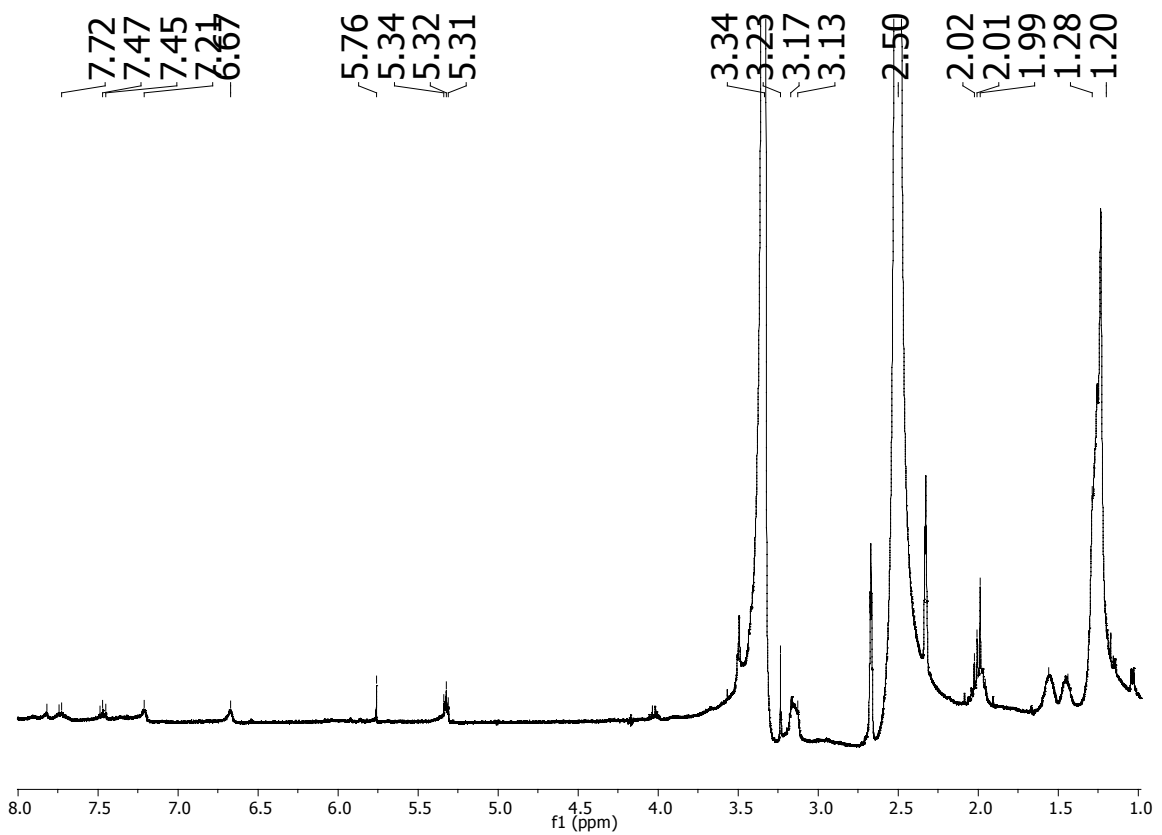


Abbildung 53 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{Au-NP}_{\text{TEG/CP}}$. 400 MHz, 25 °C, DMSO-d_6 .

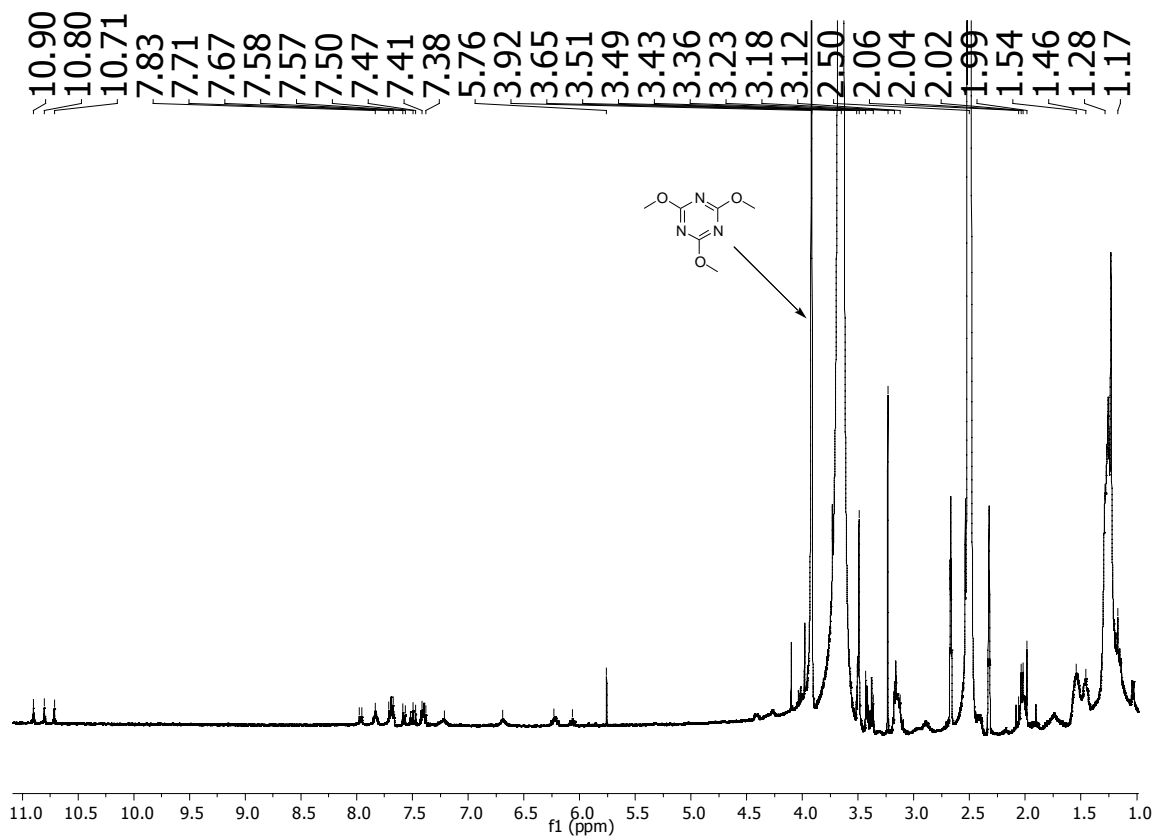


Abbildung 54 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{Au-NP}_{\text{TEG/CP}}$ nach Iodabbau gemäß 4.2.5. 400 MHz, 25 °C, DMSO-d_6 ; interner Standard Trimethoxytriazin bei 3.92 ppm.

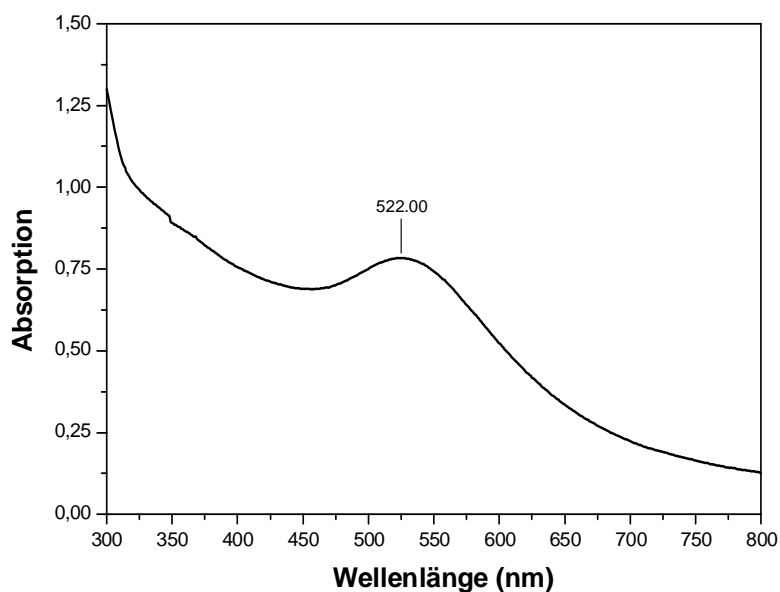


Abbildung 55 UV/Vis-Spektrum von Au-NP_{TEG/CP}. 25 °C, H₂O.

Austausch von Di-*n*-octylamin gegen L_{TMA} und L_{CP}

Au-NP_{TMA/CP}. Die nach 4.4.9 synthetisierte Au-NP_{Amin}-Lösung (40 mL) wurde mit einer 0,2 M Lösung des entschützten L_{TMA} in Methanol (1,5 mL) und einer 20 mM Lösung des entschützten L_{CP} in Methanol (0,5 mL) versetzt und für 96 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde die organische Phase abdekantiert und der ausgefallene Feststoff im Vakuum getrocknet. Der zurückbleibende Feststoff wurde in H₂O (15 mL) gelöst und die Lösung mittels Zentrifugation bei 5 °C durch eine MWCO-Membran aufgereinigt. Die Nanopartikel wurden anschließend in H₂O (10 mL) gelöst und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das auf diese Weise gereinigte Material wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 8,4 mg, goldener Feststoff.

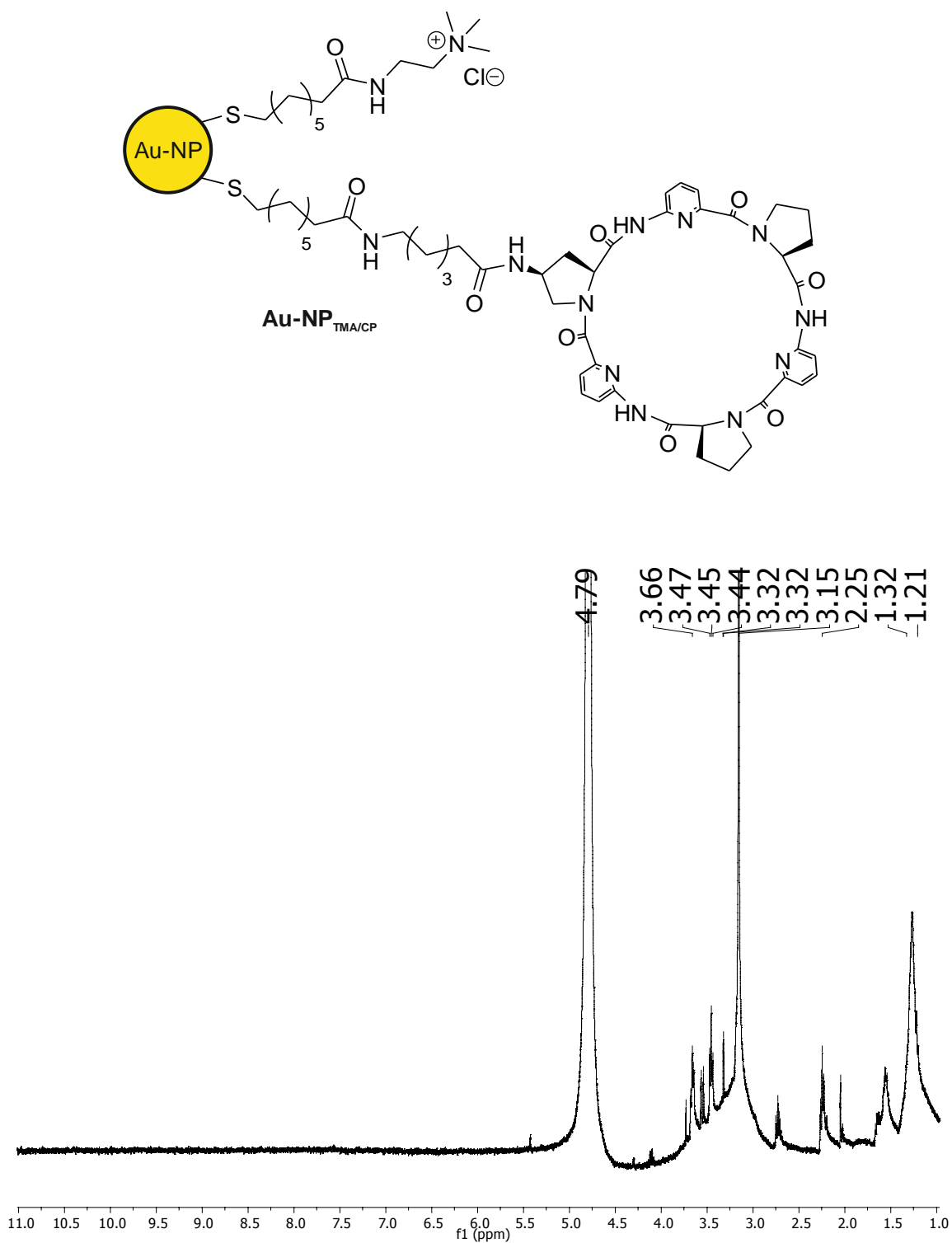


Abbildung 56 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{Au-NP}_{\text{Amin}}$ nach Austausch mit L_{TMA} und L_{CP} . 400 MHz, 25 °C, D_2O .

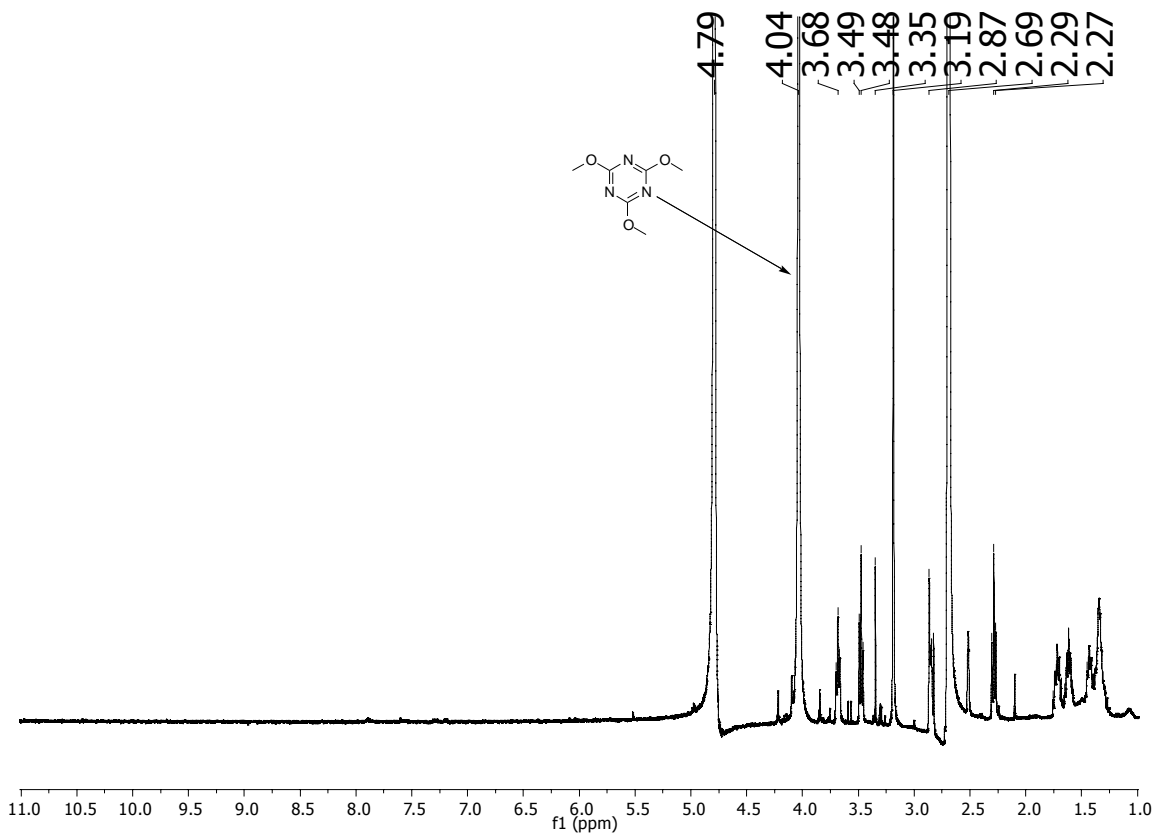


Abbildung 57 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{Au-NP}_{\text{Amin}}$ nach Austausch mit L_{TMA} und L_{CP} nach Iodabbau gemäß 4.2.5. 400 MHz, 25 °C, D_2O ; interner Standard Trimethoxytriazin bei 4.04 ppm.

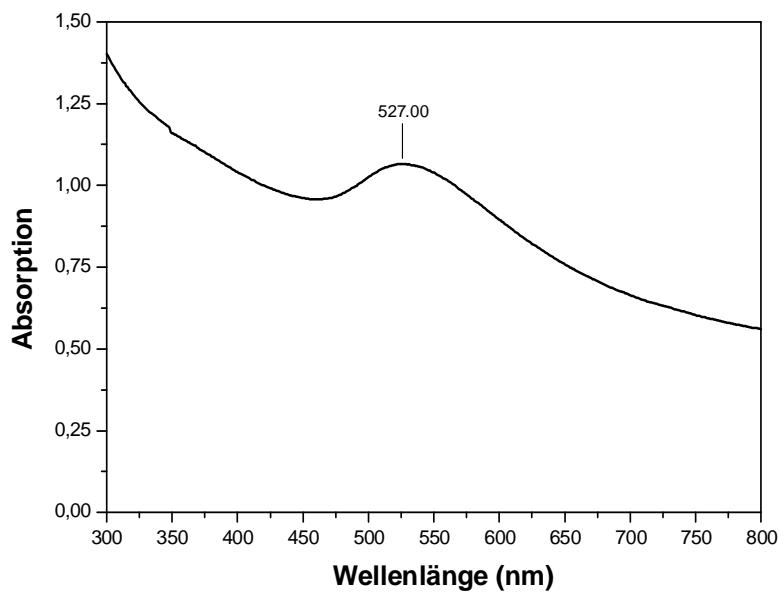


Abbildung 58 UV/Vis-Spektrum von $\text{Au-NP}_{\text{Amin}}$ nach Austausch mit L_{TMA} und L_{CP} . 25 °C, H_2O .

5 Literaturverzeichnis

- [1] L. G. Lange, J. F. Riordan, B. L. Vallee, *Biochemistry* **1974**, *13*, 4361–4370.
- [2] H. Luecke, F. A. Quioco, *Nature* **1990**, *347*, 402–406.
- [3] N. Yao, P. S. Ledvina, A. Choudhary, F. A. Quioco, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2079–2085.
- [4] J. W. Pflugrath, F. A. Quioco, *Nature* **1985**, *314*, 257–260.
- [5] J. J. He, F. A. Quioco, *Science* **1991**, *251*, 1479–1481.
- [6] J. W. Pflugrath, F. A. Quioco, *J. Mol. Biol.* **1988**, *200*, 163–180.
- [7] B. L. Jacobson, F. A. Quioco, *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 783–787.
- [8] K. A. Sharp, J. M. Vanderkooi, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 231–239.
- [9] Y. Marcus, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 1751–1758.
- [10] M. B. Hillyer, B. C. Gibb, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2016**, *67*, 307–329.
- [11] F. Biedermann, W. M. Nau, H. J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11158–11171.
- [12] L. Cao, M. Šekutor, P. Y. Zavalij, K. Mlinarič-Majerski, R. Glaser, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 988–993.
- [13] Y. Marcus, *Ion Properties*, Marcel Dekker, New York, **1997**.
- [14] W. Kunz, J. Henle, B. W. Ninham, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, *9*, 19–37.
- [15] C. L. D. Gibb, B. C. Gibb, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7344–7347.
- [16] M. Lisbjerg, B. M. Jessen, B. Rasmussen, B. E. Nielsen, A. Ø. Madsen, M. Pittelkow, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2647–2650.
- [17] M. Lisbjerg, B. E. Nielsen, B. O. Milhøj, S. P. A. Sauer, M. Pittelkow, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 369–373.
- [18] J. Svec, M. Necas, V. Sindelar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2378–2381.
- [19] V. Havel, J. Svec, M. Wimmerova, M. Dusek, M. Pojarova, V. Sindelar, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4000–4003.
- [20] R. B. P. Elmes, K. A. Jolliffe, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4951–4968.
- [21] S. Kubik, R. Goddard, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2648–2651.
- [22] S. Kubik, R. Goddard, *Chem. Commun.* **2000**, *2*, 633–634.
- [23] S. Kubik, R. Goddard, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9475–9486.
- [24] S. Kubik, R. Goddard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5127–5132.

- [25] S. Kubik, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12752–12760.
- [26] C. Reyheller, B. P. Hay, S. Kubik, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 2095–2102.
- [27] S. Otto, S. Kubik, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7804–7805.
- [28] Z. Rodriguez-Docampo, S. I. Pascu, S. Kubik, S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11206–11210.
- [29] G. Hefter, Y. Marcus, W. E. Waghorne, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2773–2836.
- [30] F. Sommer, *Diplomarbeit TU Kaiserslautern* **2013**.
- [31] F. Sommer, S. Kubik, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8851–8860.
- [32] F. P. Schmidtchen, in *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry* (Ed.: C. A. Schalley), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, pp. 55–78.
- [33] A.-S. Chauvin, S. Comby, B. Song, C. D. B. Vandevyver, J.-C. G. Bünzli, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1726–1739.
- [34] M. Tamaki, G. Han, V. J. Hruby, *J. Org. Chem.* **2001**, 3593–3596.
- [35] B. P. Gangamani, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 15017–15030.
- [36] Y. Marcus, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3880–3897.
- [37] F. Sommer, Y. Marcus, S. Kubik, *ACS Omega* **2017**, *2*, 3669–3680.
- [38] M. A. Yawer, V. Havel, V. Sindelar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 276–279.
- [39] V. Havel, M. A. Yawer, V. Sindelar, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4666–4669.
- [40] M. J. Langton, S. W. Robinson, I. Marques, V. Félix, P. D. Beer, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 1039–1043.
- [41] Y. Marcus, *J. Chem. Thermodyn.* **2007**, *39*, 1338–1345.
- [42] Y. Marcus, *Z. Naturforsch.* **1995**, *50a*, 51–58.
- [43] Y. Marcus, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1989**, *85*, 3019–3032.
- [44] http://bundesrecht.juris.de/bundesrecht/trinkwv_2001/gesamt.pdf; Zugriff am 12.09.2017.
- [45] O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9864–9865.
- [46] I. Grabowska, K. Malecka, U. Jarocka, J. Radecki, H. Radecka, *Acta Biochim. Pol.* **2014**, *61*, 471–478.
- [47] E.-H. Yoo, S.-Y. Lee, *Sensors* **2010**, *10*, 4558–4576.
- [48] M. L. Perdue, D. E. Swayne, *Avian Dis.* **2005**, *49*, 317–327.
- [49] C.-C. Chou, Y.-H. Huang, *Sensors* **2012**, *12*, 16660–16672.
- [50] J. H. Beigel, J. Farrar, A. M. Han, F. G. Hayden, R. Hyer, M. D. de Jong, S. Lochindarat, T. K. T. Nguyen, T. H. Tran, A. Nicoll, et al., *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*,

- 1374–1385.
- [51] *www.who.int*; Zugriff am 12.09.2017.
- [52] E. K. O. Ng, P. K. C. Cheng, A. Y. Y. Ng, T. L. Hoang, W. W. L. Lim, *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1303–1305.
- [53] H. T. Ho, H. L. Qian, F. He, T. Meng, M. Szyport, N. Prabhu, M. Prabakaran, K. P. Chan, J. Kwang, *Clin. Vaccine Immunol.* **2009**, *16*, 726–732.
- [54] K. Malecka, I. Grabowska, J. Radecki, A. Stachyra, A. Góra-Sochacka, A. Sirko, H. Radecka, *Electroanalysis* **2012**, *24*, 439–446.
- [55] B. Saraswathyamma, I. Grzybowska, C. Orlewska, J. Radecki, W. Dehaen, K. G. Kumar, H. Radecka, *Electroanalysis* **2008**, *20*, 2317–2323.
- [56] A. L. Eckermann, D. J. Feld, J. A. Shaw, T. J. Meade, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 1769–1802.
- [57] M. E. Bosch, A. J. R. Sánchez, F. S. Rojas, C. B. Ojeda, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *42*, 291–321.
- [58] U. Jarocka, R. Sawicka, A. Stachyra, A. Góra-Sochacka, A. Sirko, W. Zagórski-Ostoj, V. Sączyńska, A. Porębska, W. Dehaen, J. Radecki, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 7807–7814.
- [59] M. Kłoniecki, A. Jabłonowska, J. Poznański, J. Langridge, C. Hughes, I. Campuzano, K. Giles, M. Dadlez, *J. Mol. Biol.* **2011**, *407*, 110–124.
- [60] J. Schnabel, *Nature* **2011**, *475*, S12–S14.
- [61] M. W. Weiner, D. P. Veitch, P. S. Aisen, L. A. Beckett, N. J. Cairns, R. C. Green, D. Harvey, C. R. Jack, W. Jagust, E. Liu, et al., *Alzheimer's Dement.* **2012**, *8*, S1–S68.
- [62] V. Voiciuk, G. Valincius, R. Budvytyte, A. Matijoška, I. Matulaitiene, G. Niaura, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *95*, 526–532.
- [63] J. Milojevic, G. Melacini, *Biophys. J.* **2011**, *100*, 183–192.
- [64] E. Mikula, M. Sulima, I. Marszalek, A. Wyslouch-Cieszyńska, P. Verwilst, W. Dehaen, J. Radecki, H. Radecka, *Sensors* **2013**, *13*, 11586–11602.
- [65] P. P. Edwards, J. M. Thomas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5480–5486.
- [66] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801–802.
- [67] F. Manea, C. Bindoli, S. Polizzi, L. Lay, P. Scrimin, *Langmuir* **2008**, *24*, 4120–4124.
- [68] W. W. Weare, S. M. Reed, M. G. Warner, J. E. Hutchison, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12890–12891.
- [69] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481–4483.

- [70] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1169.
- [71] M. J. Hostetler, J. E. Wingate, C.-J. Zhong, J. E. Harris, R. W. Vachet, M. R. Clark, J. D. Londono, S. J. Green, J. J. Stokes, G. D. Wignall, et al., *Langmuir* **1998**, *14*, 17–30.
- [72] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *55*, 55–75.
- [73] G. Frens, *Nature-Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20–22.
- [74] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *Langmuir* **2001**, *17*, 6782–6786.
- [75] G. L. Nealon, B. Donnio, R. Greget, J.-P. Kappler, E. Terazzi, J.-L. Gallani, *Nanoscale* **2012**, *4*, 5244–5258.
- [76] M. Zhou, L. Gu, T. C. Abshire, A. Homans, A. L. Billett, A. M. Yeager, H. W. Findley, *Leukemia* **2000**, *14*, 61–67.
- [77] M. Retout, H. Valkenier, T. Doneux, K. Bartik, G. Bruylants, *ACS Sens.* **2016**, *1*, 929–933.
- [78] K. S. Youk, K. M. Kim, A. Chatterjee, K. H. Ahn, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3652–3655.
- [79] S. Watanabe, H. Seguchi, K. Yoshida, K. Kifune, T. Tadaki, H. Shiozaki, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8827–8829.
- [80] W. L. Daniel, M. S. Han, J. S. Lee, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6362–6363.
- [81] M. Zengerle, *Diplomarbeit TU Kaiserslautern* **2009**.
- [82] A. Schaly, *Dissertation TU Kaiserslautern* **2013**.
- [83] H. Kunz, H. Waldmann, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1712–1725.
- [84] E. Soto, J. C. MacDonald, C. G. F. Cooper, W. G. McGimpsey, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2838–2839.
- [85] W. Q. Ong, H. Zhao, Z. Du, J. Z. Y. Yeh, C. Ren, L. Z. W. Tan, K. Zhang, H. Zeng, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6416–6418.
- [86] M. Kameda, M. Ando, C. Nakama, K. Kobayashi, H. Kawamoto, S. Ito, T. Suzuki, T. Tani, S. Ozaki, S. Tokita, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5124–5127.
- [87] H. Takalo, I. Hemmilä, T. Sutela, M. Latva, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 789–802.
- [88] J. D. Badjić, A. Nelson, S. J. Cantrill, W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723–732.
- [89] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksche, J. Dervede, C. Graf, E. W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472–10498.
- [90] M. Heyde, M. Moens, L. Van Vaeck, K. M. Shakesheff, M. C. Davies, E. H. Schacht,

- Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1436–1445.
- [91] X. Li, C. Zhan, Y. Wang, J. Yao, *Chem. Commun.* **2008**, 2444–2446.
- [92] P. Pengo, S. Polizzi, M. Battagliarin, L. Pasquato, P. Scrimin, *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2471–2478.
- [93] P. Nowak, V. Saggiomo, F. Salehian, M. Colomb-Delsuc, Y. Han, S. Otto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4192–4197.
- [94] C. Pfeiffer, C. Rehbock, D. Huhn, C. Carrillo-Carrion, D. J. de Aberasturi, V. Merk, S. Barcikowski, W. J. Parak, *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20130931.
- [95] B. Zhang, B. Yan, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 973–982.
- [96] R. H. Terrill, T. A. Postlethwaite, C.-H. Chen, C. Poon, A. Terzis, A. Chen, J. E. Hutchison, M. R. Clark, G. Wignall, J. D. Londono, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12537–12548.
- [97] O. Uzun, Y. Hu, A. Verma, S. Chen, A. Centrone, F. Stellacci, *Chem. Commun.* **2008**, 196–198.
- [98] A. C. Templeton, M. J. Hostetler, C. T. Kraft, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1906–1911.
- [99] M. P. Rowe, K. E. Plass, K. Kim, C. Kurdak, E. T. Zellers, A. J. Matzger, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3513–3517.
- [100] H. Tan, T. Zhan, W. Y. Fan, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 21690–21693.
- [101] J. Costa, E. Frbrot, P. Jouin, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437–2446.
- [102] S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C. A. Brautigam, P. Schuck, *Anal. Chem.* **2012**, 5066–5073.
- [103] <http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedphat/download.htm>; Zugriff am 12.09.2017.
- [104] L. Gilberg, *Diplomarbeit TU Kaiserslautern* **2008**.

6 ANHANG

6 Anhang

6.1 Supporting Information zu Kapitel 2.2.4

Org. Biomol. Chem.

**Anion binding of a neutral bis(cyclopeptide) in water/methanol mixtures containing up to
95% of water**

Fabian Sommer and Stefan Kubik*

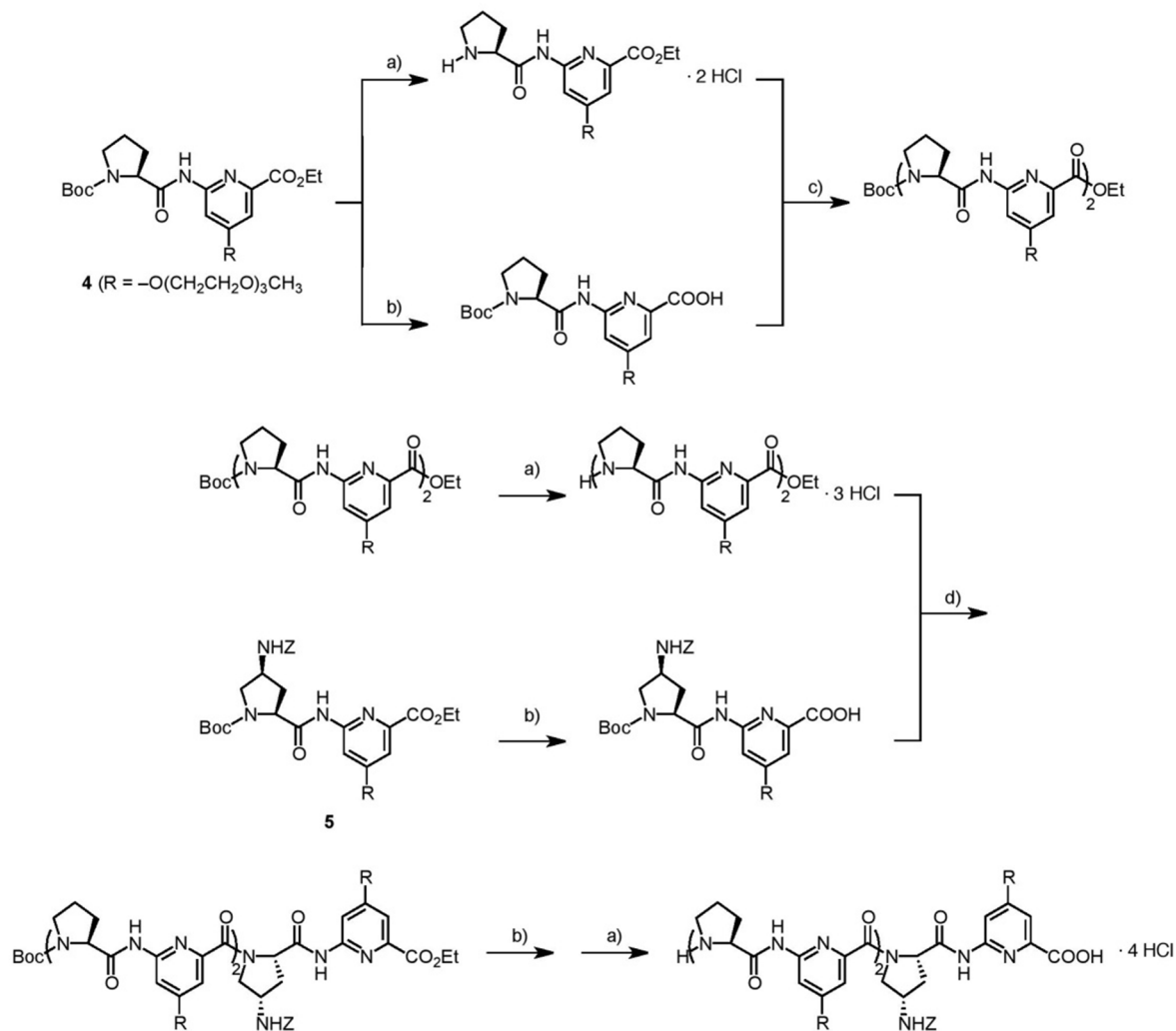
*Fachbereich Chemie - Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-
Schrödinger-Straße, D-67663 Kaiserslautern, Germany, Fax: +49-631-205-3921, Email:
kubik@chemie.uni-kl.de*

CONTENT

Chain Elongation of Dipeptides 4 and 5	S2
¹ H NMR, ¹³ C NMR, and MS Spectra of 4 , 5 , 6 , and 2b	S4
HPLC Analysis of 2b	S12
Qualitative NMR Spectroscopic Evaluation of Iodide Binding	S13
Results of Selected ITC Titrations.....	S14
References.....	S19

Chain Elongation of Dipeptides 4 and 5:

Synthetic Strategy. Synthesis of the linear precursor of cyclopeptide **6** involved initial preparation of a tetrapeptide containing two subunits of dipeptide **4**. This tetrapeptide was deprotected at the N-terminus and coupled to C-deprotected dipeptide **5**. The resulting hexapeptide was finally deprotected at both ends.



a) 4 N HCl, 1,4-dioxane, 2 h, 0-5 °C, b) 1.2 equiv 1 N NaOH, 1,4-dioxane, 2 h, 25 °C, c) PyCloP, DIEA, CH_2Cl_2 , 25 °C, 18 h, d) TBTU, DIEA, DMF, 18 h, 25 °C.

General procedure for the cleavage of ethyl esters. The ester was dissolved in 1,4-dioxane (20 mL/mmol). Addition of aqueous 1 N NaOH (1.2 equiv) was followed by stirring for 2 h at room

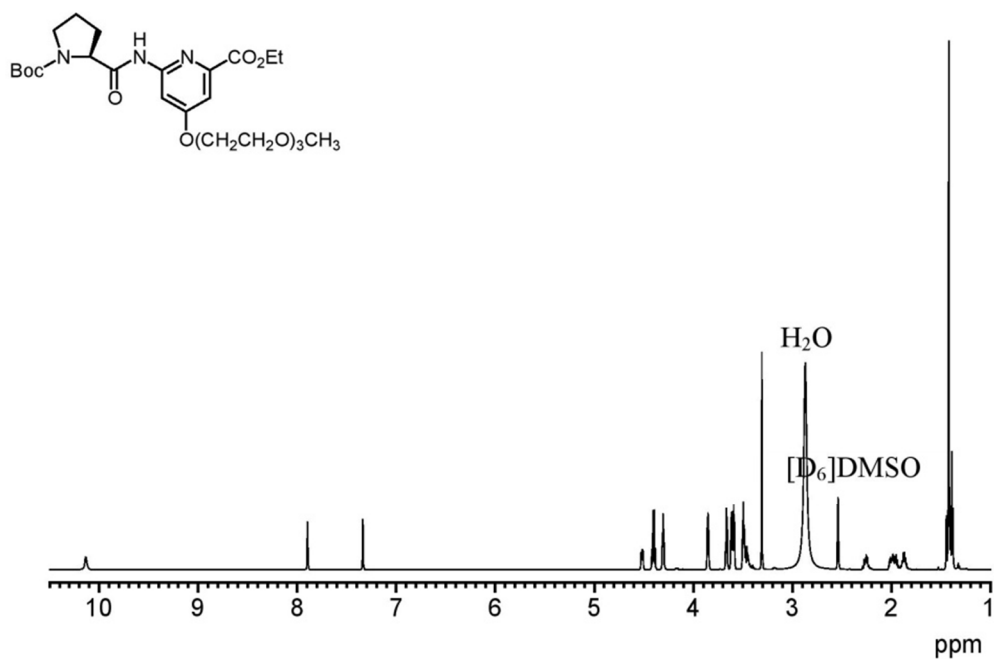
temperature. Afterward, water (20 mL/mmol) was added and the 1,4-dioxane was removed *in vacuo*. The aqueous solution was washed with diethyl ether twice (in the case of the linear hexapeptide this step was omitted) and the organic layers discarded. After acidification of the mixture to pH 2 by addition of 3% aqueous KHSO₄ it was extracted with ethyl acetate three times. The combined organic layers were washed three times with water, dried, and evaporated to dryness *in vacuo*. The residue was used for the next step without further purification.

General procedure for the cleavage of *N*-tert-butoxycarbonyl groups. The carbamate was suspended in 1,4-dioxane (20 mL). This suspension was cooled in an ice bath and a 6 N solution of HCl in 1,4-dioxane (40 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 2 h at 0-5 °C and then concentrated to dryness *in vacuo*.

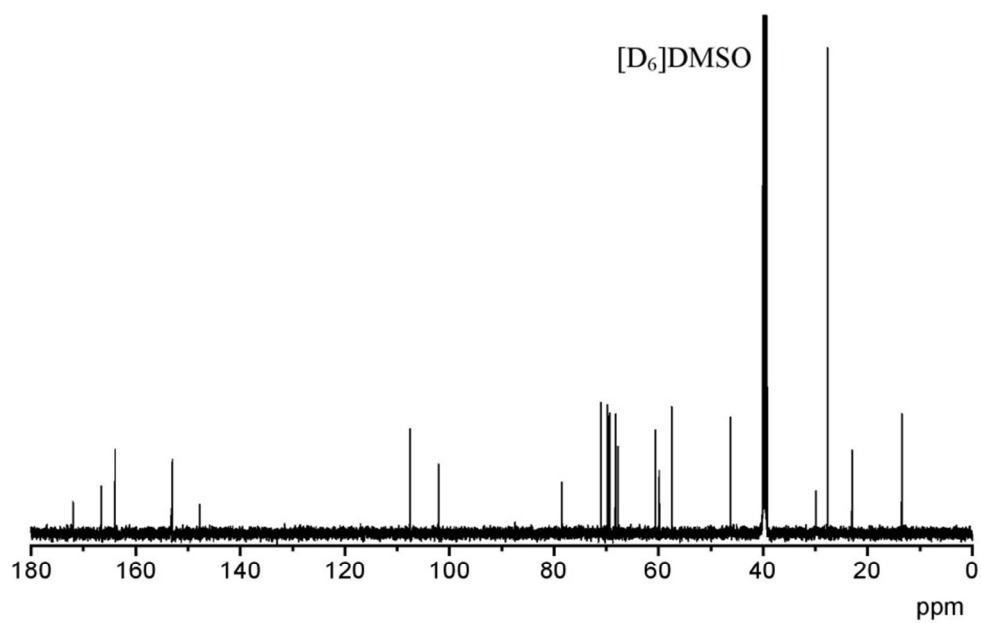
Boc-(Pro-Mapa)₂-OEt. Dipeptide **4** (0.82 g, 1.55 mmol) was deprotected at the C-terminus and another portion of **4** (0.74 g, 1.40 mmol) at the N-terminus according to the general procedures. The products were dissolved in dry dichloromethane (30 mL) and PyCloP (0.75 g, 1.86 mmol) and DIEA (1.1 mL, 6.52 mmol) were added. After stirring at 25 °C for 20 h the solvent was removed *in vacuo*, and the residue purified by column chromatography (SiO₂, dichloromethane/methanol, 10:1 (v/v)). The product was afforded as an oil, which was used without further purification. Yield 1.18 g (93 %), yellow-orange sticky oil. MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 906 (100 %) [M+H]⁺, 928 (31 %) [M+Na]⁺, 944 (9 %) [M+K]⁺.

Boc-(4Z-Apro)-Mapa-(Pro-Mapa)₂-OEt. Tetrapeptide Boc-(Pro-Mapa)₂-OEt (1.11 g, 1.23 mmol) was deprotected at the N-terminus and dipeptide **5** (0.82 g, 1.22 mmol) at the C-terminus according to the general procedures. These products were dissolved in DMF (40 mL) and TBTU (0.47 g, 1.46 mmol) and DIEA (1.1 mL, 6.58 mmol) were added. After stirring at 25 °C for 18 h, the solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by column chromatography (SiO₂, dichloromethane/methanol, 10:1 (v/v)). The resulting oil was used without further purification. Yield 1.48 g (84 %), yellow sticky oil. MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 1434 (100 %) [M+H]⁺, 1456 (89 %) [M+Na]⁺, 1472 (41 %) [M+K]⁺.

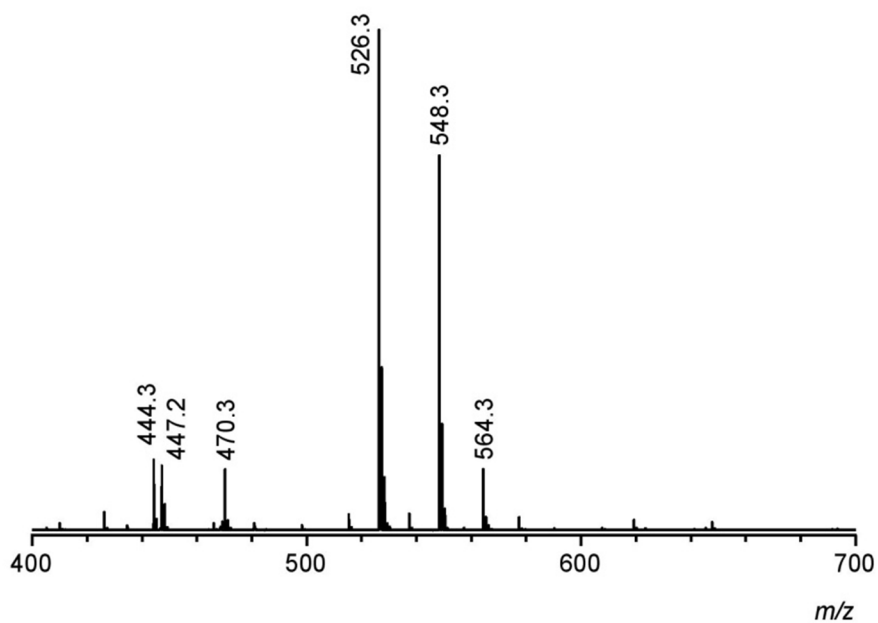
^1H NMR Spectrum: Boc-Pro-Mapa-OEt **4** (600 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 100 °C).



^{13}C NMR Spectrum: Boc-Pro-Mapa-OEt **4** (151 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 100 °C).

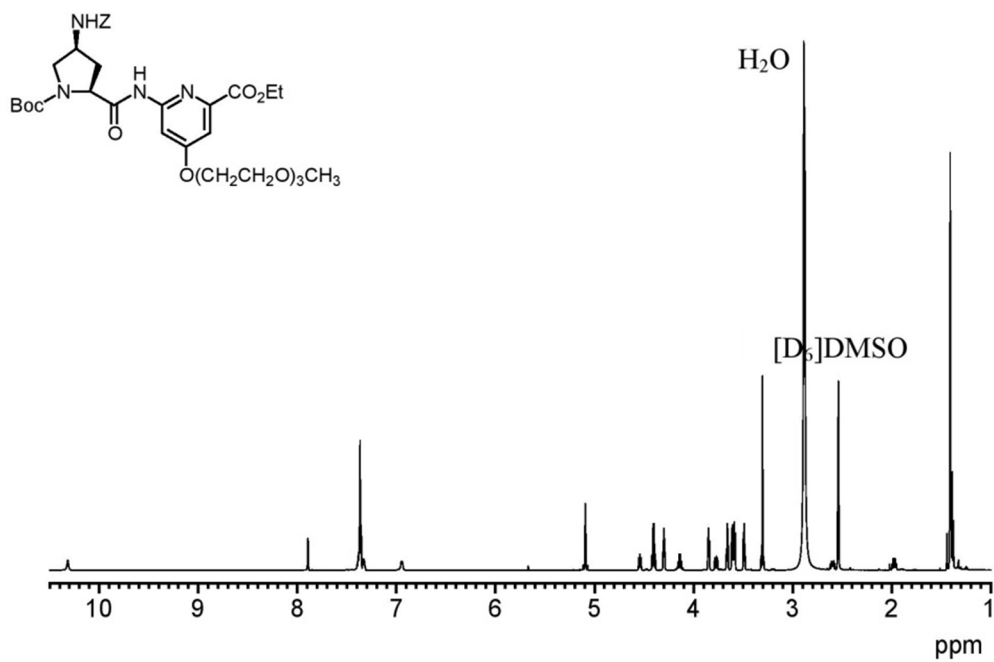


MALDI-TOF MS Spectrum: Boc-Pro-Mapa-OEt 4 (positive mode).

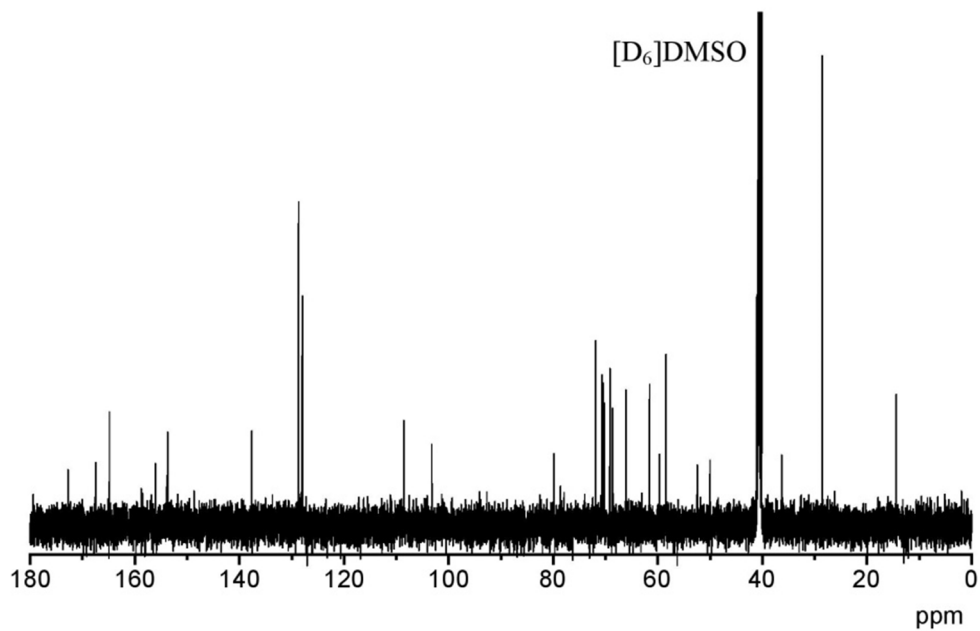


		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M-iso-butene-C_2H_2+H]^+$	$C_{25}H_{39}N_3O_9 - C_4H_8 - C_2H_2 + H^+$	444.2	444.3
$[M-Boc+Na]^+$	$C_{25}H_{39}N_3O_9 - C_5H_9O_2 + Na^+$	447.2	447.2
$[M-iso-butene+H]^+$	$C_{25}H_{39}N_3O_9 - C_4H_8 + H^+$	470.2	470.3
$[M+H]^+$	$C_{25}H_{39}N_3O_9 + H^+$	526.3	526.3
$[M+Na]^+$	$C_{25}H_{39}N_3O_9 + Na^+$	548.3	548.3
$[M+K]^+$	$C_{25}H_{39}N_3O_9 + K^+$	564.2	564.3

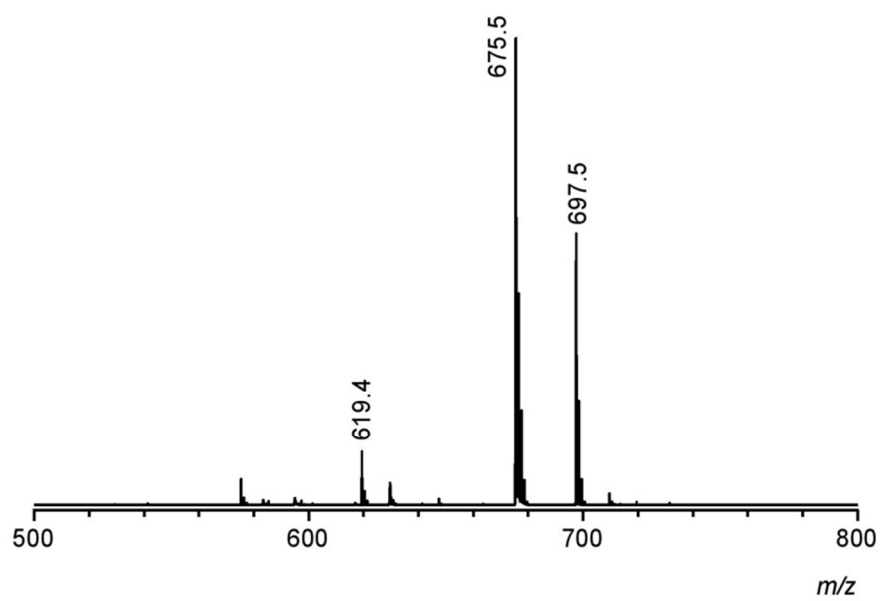
¹H NMR Spectrum: Boc-(4Z-Apro)-Mapa-OEt **5** (600 MHz, [D₆]DMSO, 100 °C).



¹³C NMR Spectrum: Boc-(4Z-Apro)-Mapa-OEt **5** (151 MHz, [D₆]DMSO, 100 °C).

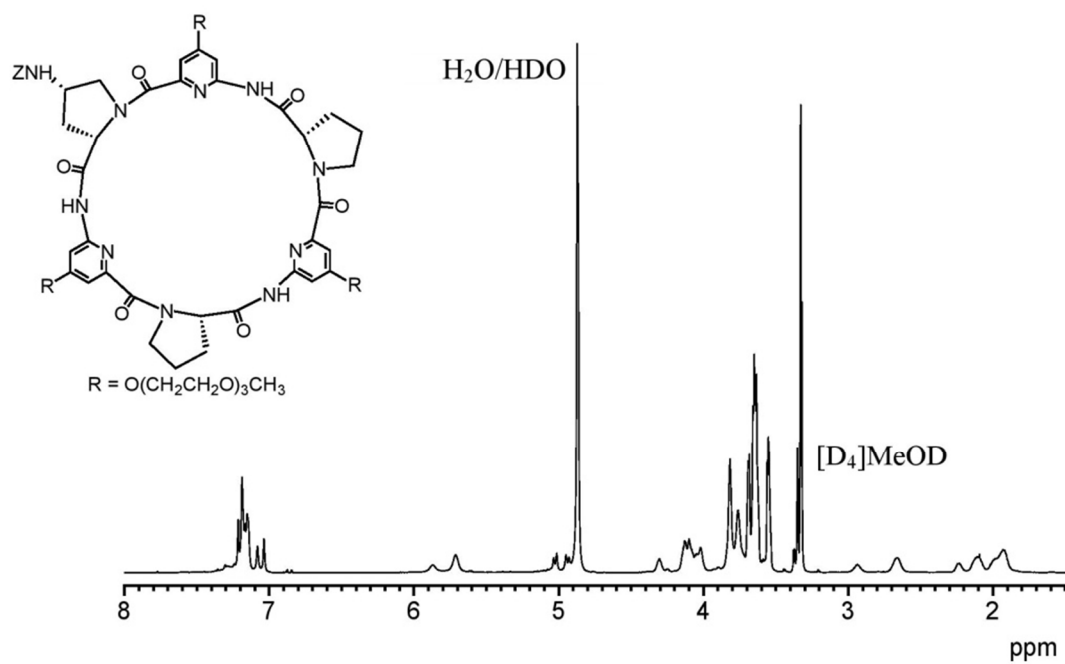


MALDI-TOF MS Spectrum: Boc-(4Z-Apro)-Mapa-OEt 5 (positive mode).

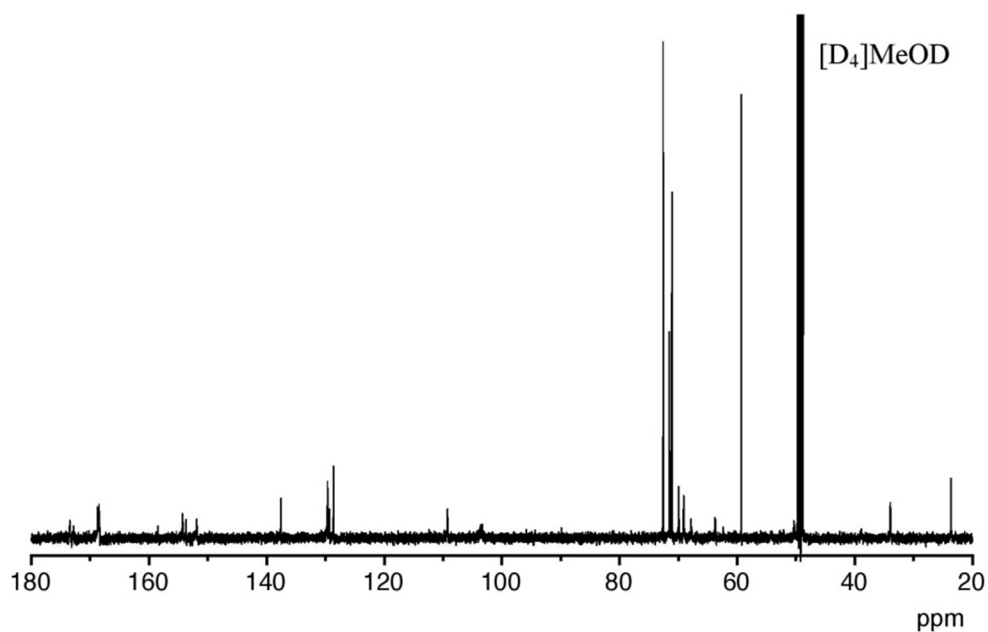


		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M-iso-butene+H]^+$	$C_{33}H_{46}N_4O_{11} - C_4H_8 + H^+$	619.3	619.4
$[M+H]^+$	$C_{33}H_{46}N_4O_{11} + H^+$	675.3	675.5
$[M+Na]^+$	$C_{33}H_{46}N_4O_{11} + Na^+$	697.3	697.5

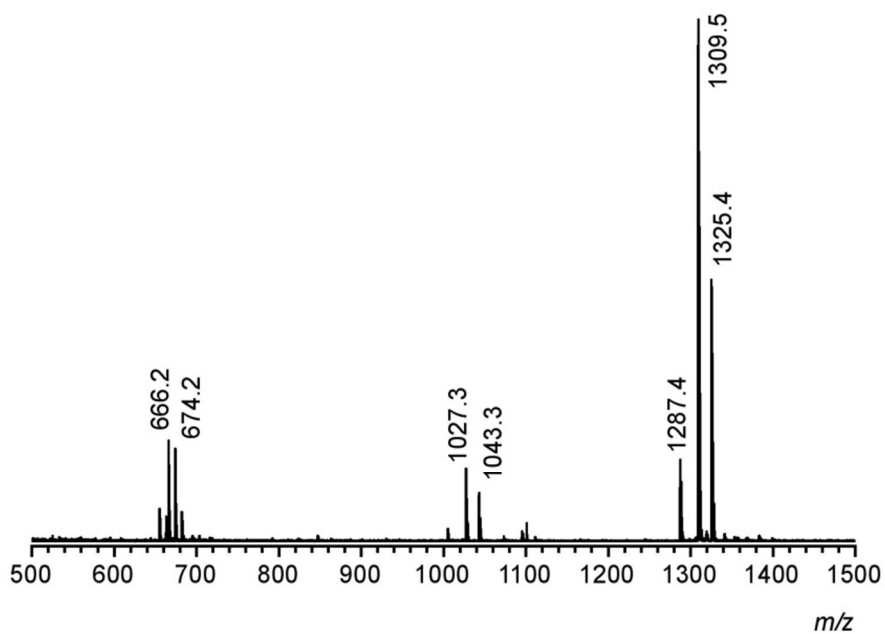
^1H NMR Spectrum: *cyclo*[(4Z-Apro)-Mapa-(Pro-Mapa) $_2$] **6** (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}/[\text{D}_4]\text{MeOD}$, 1:1 (v/v), 25 °C).



^{13}C NMR Spectrum: *cyclo*[(4Z-Apro)-Mapa-(Pro-Mapa) $_2$] **6** (151 MHz, $\text{D}_2\text{O}/[\text{D}_4]\text{MeOD}$, 1:1 (v/v), 25 °C).

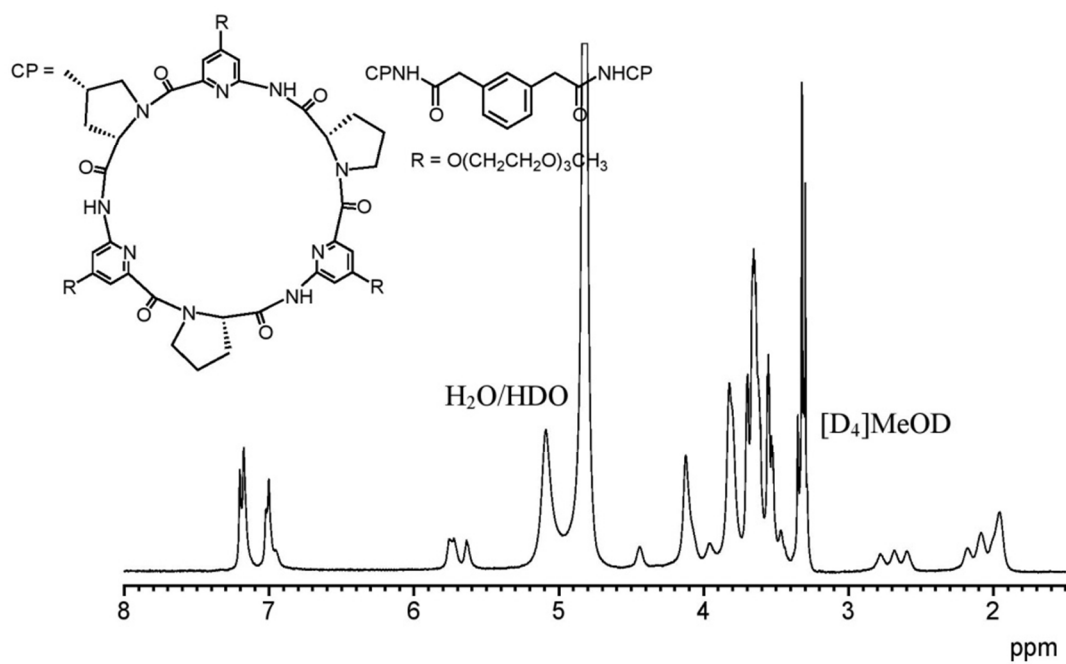


ESI-TOF MS Spectrum: *cyclo*[(4Z-Apro)-Mapa-(Pro-Mapa)₂] **6** (positive mode).

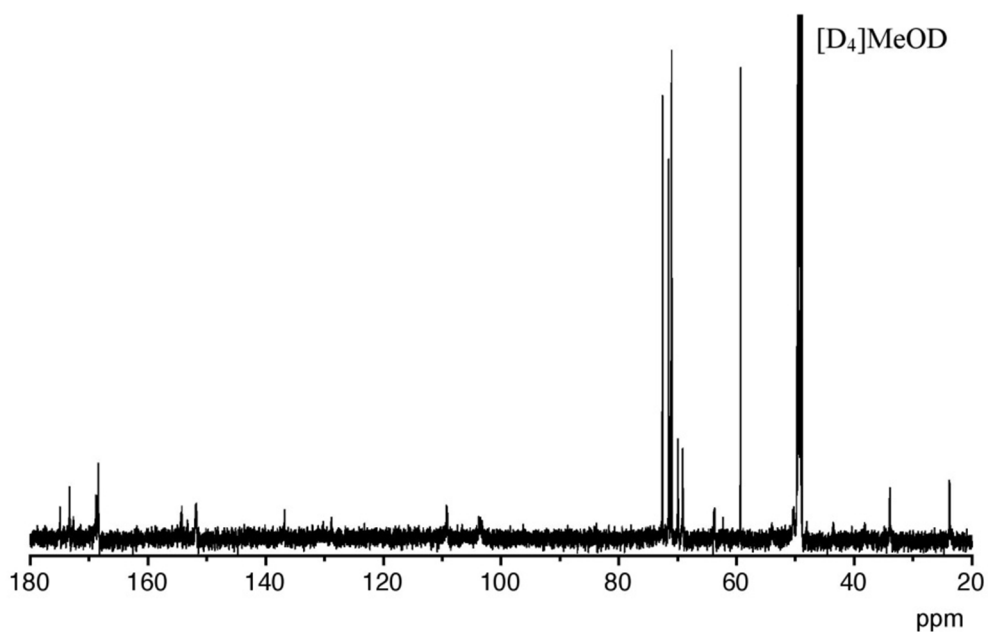


		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M+2Na]^{2+}$	$C_{62}H_{82}N_{10}O_{20} + 2Na^+$	666.3	666.2
$[M+Na+K]^{2+}$	$C_{62}H_{82}N_{10}O_{20} + Na^+ + K^+$	674.3	674.2
$[M-Teg-Z+Na]^+$	$C_{62}H_{82}N_{10}O_{20} - C_7H_{15}O_3 - C_8H_7O_2 + Na^+$	1027.4	1027.3
$[M-Teg-Z+K]^+$	$C_{62}H_{82}N_{10}O_{20} - C_7H_{15}O_3 - C_8H_7O_2 + K^+$	1043.4	1043.3
$[M+H]^+$	$C_{62}H_{82}N_{10}O_{20} + H^+$	1287.6	1287.4
$[M+Na]^+$	$C_{62}H_{82}N_{10}O_{20} + Na^+$	1309.6	1309.5
$[M+K]^+$	$C_{62}H_{82}N_{10}O_{20} + K^+$	1325.5	1325.4

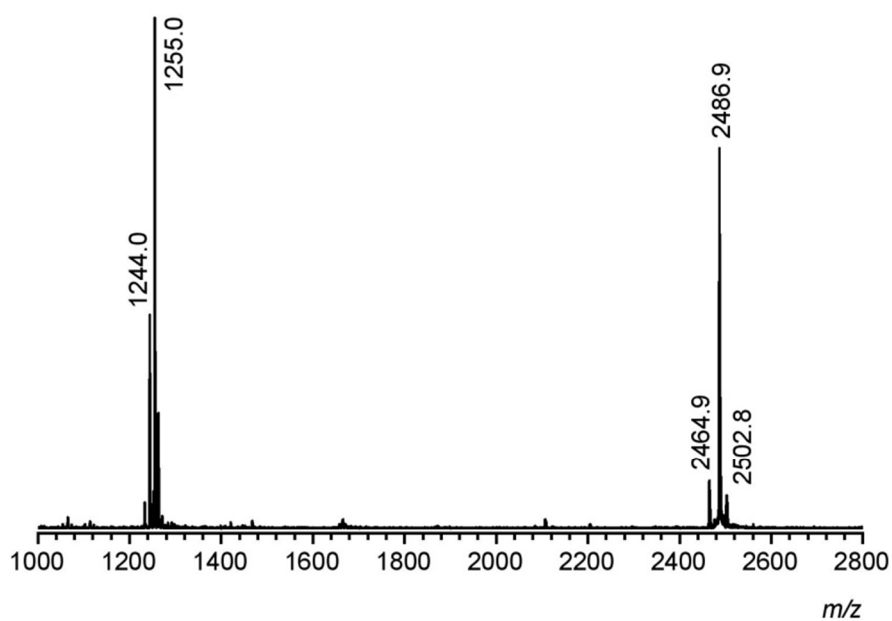
^1H NMR Spectrum: $\{\text{cyclo}[\text{Apro-Mapa-(Pro-Mapa)}_2]\}_2\text{Pda}$ **2b** (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}/[\text{D}_4]\text{MeOD}$, 1:1 (v/v), 25 °C).



^{13}C NMR Spectrum: $\{\text{cyclo}[\text{Apro-Mapa-(Pro-Mapa)}_2]\}_2\text{Pda}$ **2b** (151 MHz, $\text{D}_2\text{O}/[\text{D}_4]\text{MeOD}$, 1:1 (v/v), 25 °C).

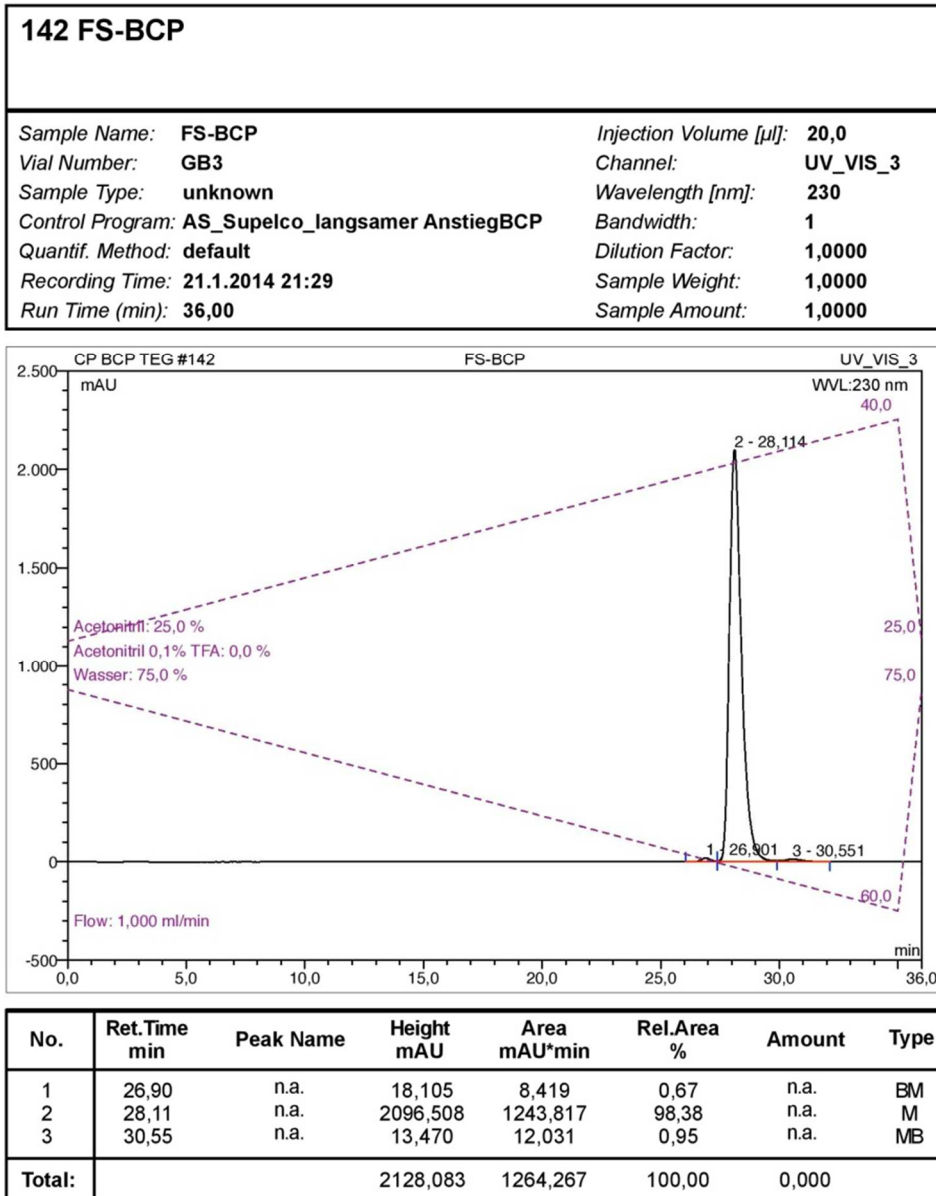


ESI-TOF MS Spectrum: {*cyclo*[Apro-Mapa-(Pro-Mapa)₂]}₂Pda **2b** (positive mode).

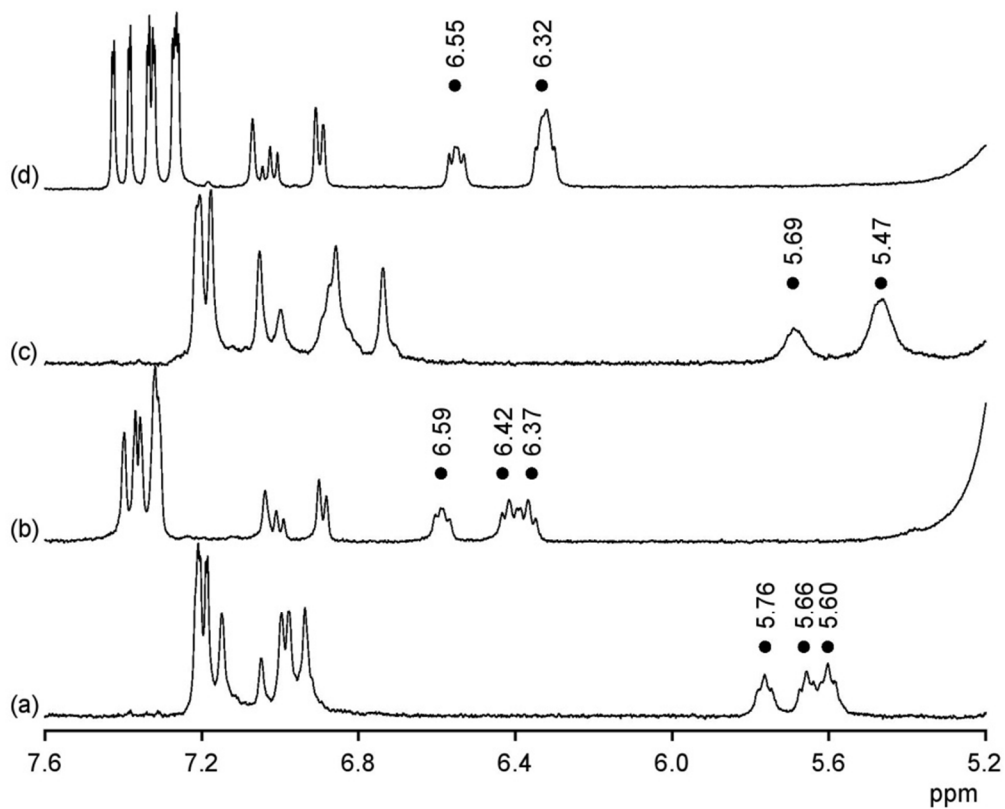


		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
[M+H+Na] ²⁺	C ₁₁₈ H ₁₅₈ N ₂₀ O ₃₈ + H ⁺ + Na ⁺	1243.6	1244.0
[M+2Na] ²⁺	C ₁₁₈ H ₁₅₈ N ₂₀ O ₃₈ + 2 Na ⁺	2554.5	1255.0
[M+H] ⁺	C ₁₁₈ H ₁₅₈ N ₂₀ O ₃₈ + H ⁺	2464.1	2464.9
[M+Na] ⁺	C ₁₁₈ H ₁₅₈ N ₂₀ O ₃₈ + Na ⁺	2486.1	2486.9
[M+K] ⁺	C ₁₁₈ H ₁₅₈ N ₂₀ O ₃₈ + K ⁺	2502.1	2502.8

HPLC: 2b (Dionex P680 HPLC Pump, ASI-100 Autosampler, TCC-100 Column Oven, UVD 170U UV/Vis Detector, Chromeleon V6.70 Software, Supelco Ascentis® C18 Column, 4.6 × 250 mm, 5 µm)



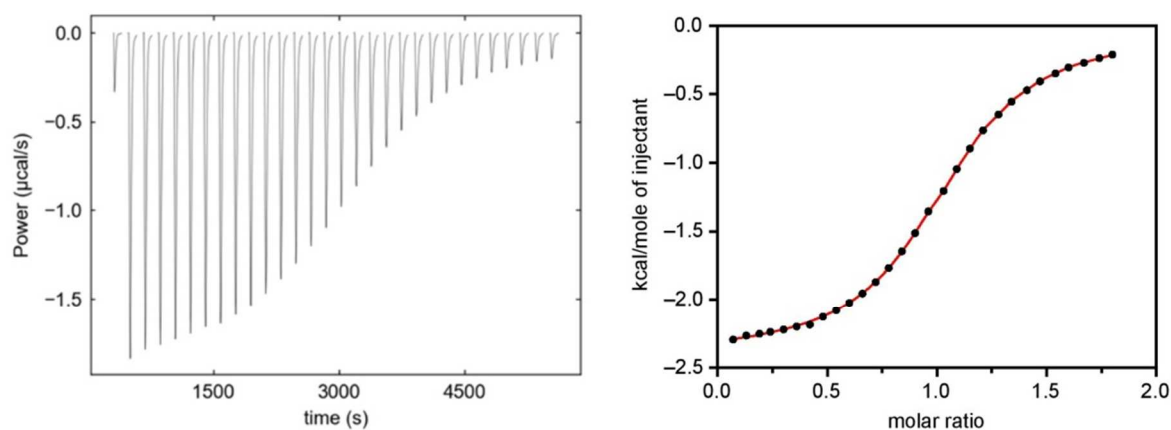
Qualitative NMR Spectroscopic Evaluation of Iodide Binding: ^1H NMR spectra of bis(cyclopeptide) **2b** (1.8 mM) prior (a) and after (b) the addition of 2 equiv of NaI in in 50% $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ and of **2b** (1.0 mM) prior (c) and after (d) the addition of 2 equiv of NaI in in 90% $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$. The dots indicate the signals of the $\text{H}(\alpha)$ protons on the proline residues of **2b**.

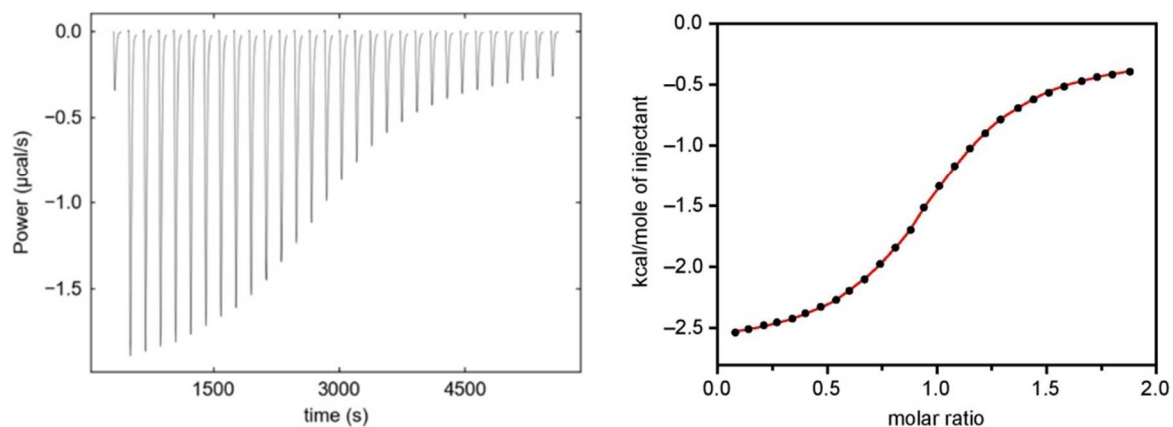
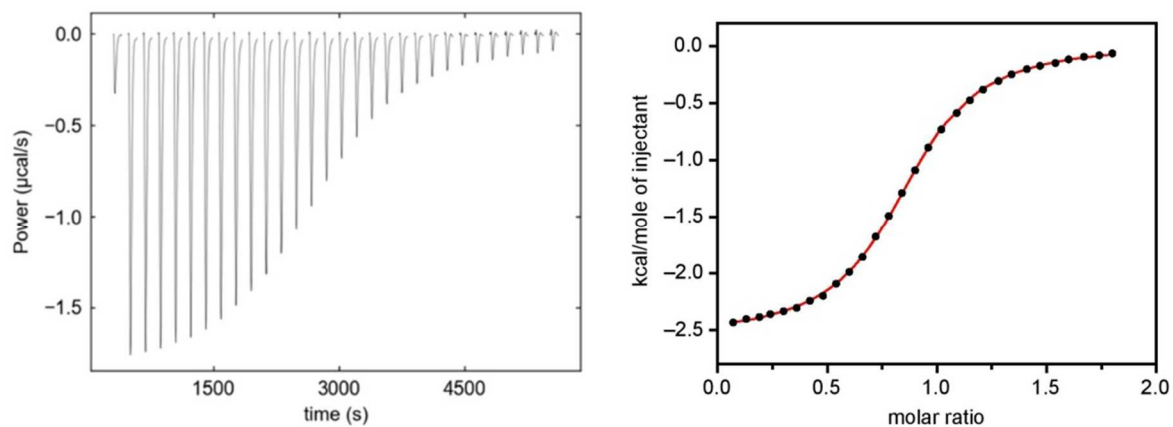
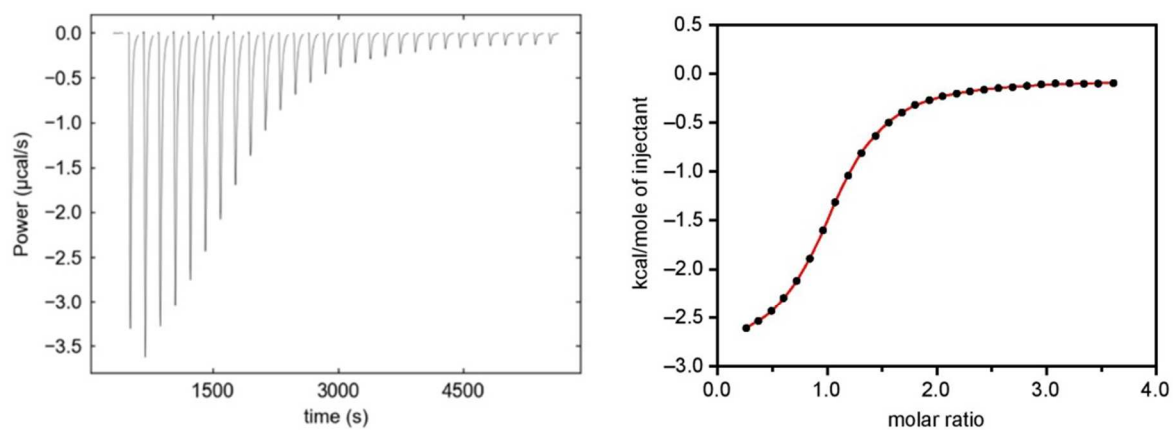


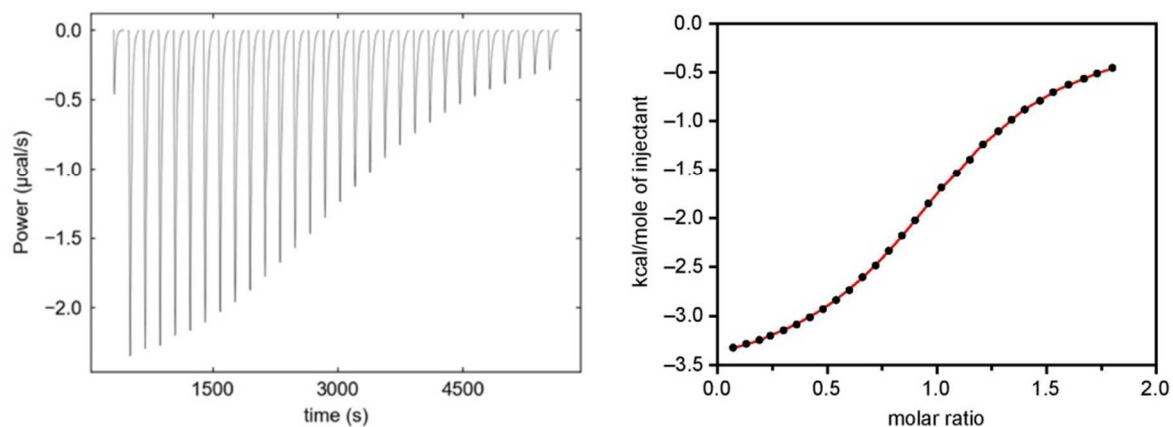
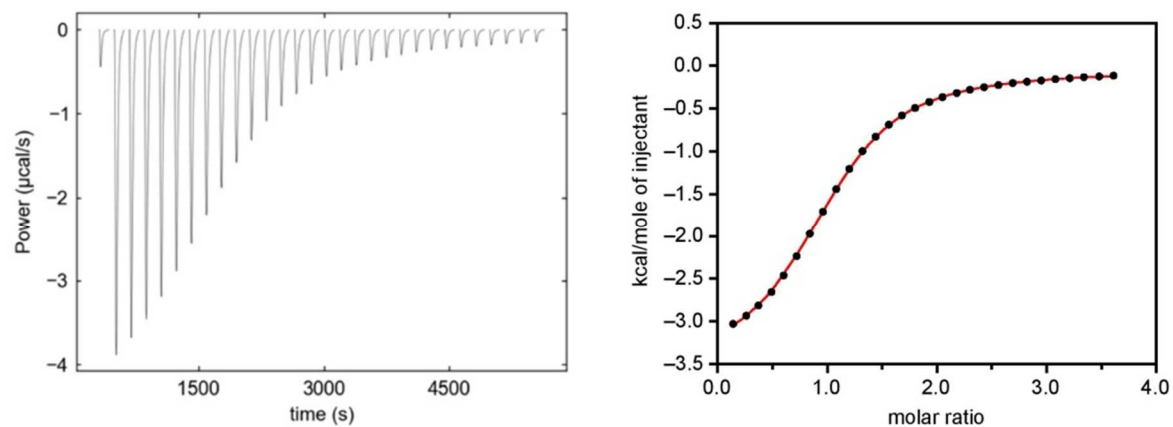
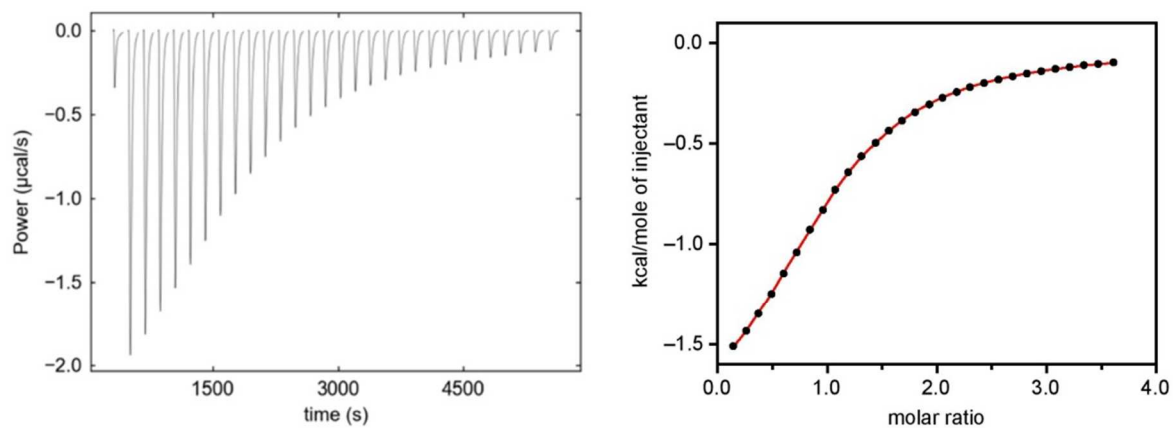
Results of Selected ITC Titrations**Table S1.** Concentrations of **2b** and the salts used in the ITC titrations.

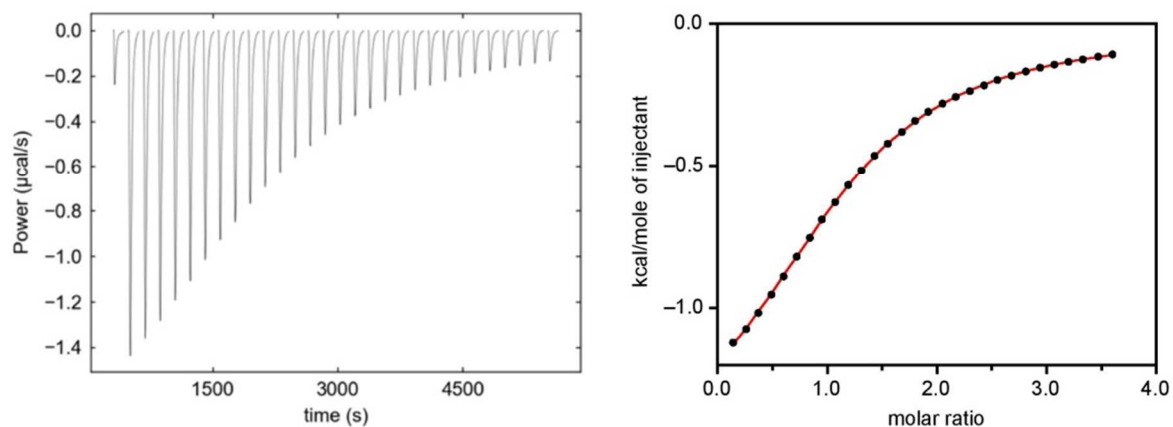
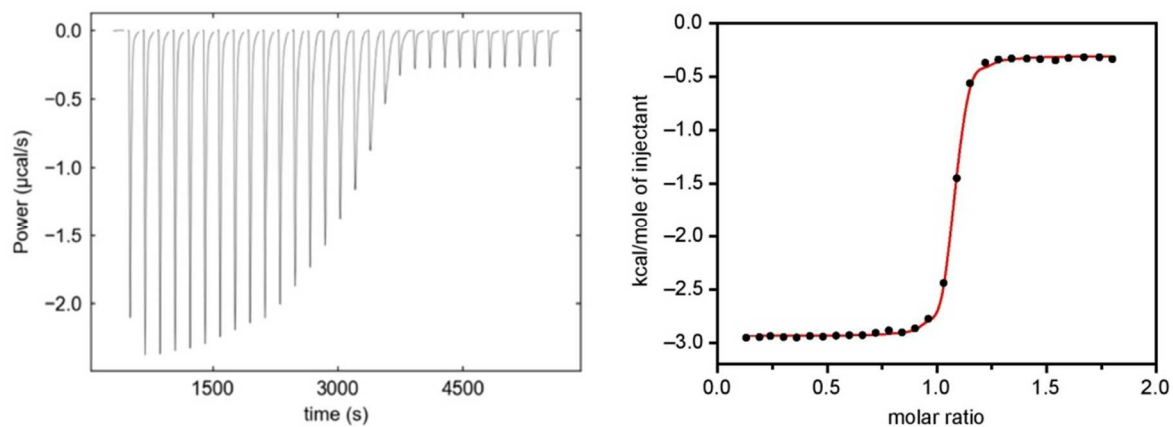
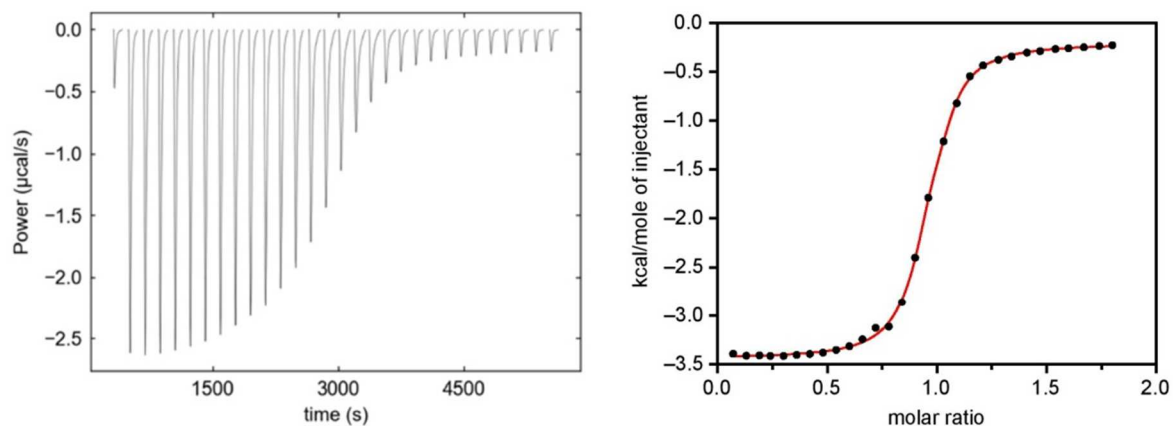
vol% of water in the water/methanol mixture	guest salt	$c(\text{Receptor}) / \text{mM}$	$c(\text{Guest}) / \text{mM}$
20%	NaI	0.25	2.5
	NaI	0.25	2.5
	+ 15-crown-5	+ 2.5 mM 15-crown-5	+ 2.5 mM 15-crown-5
30%	(CH ₃) ₄ NI	0.25	2.5
	NaI	0.25	5.0
	Na ₂ SO ₄	0.25	2.5
50%	NaI	0.25	2.5
	Na ₂ SO ₄	0.25	2.5
70%	NaI	0.25	5.0
	Na ₂ SO ₄	0.25	2.5
90%	NaI	0.25	5.0
95%	NaI	0.25	5.0
	Na ₂ SO ₄	0.25	2.5

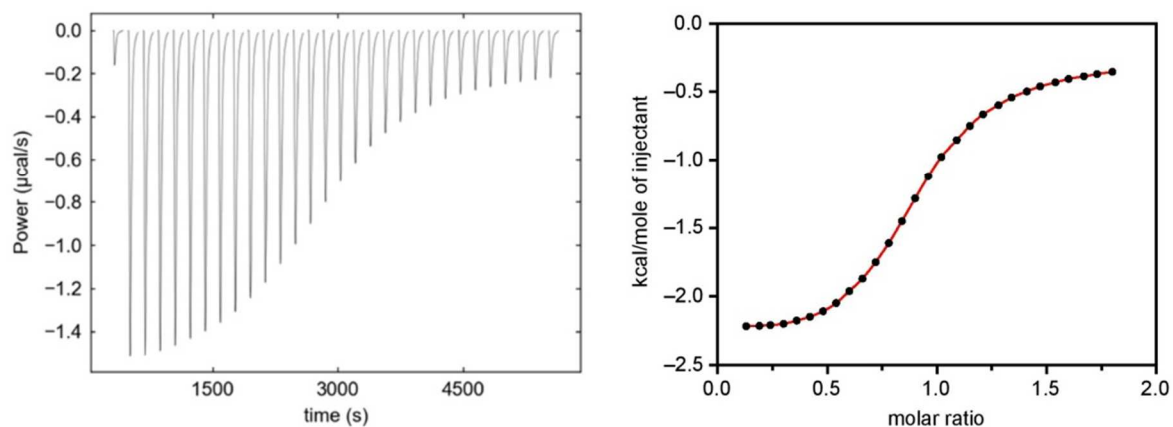
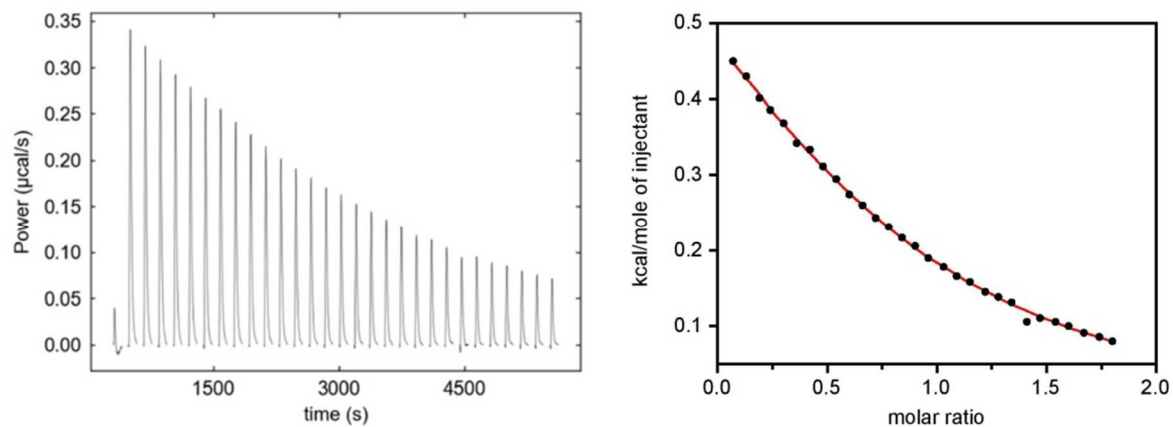
All of the following thermograms were generated by using NITPIC¹ and the binding isotherms by using Sedphat.^{2,3} The circles in the isotherms denote the experimental data and the lines represent the isotherms fitted by using the one-site model.

Titration of receptor **2b** with sodium iodide in 20% water/methanol

Titration of receptor **2b** with sodium iodide in 20% water/methanol in the presence of 15-crown-5Titration of receptor **2b** with tetramethylammonium iodide in 20% water/methanolTitration of receptor **2b** with sodium iodide in 30% water/methanol

Titration of receptor **2b** with sodium iodide in 50% water/methanolTitration of receptor **2b** with sodium iodide in 70% water/methanolTitration of receptor **2b** with sodium iodide in 90% water/methanol

Titration of receptor **2b** with sodium iodide in 95% water/methanolTitration of receptor **2b** with sodium sulfate in 30% water/methanolTitration of receptor **2b** with sodium sulfate in 50% water/methanol

Titration of receptor **2b** with sodium sulfate in 70% water/methanolTitration of receptor **2b** with sodium sulfate in 95% water/methanol

References

- 1 S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C. A. Brautigam and P. Schuck, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 5066-5073.
- 2 J. C. D. Houtman, P. H. Brown, B. Bowden, H. Yamaguchi, E. Appella, L. E. Samelson and P. Schuck, *Protein Sci.*, 2007, **16**, 30-42.
- 3 <http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedphat/download.htm>.

6 ANHANG

6.2 Supporting Information zu Kapitel 2.3.6

**Effects of Solvent Properties on the Anion-Binding of Neutral Water-Soluble
Bis(cyclopeptides) in Water and Aqueous Solvent Mixtures**

Fabian Sommer,[†] Yizhak Marcus,[§] Stefan Kubik^{*,†}

[†] *Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie - Organische Chemie, Erwin-Schrödinger-Straße, 67663 Kaiserslautern, Germany. E-mail: kubik@chemie.uni-kl.de.*

[§] *Institute of Chemistry, The Hebrew University, Edmund Safra Campus, Givat Ram, Jerusalem 91904, Israel*

CONTENT

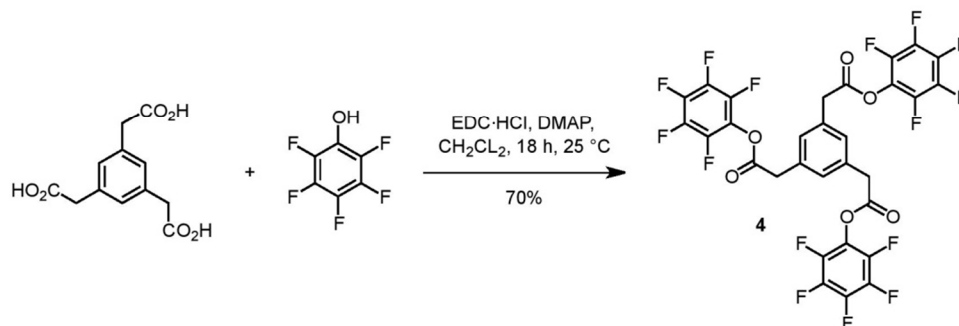
Synthesis of Bis(cyclopeptide) 2	S2
¹ H NMR, ¹³ C NMR, and MS Spectra	S9
Results of the Qualitative Binding Studies	S15
Selected ITC Titrations	S18
Solvent Dependence of Iodide Affinity of 1 and 2	S22
Solvent Dependence of Sulfate Affinity of 1 and 2	S25
Solvent Dependence of Solvent Properties	S27
Correlation of the Enthalpy of Iodide Binding to 1 With Preferential Solvation	S31
References	S34

Synthesis of Bis(cyclopeptide) 2:

General details. Analyses were carried out as follows: melting points, Müller SPM-X 300; NMR, Bruker AVANCE III 400 and 600 (peak assignments were confirmed by using H,H-COSY and HMQC spectra, ^1H and ^{13}C NMR spectra were referenced to the residual solvent signals (CDCl_3 : $\delta_{\text{H}} = 7.26$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 77.2$ ppm; $\text{DMSO}-d_6$: $\delta_{\text{H}} = 2.50$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39.5$ ppm $\text{MeOH}-d_4$: $\delta_{\text{H}} = 3.31$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 49.0$ ppm;), trifluoroacetic acid was used as an internal standard for the ^{19}F NMR spectra with $\delta_{\text{F}}(\text{TFA}) = -76.55$ ppm; MALDI-TOF-MS, Bruker Ultraflex TOF/TOF; ESI-MS, Bruker amaZon SL; elemental analysis, Elementar vario Micro cube; optical rotation, JASCO P-2000 ($d = 10$ cm); preparative HPLC, Dionex Ultimate 3000 (column, Supelco Ascentis®, 250×21.2 mm, $5 \mu\text{m}$ particle size; flow, 10 mL min^{-1} ; eluent, aqueous: water, organic: acetonitrile; the following gradient was used for the isolation of **2**: 0 min, 25% organic; 0-35 min, linear increase to 40% organic; 35-40 min, 40% organic; 40-41 min, linear increase to 95% organic; 41-46 min, 95% organic; 46-47 min, linear decrease to 25% organic; 47-55 min, 25% organic); ITC, Microcal VP-ITC; precision balance, Kern ABT 100-5M.

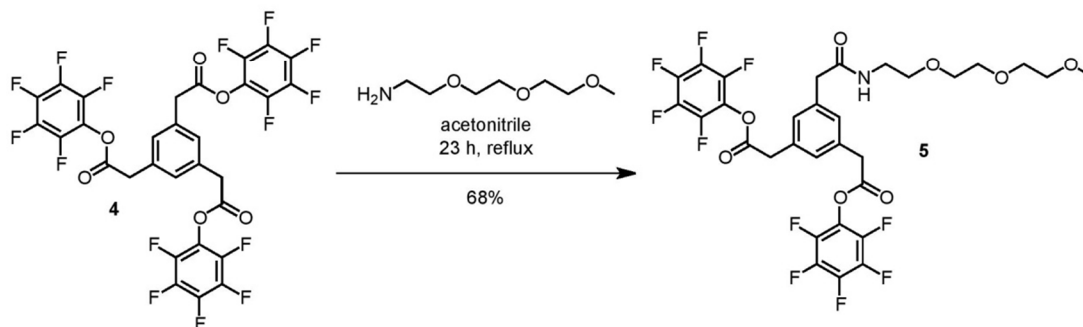
The following abbreviations are used: BCP, bis(cyclopeptide) Bta, 2,2',2''-(benzene-1,3,5-triyl)triacetic acid; DIEA, *N*-ethyl-diisopropylamine; Pfp, pentafluorophenol; TBTU, *O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate; Pro, L-proline; Apro, (4*S*)-4-amino-L-proline; Mapa, 4-[2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]-2-aminopyridine-6-carboxylic acid; Teg, triethylene glycol.

Materials. All solvents were dried according to standard procedures prior to use. DMF p.a. was purchased and used without further purification.

Tris(pentafluorophenyl) 2,2',2''-(benzene-1,3,5-triyl)triacetate (4).Scheme S1: Synthesis of **4**.

2,2',2''-(Benzene-1,3,5-triyl)triacetic acid (466 mg, 1.85 mmol) and pentafluorophenol (1.19 g, 6.47 mmol) were dissolved in dichloromethane (15 mL) and treated with a solution of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.17 g, 6.12 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (34 mg, 278 μ mol) in dichloromethane (15 mL). A dark precipitate immediately formed, which slowly disappeared upon stirring at room temperature. The mixture was stirred for 18 h. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography (SiO₂, ethylacetate/hexane, 1:3 (*v/v*)). The crude product was then precipitated from hexane to yield a colorless solid. Yield: 973 mg (70 %); m.p. 120 °C; ¹H NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 7.35 (s, 3H, BtaH), 4.01 (s, 6H, BtaCH₂) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 167.2 (CO), 141.0 (dm, ¹J(C,F) = 253 Hz, F₅PhC(3)), 139.6 (dm, ¹J(C,F) = 254 Hz, F₅PhC(2)), 137.8 (dm, ¹J(C,F) = 254 Hz, F₅PhC(4)), 133.7 (BtaC(1,3,5)), 129.9 (BtaC(2,4,6)), 125.1 (m, F₅PhC(1)), 40.0 (CH₂) ppm; ¹⁹F NMR (376 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = -151.6 (d, ³J = 18.2 Hz, 6F, PfpF(2,6)), -156.4 (t, ³J = 21.6 Hz, 3F, PfpF(4)), -161.1 (t, ³J = 19.9 Hz, 6F, PfpF(3,5)) ppm; MS (MALDI-TOF) *m/z* (%) 772.9 (100) [M+Na]⁺, 788.9 (6) [M+K]⁺; elemental analysis calcd (%) for C₃₀H₉F₁₅O₆: C 48.02, H 1.21 found C 48.08, H 1.30.

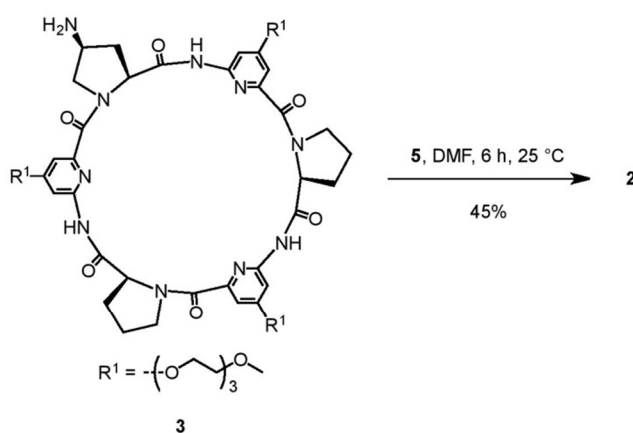
Bis(pentafluorophenyl) 2,2'-(5-(12-oxo-2,5,8-trioxa-11-azatridecan-13-yl)-1,3-phenylene)diacetate (5).



Scheme S2: Synthesis of **5**.

A solution of **4** (374 mg, 0.5 mmol) in acetonitrile (20 mL) was heated to reflux and a solution of 2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethanamine (82 mg, 0.5 mmol) in acetonitrile (30 mL) was added over a period of 3 h. After the addition was completed, the mixture was heated for further 20 h. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography (SiO₂, dichloromethane, then dichloromethane/methanol, 10:1 (v/v)) to afford a colorless oil. The product could not be obtained in analytically pure form. Yield: 249 mg (68 %); ¹H NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 7.27 (s, 3H, BtaH), 6.37 (br s, 1H, NH), 3.98 (s, 4H, BtaCH₂), 3.52-3.63 (m, 12H, 10 TegCH₂ + 2 BtaCH₂), 3.43-3.48 (m, 2H, TegCH₂), 3.37 (s, 3H, TegCH₃) ppm.

Bis(cyclopeptide) 2.



Scheme S3: Synthesis of **2**.

The Z-protected form of cyclopeptide **3** was deprotected as described previously.¹ The thus obtained deprotected cyclopeptide **3** (92 mg, 77 μmol) was dissolved in degassed DMF (3 mL). A solution of **5** (28 mg, 38 μmol) and DIEA (50 μL , 286 μmol) in degassed DMF (3 mL) was added and the mixture was stirred at 25 °C for 6 h. After evaporation of the solvent the residue was purified by preparative HPLC and dried by lyophilization to yield a colorless solid. Yield: 46 mg (45%); m.p. 87-92 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -225$ ($c = 1$, methanol); $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, 25 °C, MeOD- d_4 /D $_2$ O, 4:1 (v/v)): $\delta = 7.00$ -7.24 (m, 15H, MapaH(3)/MapaH(5)/BtaH), 5.81-5.85 (m, 2H, AproH(α)), 5.65-5.69 (m, 4H, Pro(α)), 4.45-4.51 (m, 2H, AproH(γ)), 4.04-4.12 (m, 14H, TegCH $_2$), 3.96-4.04 (m, 2H, AproH(δ)), 3.74-3.83 (m, 22H, 14 \times TegCH $_2$ /8 \times ProH(δ)), 3.57-3.67 (m, 44H, 42 \times TegCH $_2$ /2 \times AproH(δ)), 3.39-3.54 (m, 20H, 14 \times TegCH $_2$ /6 \times BtaCH $_2$), 3.27-3.32 (m, 21H, OCH $_3$), 2.73-2.82 (m, 2H, AproH(β)), 2.56-2.69 (m, 4H, ProH(β)), 2.11-2.21 (m, 2H, AproH(β)), 1.89-2.15 (m, 12H, 8 \times ProH(γ)/4 \times ProH(β)) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, 25 °C, MeOD- d_4 /D $_2$ O, 4:1 (v/v)): $\delta = 174.5 + 174.2 + 173.0 + 172.9 + 172.4$ (ProCO/AproCO/BtaCO), 168.6 + 168.5 + 168.3 + 168.2 + 168.0 (MapaC(4)/MapaCO), 154.3 + 154.1 + 153.2 (MapaC(6)), 152.0 + 151.8 + 151.7 (MapaC(2)), 137.4 + 137.1 (BtaC(1)/BtaC(3)/BtaC(5)), 129.8 + 129.5 (BtaC(2)/BtaC(4)/BtaC(6)), 109.1 + 108.9 + 108.8 (MapaC(5)), 103.4 + 103.0 + 102.8 (MapaC(3)), 72.6 + 72.5 + 71.5 + 71.1 + 71.0 + 70.9 + 70.8 + 70.2 + 69.9 + 69.8 + 69.0 (TegCH $_2$), 63.6 + 63.5 (ProC(α)), 62.3 (AproC(α)), 59.1 (O-CH $_3$), 53.7 (AproC(δ)), 50.1 + 50.0 (ProC(δ)), 47.8 (AproC(γ)), 43.3 + 43.2 + 40.4 (BtaCH $_2$), 37.9 (AproC(β)), 33.8 (ProC(β)), 23.6 + 23.5 (ProC(γ)) ppm; MALDI-MS m/z (%) 2667.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 2689.3 (95) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; elemental analysis calcd (%) for C $_{127}$ H $_{175}$ N $_{21}$ O $_{42}$ \cdot 5H $_2$ O: C 55.31, H 6.76, N 10.67 found C 55.19, H 6.62, N 10.68.

ITC titrations. Solvents and solvent mixtures used in the ITC titrations were not degassed. The salts used as substrates were weighed using an analytical precision balance, dissolved in known volumes of the respective solvent or solvent mixture, and loaded into the system for immediate analysis. Solutions involved in the same titration experiment were made up from the same batch of solvent mixture. For the concentrations of **1** and **2** and the different salts used in the measurements, see Table S1 and Table S2.

A standard ITC experiment involved the titration of a solution of the salt into a solution of the receptor at 25 °C by using 30 injections of 8 μL , separated by an interval of 180 s or 240 s, with the exception of the first injection, which was 2 μL . For the measurements in water/DMSO the following conditions were used: DMSO: first injection 2 μL followed by 29 times 8 μL or first injection 2 μL followed by 9 times 4 μL and then 24 times 8 μL ; 50 vol% water/DMSO: first injection 2 μL followed by 29 times 6 μL .

Binding constants and enthalpies of binding were obtained by curve fitting of the titration data using the one-site binding model except for iodide binding in DMSO and complexes with a $\log K_a < 3$. In these cases, n was fixed to 1. Data processing involved initial optimization of the raw thermogram with NITPIC² and subsequent non-linear regression of the binding isotherm with Sedphat.^{3,4} The peak produced by the first injection was discarded prior to data processing.

Table S1: Concentrations of bis(cyclopeptides) **1** and **2** and the salts used in the ITC titrations in water, phosphate buffer, and organic solvents.

solvent	BCP	guest salt	$c(\text{BCP}) / \text{mM}$	$c(\text{salt}) / \text{mM}$
water	1	NaI	0.5	10
	2	NaI	0.5	10
	2	NaBr	0.5	15
	2	NaCl	0.5	15
	1	Na ₂ SO ₄	0.5	10
	2	Na ₂ SO ₄	0.5	10
aqueous phosphate buffer (35 mM, pH 7.40)	2	Na ₂ SO ₄	0.5	10
methanol	1	NMe ₄ I	0.25	5
	1	NMe ₄ I	0.25	5
acetonitrile	1	NMe ₄ I	0.25	5
	1	NBu ₄ I	0.25	5
DMSO	1	NMe ₄ I	0.25 and 0.5	5 and 10

Table S2: Concentrations of bis(cyclopeptides) **1** and **2** and the salts used in the ITC titrations in the aqueous solvent mixtures.

co-solvent	vol% water	BCP	guest salt	$c(\text{BCP}) / \text{mM}$	$c(\text{salt}) / \text{mM}$	
methanol	5	1	NMe ₄ I	0.25	5	
	10	1	NMe ₄ I	0.25	5	
	10	1	NaI	0.25	5	
	20	1	NaI	0.25	2.5	
	30	1	NaI	0.25	5	
	30	1	Na ₂ SO ₄	0.25	2.5	
	50	1	NaI	0.25	2.5	
	50	1	Na ₂ SO ₄	0.25	2.5	
	70	1	NaI	0.25	5	
	70	1	Na ₂ SO ₄	0.25	2.5	
	70	2	Na ₂ SO ₄	0.25	2.5	
	90	1	NaI	0.25	5	
	95	1	NaI	0.25	5	
	95	2	NaI	0.5	10	
	95	1	Na ₂ SO ₄	0.25	2.5	
	95	2	Na ₂ SO ₄	0.5	10	
	acetonitrile	5	1	NMe ₄ I	0.125 and 0.5	5
		20	1	NMe ₄ I	0.25	5
20		1	NaI	0.25	5	
30		1	NaI	0.25	5	
30		1	Na ₂ SO ₄	0.25	5	
50		1	NaI	0.25	5	
50		1	Na ₂ SO ₄	0.25	5	
70		1	NaI	0.25	5	
70		1	Na ₂ SO ₄	0.25	5	
70		2	Na ₂ SO ₄	0.25	2.5	
80		1	NaI	0.25	5	
80		1	Na ₂ SO ₄	0.25	5	
95		1	NaI	0.25	5	
95		2	NaI	0.5	10	
95		1	Na ₂ SO ₄	0.25	5	
95		2	Na ₂ SO ₄	0.5	10	
DMSO		40	1	Na ₂ SO ₄	0.2 and 0.25	2 and 2.5
		50	1	Na ₂ SO ₄	0.2 and 0.25	5
	70	1	NaI	0.25	5	
	70	1	Na ₂ SO ₄	0.25	5	
	90	1	Na ₂ SO ₄	0.25 and 0.5	5 and 10	

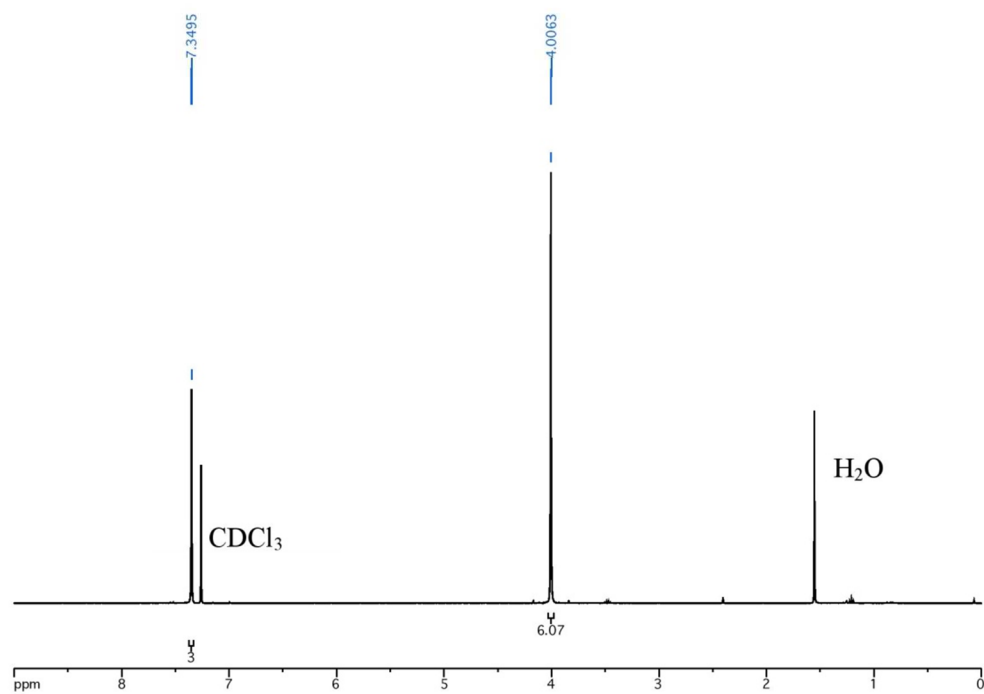
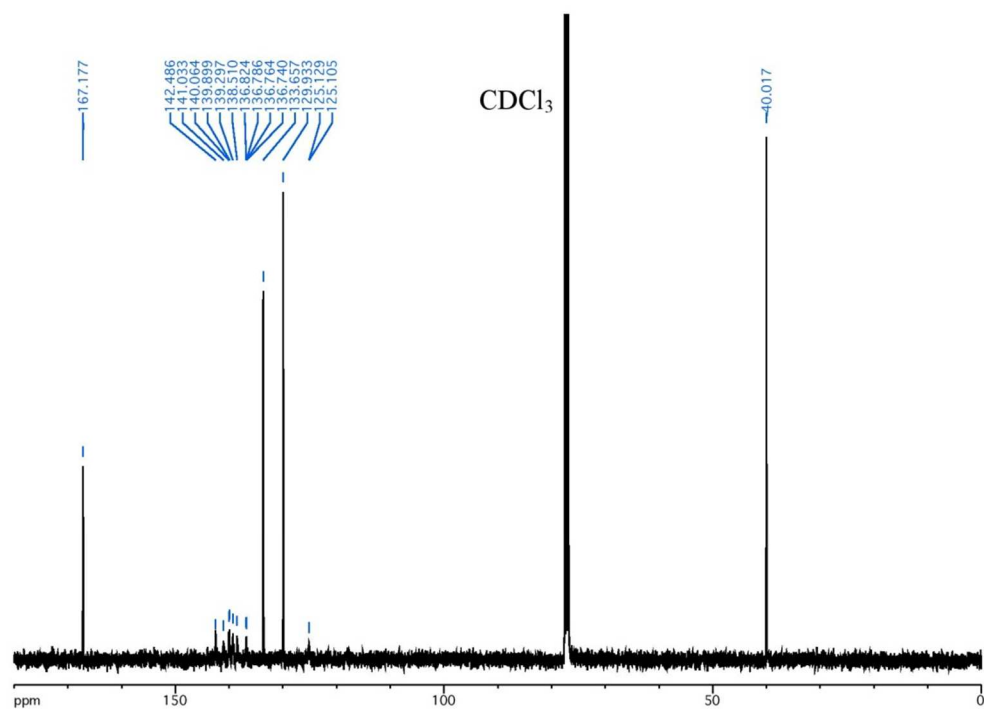
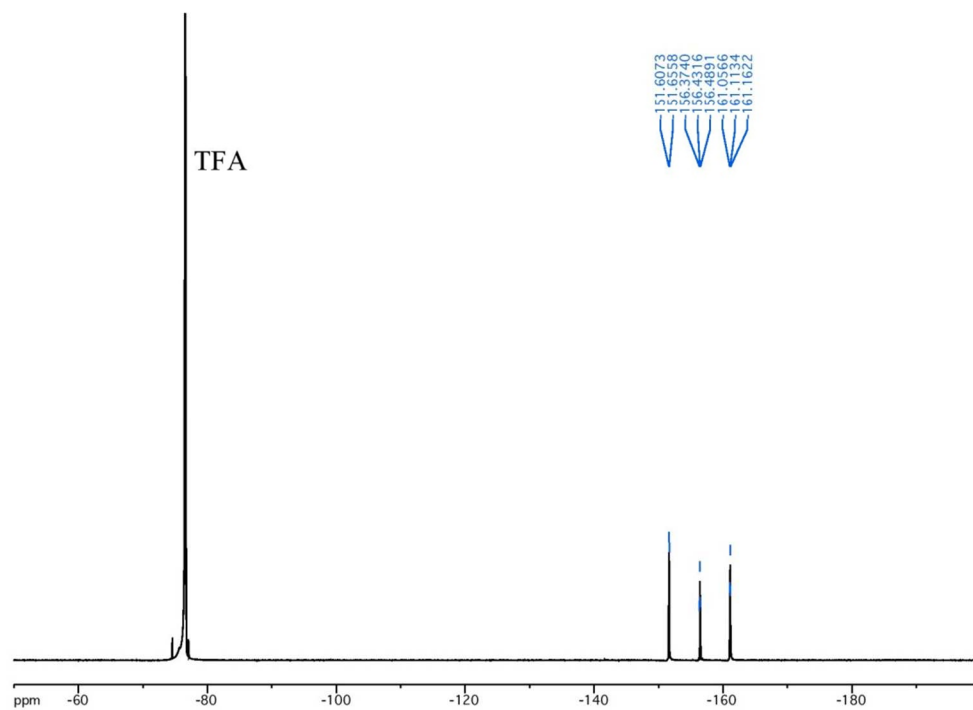
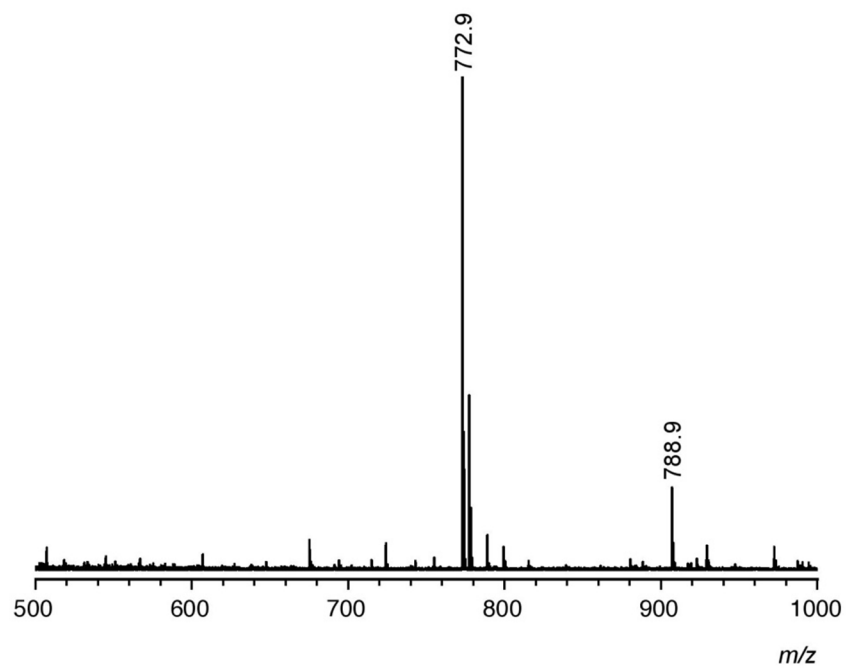
Figure S1: ^1H NMR spectrum of **4** (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C).Figure S2: ^{13}C NMR spectrum of **4** (101 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

Figure S3: ^{19}F NMR spectrum of **4** (376 MHz, CDCl_3 , 25 °C).Figure S4: MALDI-TOF MS spectrum of **4** (positive mode).

		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M+Na]^+$	$C_{30}H_9F_{15}O_6 + Na^+$	773.0	772.9
$[M+K]^+$	$C_{30}H_9F_{15}O_6 + K^+$	789.0	788.9

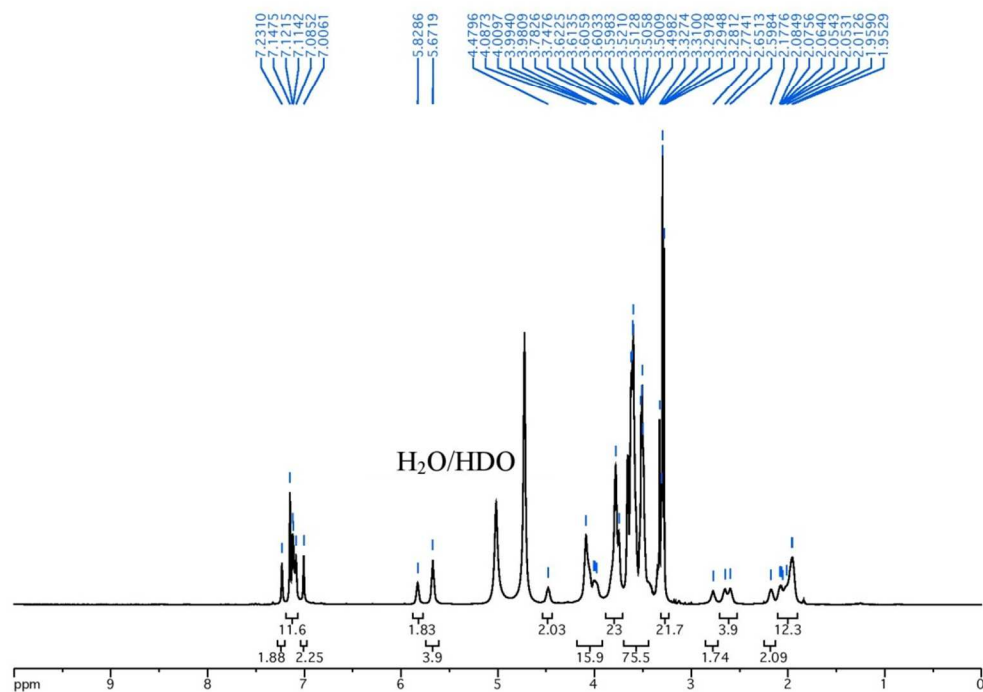
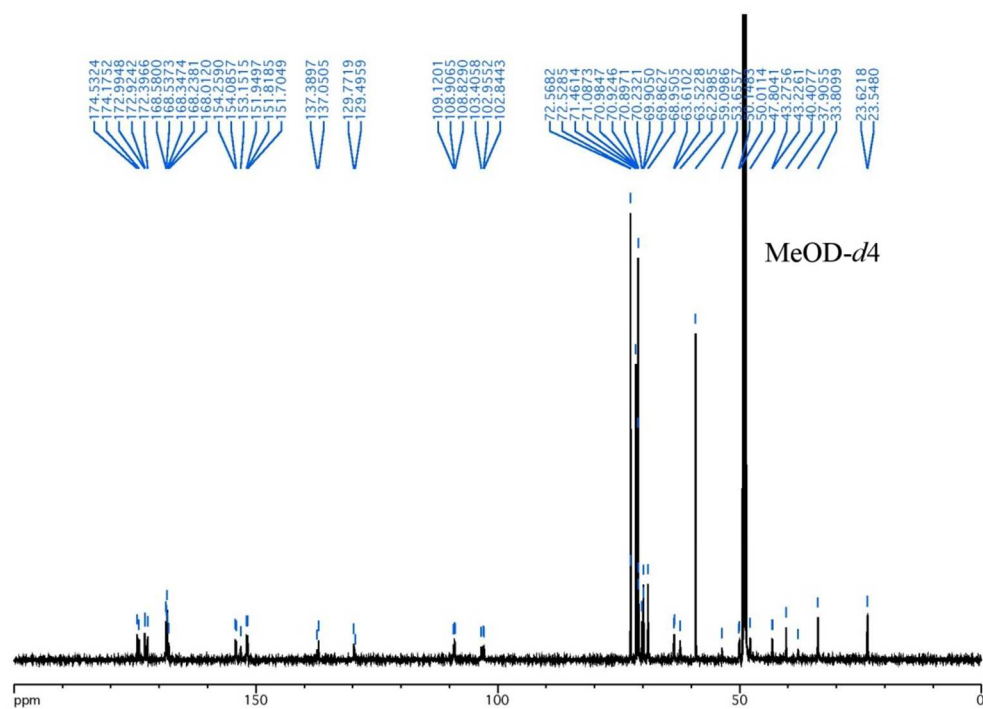
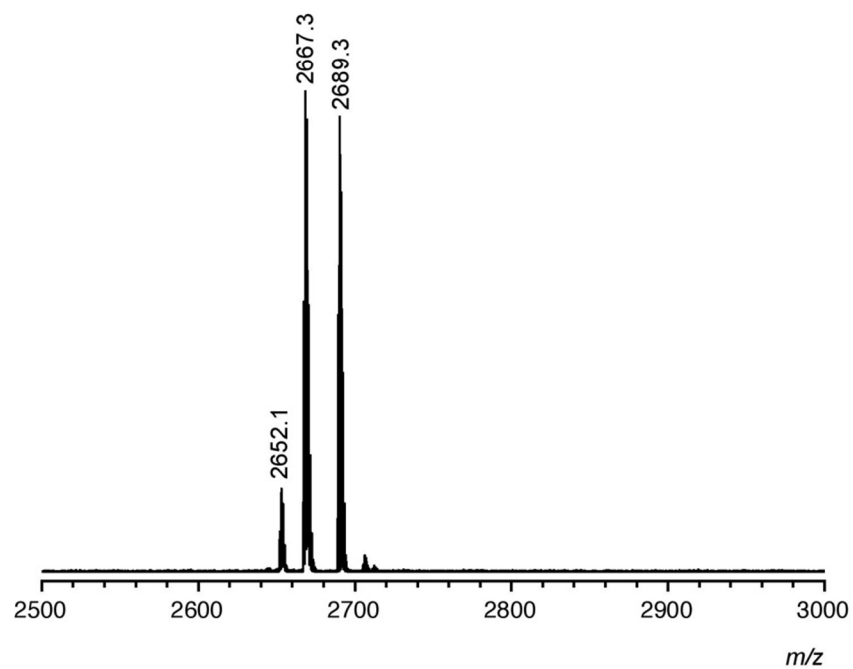
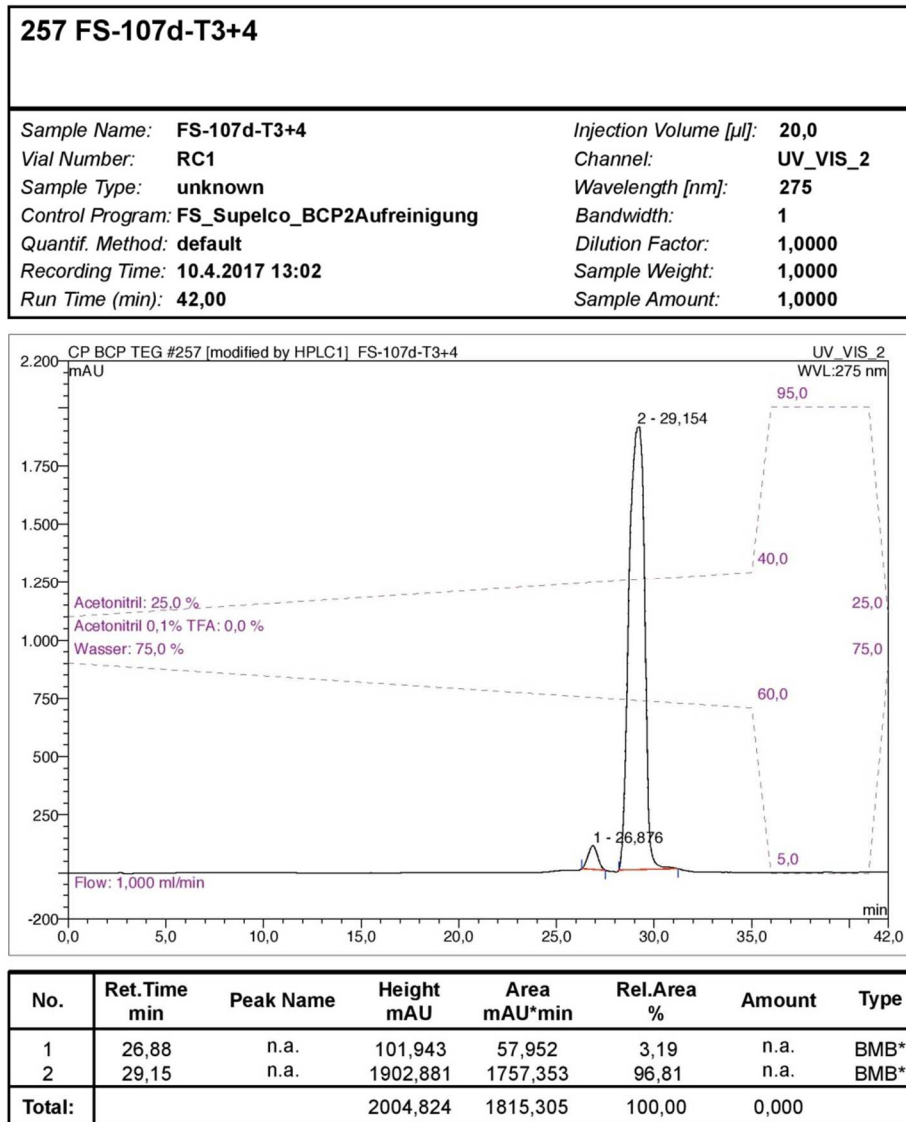
Figure S5: ^1H NMR spectrum of **2** (600 MHz, MeOD- d_4 /D $_2$ O, 4:1 (v/v), 25 °C).Figure S6: ^{13}C NMR spectrum of **2** (151 MHz, MeOD- d_4 /D $_2$ O, 4:1 (v/v), 25 °C).

Figure S7: MALDI-TOF MS spectrum of **2** (positive mode).

		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M-CH_3+H]^+$	$C_{126}H_{172}N_{21}O_{42} + H^+$	2652.2	2652.1
$[M+H]^+$	$C_{127}H_{175}N_{21}O_{42} + H^+$	2667.2	2667.3
$[M+Na]^+$	$C_{127}H_{175}N_{21}O_{42} + Na^+$	2689.1	2689.3

Figure S8: HPLC chromatogram of **2** (Dionex P680 HPLC Pump, ASI-100 Autosampler, TCC-100 Column Oven, UVD 170U UV/Vis Detector, Chromeleon V6.70 Software, Supelco Ascentis® C18 Column, 4.6 × 250 mm, 5 µm)



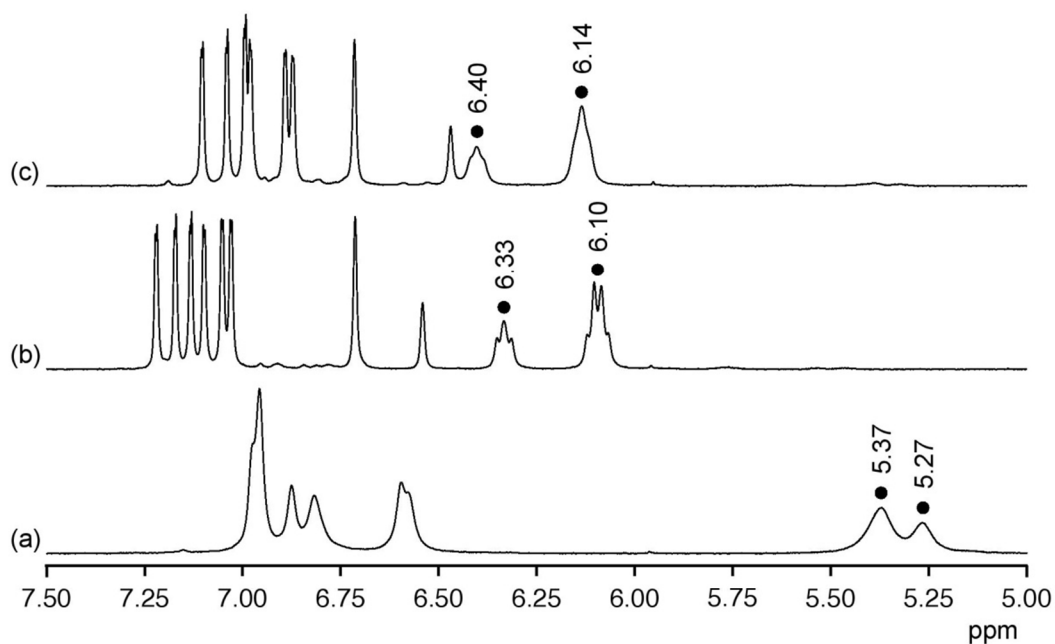
Results of the Qualitative Binding Studies: ^1H NMR spectroscopy:

Figure S9: ^1H NMR spectrum (400MHz, 25°C) of **2** in D_2O (5 mM) (a) and spectra of **2** in D_2O (5 mM) in the presence of 2 equiv of NaI (b) and 2 equiv of Na_2SO_4 (c). The signals of the $\text{H}(\alpha)$ protons of the proline rings are marked with black dots.

ESI mass spectrometry:

ESI MS spectra were recorded on a Bruker amaZon SL machine by using a flow rate of 100-175 $\mu\text{L}/\text{h}$. Spectra acquisition was performed with the program Trapcontrol and for data processing the program Data Analysis was used. The samples were prepared as follows: an aqueous solution of **2** (1 mM) and the respective sodium salt (ca. 10 equiv) was prepared. This solution was diluted with methanol to afford a 1 μM concentration of the bis(cyclopeptide) prior to the measurement.

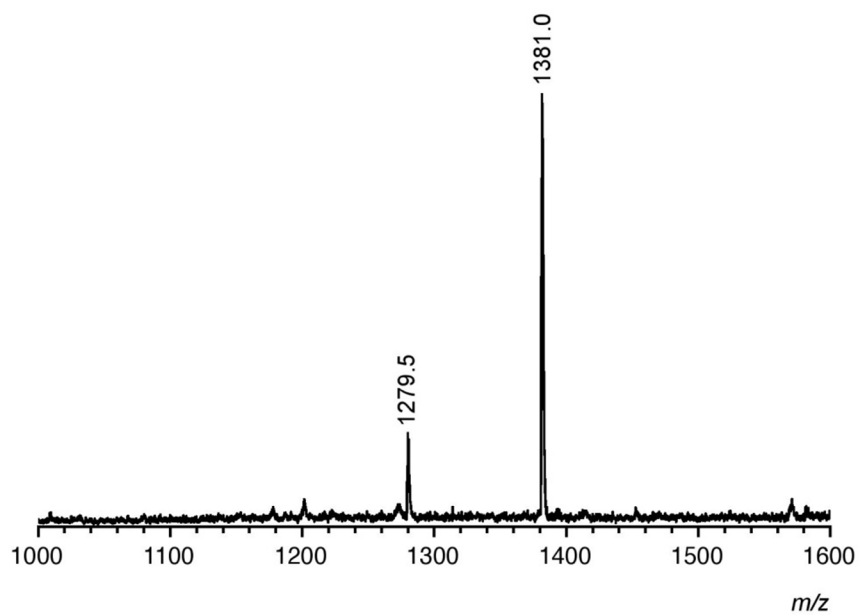


Figure S10: ESI mass spectrum (negative mode) of a solution of **2** in H₂O (1 mM) containing 10 equiv of Na₂SO₄ after dilution with methanol to reach a final solution of the bis(cyclopeptide) of 1 μM.

		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
fragment of the sulfate complex of 2 lacking the side chain in the linker	C ₁₁₈ H ₁₅₈ N ₂₀ O ₄₂ + SO ₄ ²⁻	1279.5	1279.5
[M+SO ₄] ²⁻	C ₁₂₇ H ₁₇₅ N ₂₁ O ₄₂ + SO ₄ ²⁻	1381.0	1381.0

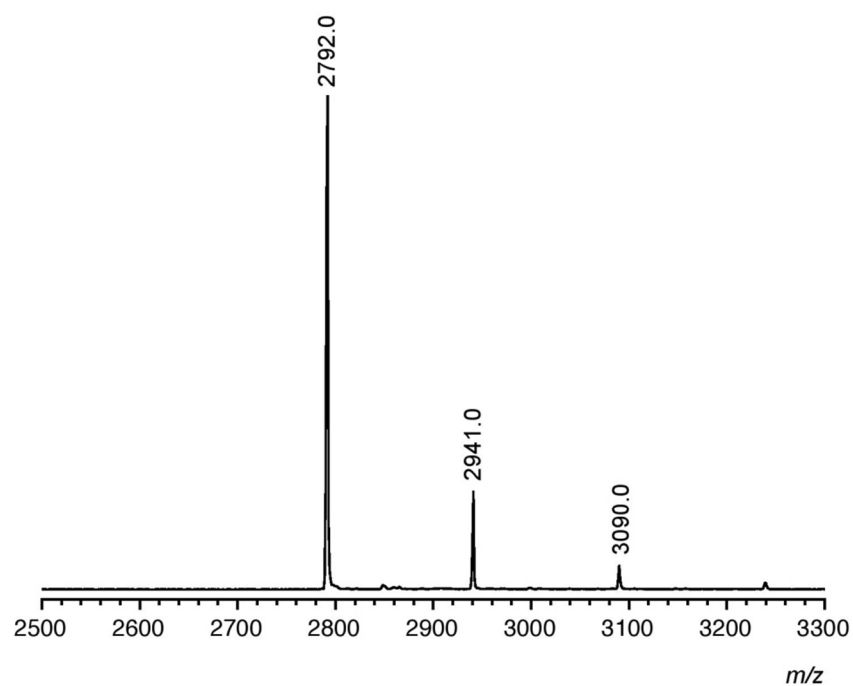


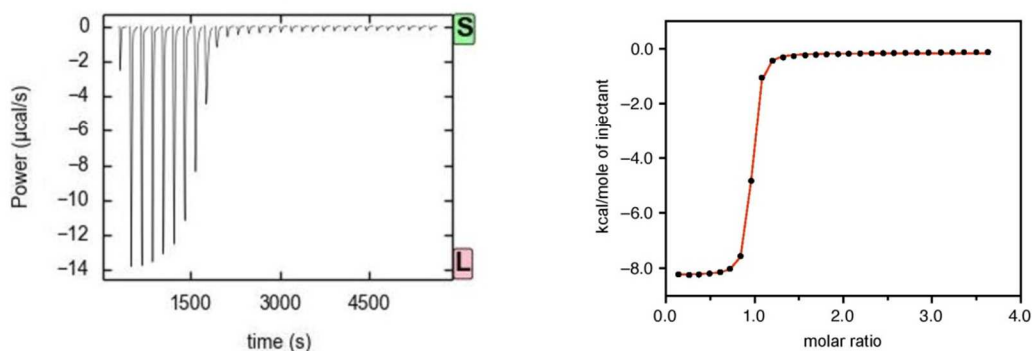
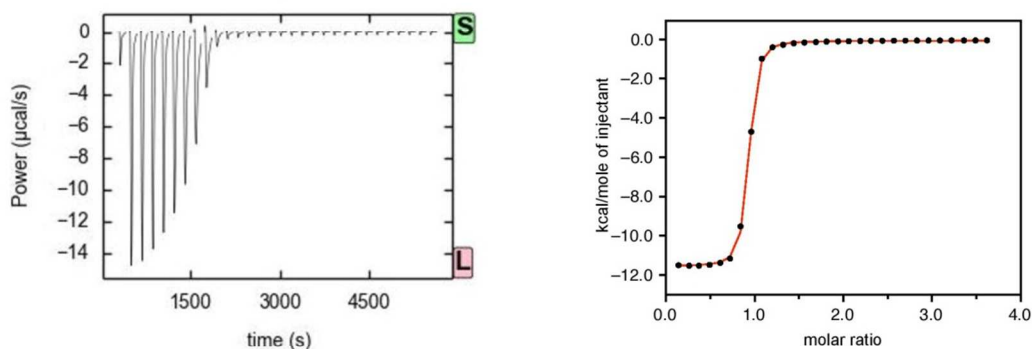
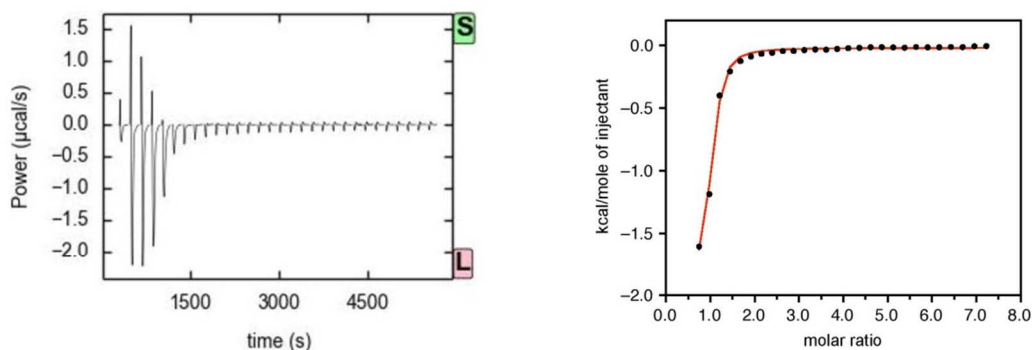
Figure S11: ESI mass spectrum (negative mode) of a solution of **2** in H₂O (1 mM) containing 10 equiv of NaI after dilution with methanol to reach a final solution of the bis(cyclopeptide) of 1 μM.

		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
[M+I] ⁻	C ₁₁₈ H ₁₅₈ N ₂₀ O ₄₂ + I ⁻	2793.1	2792.0
[M+NaI+I] ⁻	C ₁₁₈ H ₁₅₈ N ₂₀ O ₄₂ + NaI + I ⁻	2943.0	2941.0
[M+(NaI) ₂ +I] ⁻	C ₁₁₈ H ₁₅₈ N ₂₀ O ₄₂ + (NaI) ₂ + I ⁻	3092.9	3090.0

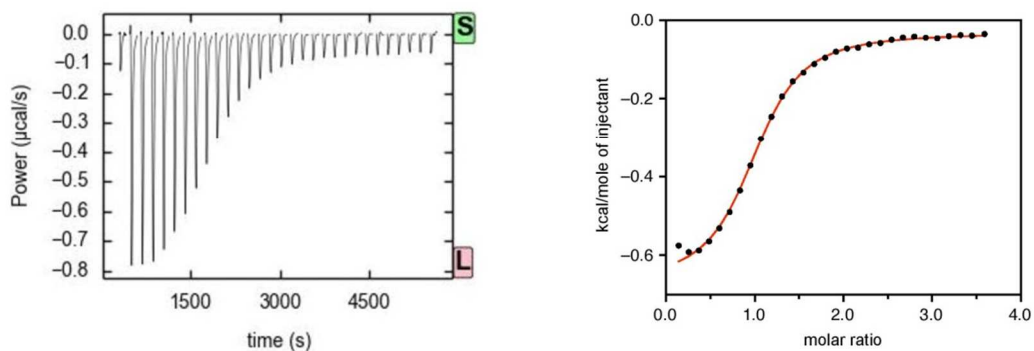
Selected ITC Titrations:

The following graphs show the results of selected ITC titrations. The diagrams on the left hand side are optimized raw thermograms resulting from NITPIC² while the ones on the right hand side are binding isotherms obtained with Sedphat.^{3,4}

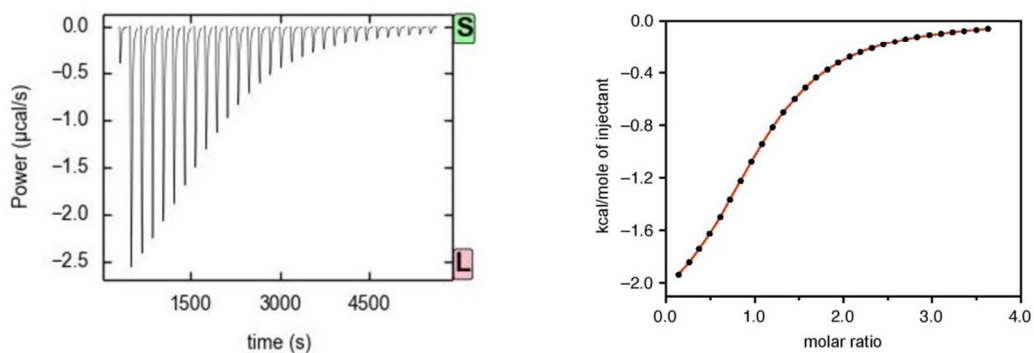
Figure S12: Thermograms and binding isotherms of selected ITC titrations.

Titration of **1** with tetramethylammonium iodide in methanol:Titration of **1** with tetramethylammonium iodide in acetonitrile:Titration of **1** with tetramethylammonium iodide in 5 vol% water/acetonitrile:

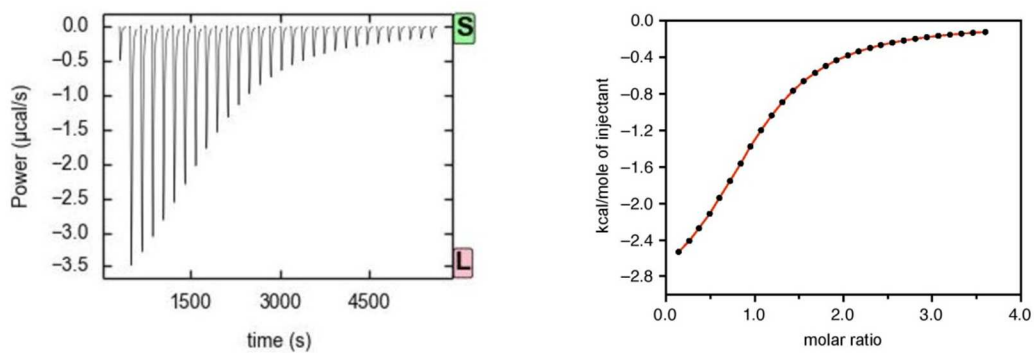
Titration of **1** with sodium iodide in 20 vol% water/acetonitrile:



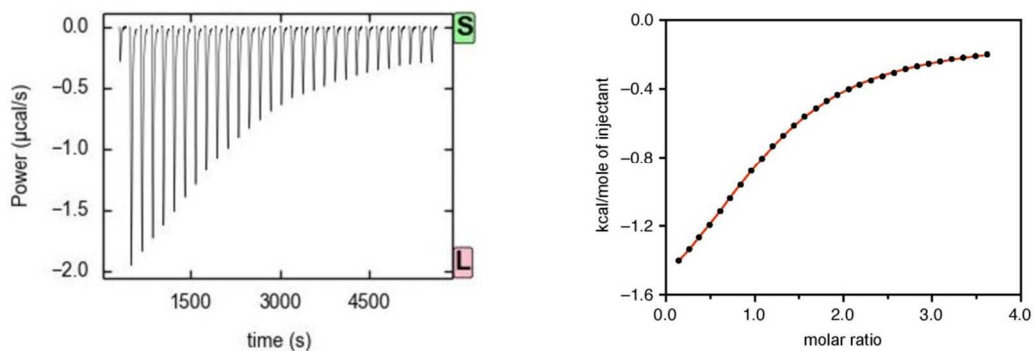
Titration of **1** with sodium iodide in 50 vol% water/acetonitrile:



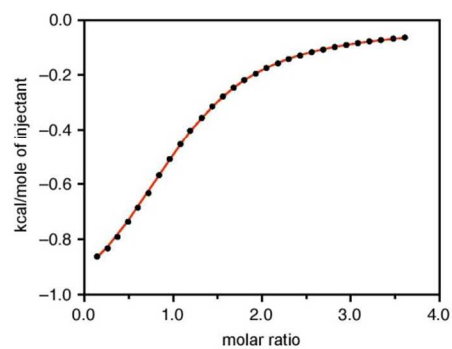
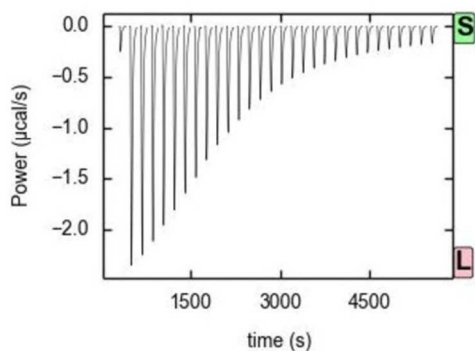
Titration of **1** with sodium iodide in 80 vol% water/acetonitrile:



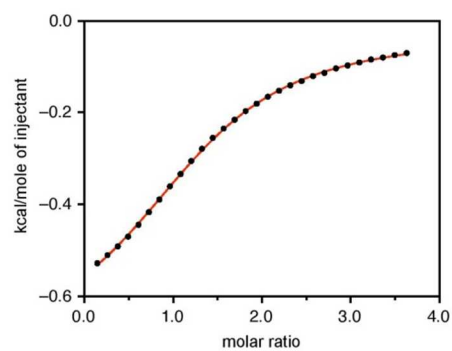
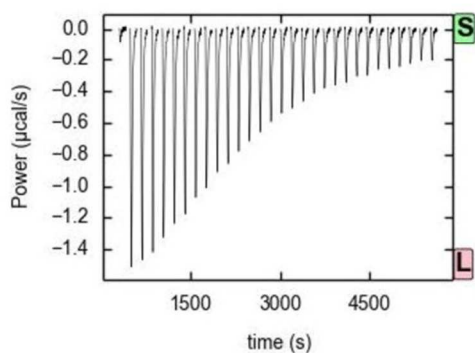
Titration of **1** with sodium iodide in 95 vol% water/acetonitrile:



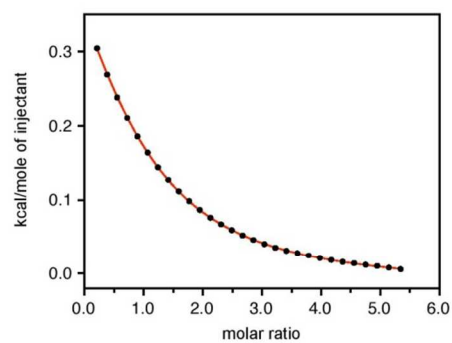
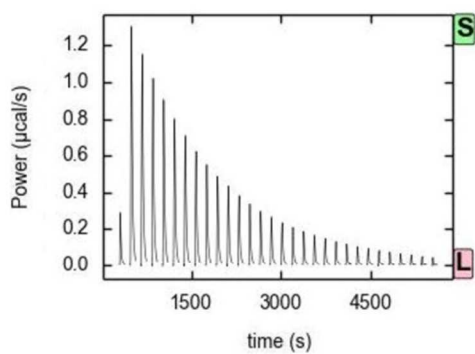
Titration of **1** with sodium iodide in water:



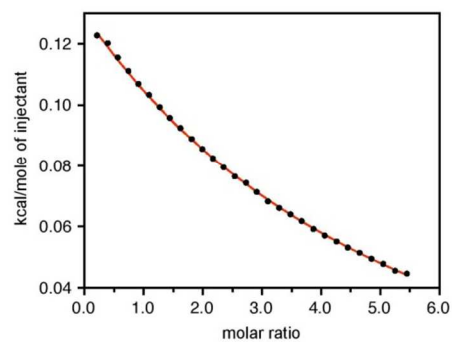
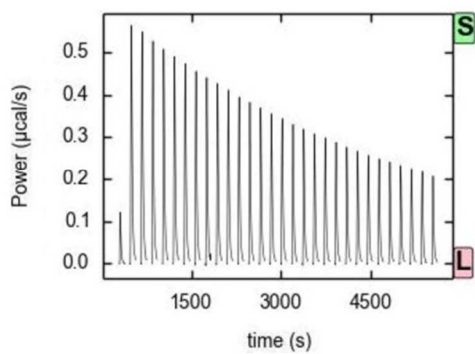
Titration of **2** with sodium iodide in water:



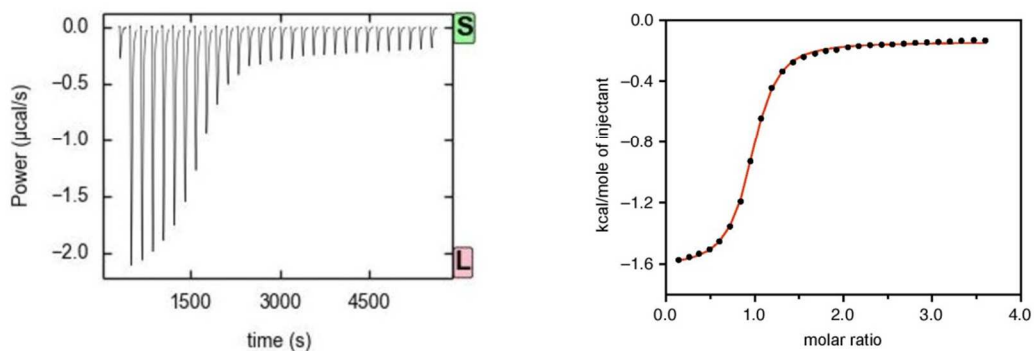
Titration of **2** with sodium bromide in water:



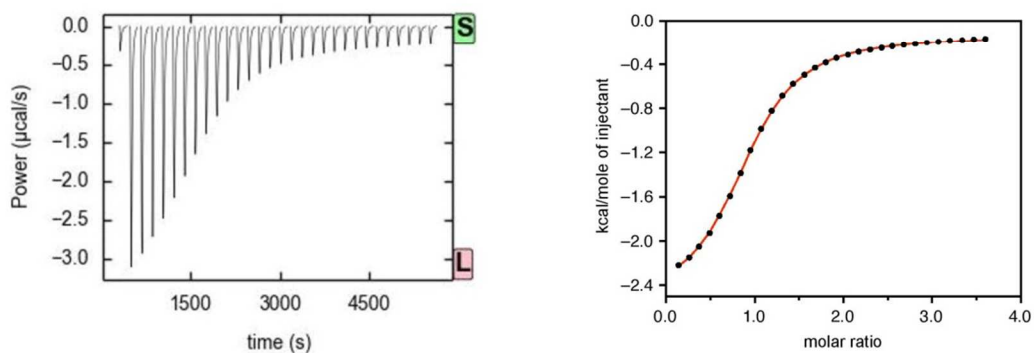
Titration of **2** with sodium chloride in water:



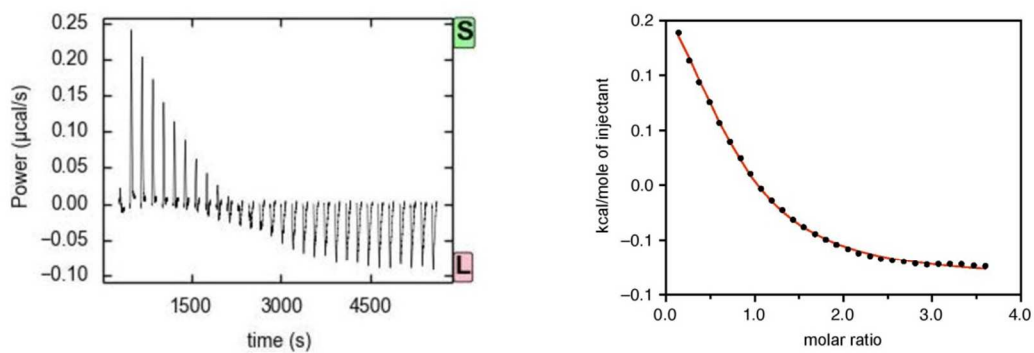
Titration of **1** with sodium sulfate in 50 vol% water/acetonitrile:



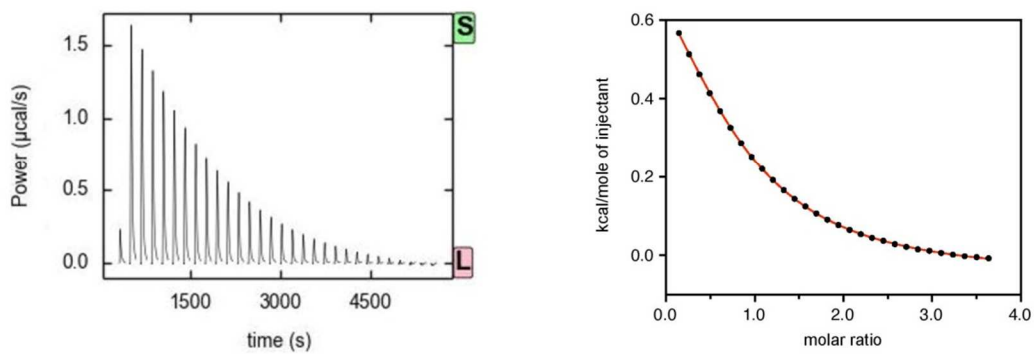
Titration of **1** with sodium sulfate in 80 vol% water/acetonitrile:



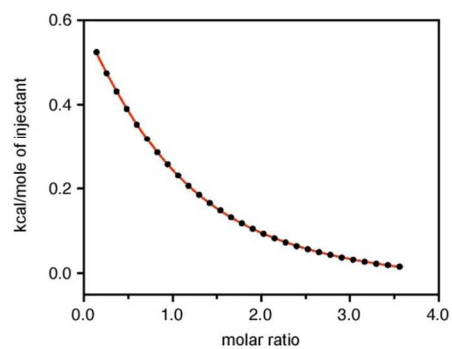
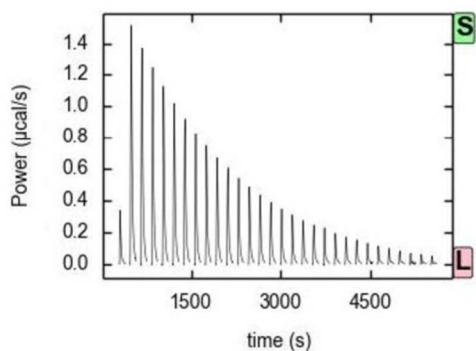
Titration of **1** with sodium sulfate in 95 vol% water/acetonitrile:



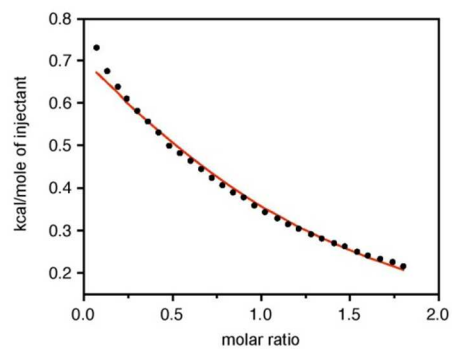
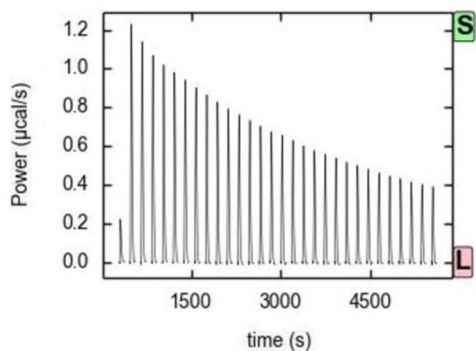
Titration of **1** with sodium sulfate in water:



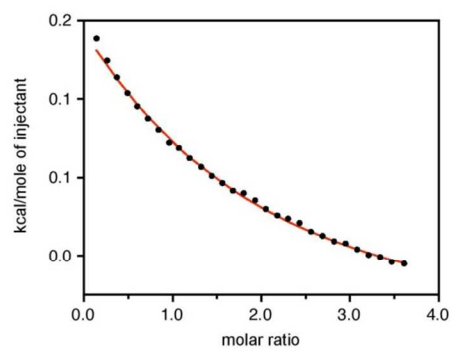
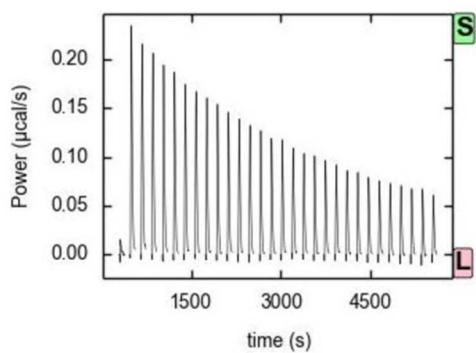
Titration of **2** with sodium sulfate in water:



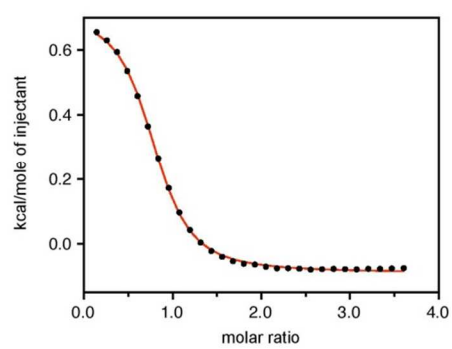
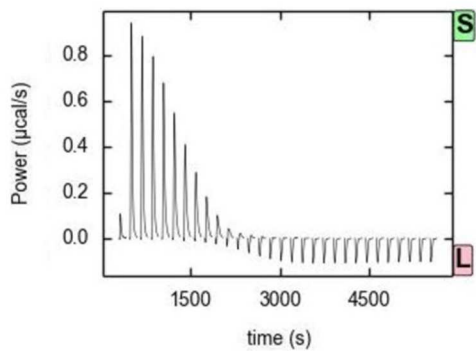
Titration of **1** with tetramethylammonium iodide in DMSO:



Titration of **1** with sodium iodide in 70 vol% water/DMSO:



Titration of **1** with sodium sulfate in 70 vol% water/DMSO:



Solvent Dependence of Iodide Affinity of 1:Table S3: Gibbs free energies ΔG , enthalpies ΔH , and entropies $T\Delta S$ of the binding of iodide to bis(cyclopeptide) **1** and **2** in different water/methanol mixtures including the corresponding association constants $\log K_a$ and stoichiometry factors n .^a

vol% water ^b	mol% water ^c	BCP ^d	ΔG	ΔH	$T\Delta S$	$\log K_a$	n
0 ^g	0	1	-35.1 ± 0.1	-35.5 ± 0.2	-0.5 ± 0.3	6.14 ± 0.01	0.84 ± 0.01
0 ^f	0	1	-36.4 ± 0.2	-34.2 ± 0.4	2.2 ± 0.5	6.38 ± 0.04	0.93 ± 0.01
5 ^f	10.6	1	-33.4 ± 0.3	-17.3 ± 0.2	16.1 ± 0.1	5.85 ± 0.05	0.89 ± 0.04
10 ^f	20.0	1	-31.6 ± 0.1	-13.0 ± 0.2	18.6 ± 0.2	5.53 ± 0.01	0.89 ± 0.02
10 ^e	20.0	1	-30.8 ± 0.5	-11.1 ± 0.3	19.7 ± 0.4	5.40 ± 0.08	1.05 ± 0.03
20 ^e	36.0	1	-28.3 ± 0.1	-9.8 ± 0.3	18.5 ± 0.3	4.96 ± 0.02	1.01 ± 0.04
30 ^e	49.1	1	-26.9 ± 0.1	-11.9 ± 0.2	15.0 ± 0.2	4.72 ± 0.01	0.99 ± 0.09
50 ^e	69.2	1	-26.2 ± 0.1	-16.2 ± 0.8	10.0 ± 0.7	4.59 ± 0.01	1.03 ± 0.04
70 ^e	84.0	1	-25.3 ± 0.1	-14.8 ± 0.2	10.5 ± 0.3	4.43 ± 0.02	1.03 ± 0.06
90 ^e	95.3	1	-23.4 ± 0.1	-8.0 ± 0.4	15.4 ± 0.5	4.10 ± 0.02	1.08 ± 0.06
95 ^e	97.7	1	-22.6 ± 0.2	-6.6 ± 0.3	16.0 ± 0.5	3.96 ± 0.03	1.18 ± 0.05
95 ^e	97.7	2	-21.3 ± 0.2	-4.6 ± 0.1	16.7 ± 0.3	3.73 ± 0.03	1.27 ± 0.02
100 ^e	100	1	-21.7 ± 0.2	-4.8 ± 0.1	16.9 ± 0.3	3.80 ± 0.03	1.11 ± 0.11
100 ^e	100	2	-20.6 ± 0.4	-3.2 ± 0.4	17.4 ± 0.8	3.62 ± 0.06	1.23 ± 0.15

^a Recorded at 298 K; ΔG , ΔH , and $T\Delta S$ in kJ mol^{-1} ; the values are means of at least three independent measurements with the standard deviations specified, ^b vol% of water in the water/methanol mixture, ^c mol% of water in the water/methanol mixture, ^e counterion: sodium, ^f counterion: tetramethylammonium, ^g counterion: tetrabutylammonium.

* Sample preparation involved mixing of precise volumes of the individual solvents so that excess volumes were not considered in the calculation of the water content.

Table S4: Gibbs free energies ΔG , enthalpies ΔH , and entropies $T\Delta S$ of the binding of iodide to bis(cyclopeptides) **1** and **2** in different water/acetonitrile mixtures including the corresponding association constants $\log K_a$ and stoichiometry factors n .^a

vol% water ^b	mol% water ^c	BCP ^d	ΔG	ΔH	$T\Delta S$	$\log K_a$	n
0 ^g	0	1	-35.7 ± 0.8	-49.3 ± 0.5	-13.6 ± 0.5	6.25 ± 0.14	0.81 ± 0.01
0 ^f	0	1	-35.6 ± 0.1	-48.0 ± 0.2	-12.4 ± 0.1	6.24 ± 0.02	0.87 ± 0.01
5 ^f	13.2	1	-31.7 ± 0.9	-7.1 ± 0.8	24.6 ± 0.5	5.55 ± 0.15	0.89 ± 0.06
20 ^f	42.0	1	-27.1 ± 0.2	-3.4 ± 0.3	23.7 ± 0.5	4.74 ± 0.03	0.94 ± 0.04
20 ^e	42.0	1	-26.9 ± 0.2	-2.6 ± 0.1	24.3 ± 0.3	4.72 ± 0.03	1.07 ± 0.05
30 ^e	55.4	1	-24.8 ± 0.1	-6.7 ± 0.1	18.1 ± 0.3	4.35 ± 0.02	0.97 ± 0.05
50 ^e	74.3	1	-24.0 ± 0.1	-10.3 ± 0.3	13.7 ± 0.3	4.20 ± 0.01	1.05 ± 0.01
70 ^e	87.1	1	-24.1 ± 0.1	-12.8 ± 0.1	11.3 ± 0.1	4.23 ± 0.01	1.01 ± 0.03
80 ^e	92.1	1	-24.1 ± 0.1	-13.4 ± 0.1	10.7 ± 0.2	4.22 ± 0.01	1.02 ± 0.02
95 ^e	98.2	1	-22.5 ± 0.1	-7.8 ± 0.2	14.7 ± 0.3	3.94 ± 0.01	1.15 ± 0.10
95 ^e	98.2	2	-21.5 ± 0.3	-6.1 ± 0.2	15.4 ± 0.4	3.77 ± 0.04	1.17 ± 0.03

^a Recorded at 298 K; ΔG , ΔH , and $T\Delta S$ in kJ mol^{-1} ; the values are means of at least three independent measurements with the standard deviations specified, ^b vol% of water in the water/acetonitrile mixture, ^c mol% of water in the water/acetonitrile mixture, ^d bis(cyclopeptide), ^e counterion: sodium, ^f counterion: tetramethylammonium, ^g counterion: tetrabutylammonium.

Table S5: Gibbs free energies ΔG , enthalpies ΔH , and entropies $T\Delta S$ of the binding of iodide to bis(cyclopeptide) **1** in different water/DMSO mixtures including the corresponding association constants $\log K_a$ and stoichiometry factors n .^a

vol% water ^b	mol% water ^c	BCP ^d	ΔG	ΔH	$T\Delta S$	$\log K_a$	n
0 ^f	0	1	-18.3 ± 0.3	7.1 ± 0.7	25.4 ± 0.5	3.21 ± 0.05	fixed to
70 ^e	90.2	1	-18.3 ± 0.6	2.2 ± 0.5	20.5 ± 0.1	3.20 ± 0.10	1.00

^a Recorded at 298 K; ΔG , ΔH , and $T\Delta S$ in kJ mol^{-1} ; the values are means of at least three independent measurements with the standard deviations specified, ^b vol% of water in the water/DMSO mixture, ^c mol% of water in the water/DMSO mixture, ^d bis(cyclopeptide), ^e counterion: sodium, ^f counterion: tetramethylammonium.

Solvent Dependence of Sulfate Affinity of 1:Table S6: Gibbs free energies ΔG , enthalpies ΔH , and entropies $T\Delta S$ of the binding of sulfate to bis(cyclopeptides) **1** and **2** in different water/methanol mixtures including the corresponding association constants $\log K_a$ and stoichiometry factors n .^a

vol% water ^b	mol% water ^c	BCP ^d	ΔG	ΔH	$T\Delta S$	$\log K_a$	n
30 ^e	49.1	1	-38.6 ± 0.3	-11.7 ± 0.6	26.9 ± 0.7	6.76 ± 0.05	0.93 ± 0.13
50 ^e	69.2	1	-33.5 ± 0.2	-14.7 ± 0.8	18.8 ± 0.8	5.87 ± 0.02	0.93 ± 0.03
70 ^e	84.0	1	-28.8 ± 0.1	-8.5 ± 0.3	20.3 ± 0.4	5.04 ± 0.02	0.93 ± 0.04
70 ^{e,f}	84.0	2	-27.6 ± 0.1	-8.8 ± 0.1	18.8 ± 0.1	4.82 ± 0.01	0.82 ± 0.02
95 ^e	97.7	1	-21.1 ± 0.3	4.1 ± 0.8	25.2 ± 0.5	3.69 ± 0.05	0.80 ± 0.05
95 ^e	97.7	2	-20.7 ± 0.2	5.1 ± 0.1	25.7 ± 0.2	3.62 ± 0.05	0.75 ± 0.03
100 ^e	100	1	-19.9 ± 0.1	4.9 ± 0.2	24.8 ± 0.2	3.49 ± 0.01	0.81 ± 0.07
100 ^e	100	2	-18.9 ± 0.2	5.9 ± 0.3	24.8 ± 0.2	3.31 ± 0.03	0.73 ± 0.01

^a Recorded at 298 K; ΔG , ΔH , and $T\Delta S$ in kJ mol^{-1} ; the values are means of at least three independent measurements with the standard deviations specified, ^b vol% of water in the water/methanol mixture, ^c mol% of water in the water/methanol mixture, ^d bis(cyclopeptide), ^e counterion: sodium, ^f only measured twice.

Table S7: Gibbs free energies ΔG , enthalpies ΔH , and entropies $T\Delta S$ of the binding of sulfate to bis(cyclopeptides) **1** and **2** in different water/acetonitrile mixtures including the corresponding association constants $\log K_a$ and stoichiometry factors n .^a

vol% water ^b	mol% water ^c	BCP ^d	ΔG	ΔH	$T\Delta S$	$\log K_a$	n
30 ^e	55.4	1	-35.7 ± 0.3	4.5 ± 0.5	40.2 ± 0.8	6.25 ± 0.05	0.90 ± 0.14
50 ^e	74.3	1	-29.9 ± 0.1	-6.4 ± 0.2	23.5 ± 0.3	5.24 ± 0.02	0.92 ± 0.03
70 ^e	87.1	1	-27.3 ± 0.1	-11.4 ± 0.2	15.9 ± 0.2	4.78 ± 0.02	0.90 ± 0.03
70 ^{e,f}	87.1	2	-26.6 ± 0.1	-13.0 ± 0.1	13.6 ± 0.1	4.66 ± 0.01	0.86 ± 0.01
80 ^e	92.1	1	-25.6 ± 0.1	-10.4 ± 0.4	15.2 ± 0.5	4.48 ± 0.02	0.91 ± 0.03
95 ^e	98.2	1	-22.6 ± 0.2	1.5 ± 0.1	24.1 ± 0.1	3.97 ± 0.02	0.69 ± 0.03
95 ^e	98.2	2	-22.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2	24.5 ± 0.1	3.98 ± 0.04	0.66 ± 0.01

^a Recorded at 298 K; ΔG , ΔH , and $T\Delta S$ in kJ mol^{-1} ; the values are means of at least three independent measurements with the standard deviations specified, ^b vol% of water in the water/acetonitrile mixture, ^c mol% of water in the water/acetonitrile mixture, ^d bis(cyclopeptide), ^e counterion: sodium ^f only measured twice.

Table S8: Gibbs free energies ΔG , enthalpies ΔH , and entropies $T\Delta S$ of the binding of sulfate to bis(cyclopeptide) **1** in different water/DMSO mixtures including the corresponding association constants $\log K_a$ and stoichiometry factors n .^a

vol% water ^b	mol% water ^c	BCP ^d	ΔG	ΔH	$T\Delta S$	$\log K_a$	n
40 ^e	72.4	1	-38.3 ± 0.6	-6.3 ± 0.4	32.0 ± 0.6	6.72 ± 0.10	0.88 ± 0.04
50 ^e	79.8	1	-33.6 ± 0.6	-2.8 ± 0.1	30.8 ± 0.5	5.89 ± 0.10	0.87 ± 0.04
70 ^e	90.2	1	-27.7 ± 0.2	3.2 ± 0.2	30.9 ± 0.1	4.85 ± 0.03	0.77 ± 0.06
90 ^e	97.3	1	-22.0 ± 0.1	6.1 ± 0.2	28.1 ± 0.3	3.86 ± 0.01	0.80 ± 0.01

^a Recorded at 298 K; ΔG , ΔH , and $T\Delta S$ in kJ mol^{-1} ; the values are means of at least three independent measurements with the standard deviations specified, ^b vol% of water in the water/DMSO mixture, ^c mol% of water in the water/DMSO mixture, ^d bis(cyclopeptide), ^e counterion: sodium.

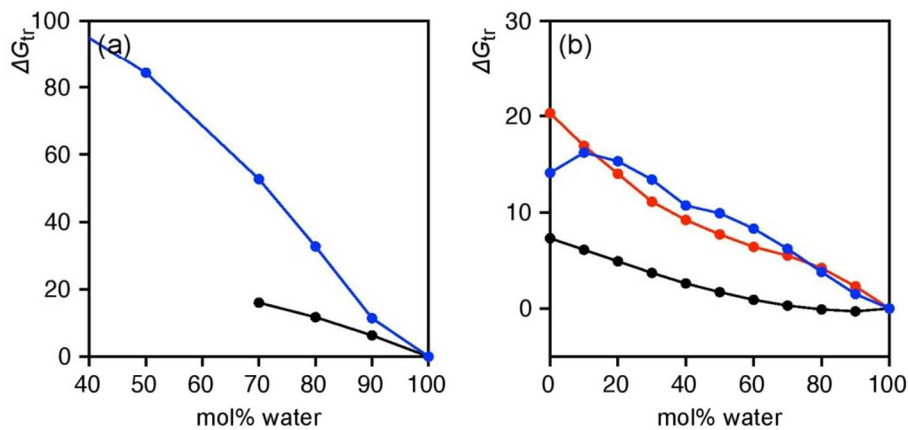
Solvent Dependence of Solvent Properties:

Figure S13: Dependence of the Gibbs free energies ΔG_{tr} of transferring sulfate (a) iodide (b) ions from water to water/methanol (black), water/acetonitrile (red), and water/DMSO (blue) on the solvent composition.^{5,6}

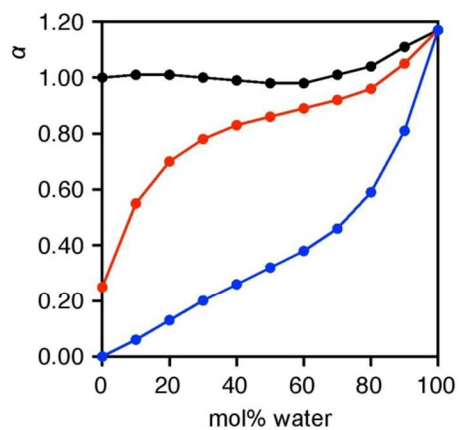


Figure S14: Dependence of the hydrogen bond donation ability α on the solvent composition (water/methanol, black; water/acetonitrile, red; and water/DMSO, blue).⁷

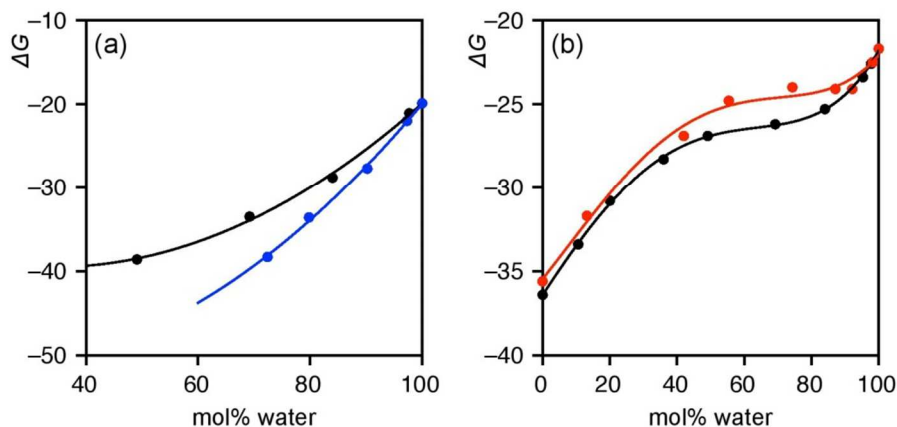


Figure S15: Dependence of the stabilities in ΔG of the sulfate (a) and iodide (b) complexes of bis(cyclopeptides) **1** on the solvent composition SC (water/methanol, black; water/acetonitrile, red; water/DMSO, blue). The circles denote the experimental results and the lines the regression curves describing the experimental results fitted to appropriate polynomials. The corresponding equations are summarized below.

Table S9: Coefficients of the regression equations resulting after fitting the dependence of the stabilities in ΔG of the sulfate and iodide complexes of bis(cyclopeptides) **1** on the solvent composition to polynomials (SC = solvent composition in mol%).

solvent	anion	$\Delta G_{\text{calcd}} = c_4 SC^4 + c_3 SC^3 + c_2 SC^2 + c_1 SC + \text{const}$				
		c_4	c_3	c_2	c_1	const
water/methanol	sulfate	0	0	-3.430E+1	-3.063E-1	4.500E-3
water/DMSO	sulfate	0	0	-4.863E+1	-2.261E-1	5.128E-3
water/methanol	iodide	4.548E-7	-5.462E-5	-6.560E-4	3.028E-1	-3.640E+1
water/acetonitrile	iodide	-3.546E+1	2.495E-1	1.613E-3	-7.646E-5	4.875E-7

Based on the above regression equations (Table S9), the ΔG_{calcd} values in the different solvent mixtures were calculated at the mol% solvent compositions for which the Gibbs free energies of transferring iodide or sulfate anions into the respective solvent mixture ΔG_{tr} and the hydrogen donor ability α of the mixture are available. These values were then used for the fitting analysis, which was performed by using StatPlus:mac 6.0.3 (AnalystSoft Inc.). Table S10 and Table S11 summarize the starting values. The results are collected in Table 4 of the main text.

Table S10: Extrapolated Gibbs free energies of iodide binding ΔG by bis(cyclopeptide) **1** in water/methanol and water/acetonitrile along with the respective ΔG_{tr} and α values at the respective solvent compositions.

mol% water	water/methanol			water/acetonitrile		
	$\Delta G_{\text{calcd}}^a$	ΔG_{tr}^a	α	$\Delta G_{\text{calcd}}^a$	ΔG_{tr}^a	α
0.0	-36.40	7.30	1.00	-35.46	20.30	0.25
10.0	-33.49	6.10	1.01	-32.87	16.90	0.55
20.0	-30.97	4.90	1.01	-30.36	14.00	0.70
30.0	-29.01	3.70	1.00	-28.19	11.10	0.78
40.0	-27.67	2.60	0.99	-26.54	9.20	0.83
50.0	-26.89	1.70	0.98	-25.46	7.70	0.86
60.0	-26.50	0.90	0.98	-24.88	6.40	0.89
70.0	-26.23	0.30	1.01	-24.61	5.50	0.92
80.0	-25.71	-0.10	1.04	-24.36	4.20	0.96
90.0	-24.44	-0.30	1.11	-23.70	2.30	1.05
100.0	-21.82	0.00	1.17	-22.09	0.00	1.17

^a in kJ mol⁻¹.

Table S11: Extrapolated Gibbs free energies of sulfate binding ΔG by bis(cyclopeptide) **1** in water/methanol and water/DMSO along with the respective ΔG_{tr} and α values at the respective solvent compositions.

mol% water	water/methanol			water/DMSO		
	$\Delta G_{\text{calcd}}^a$	ΔG_{tr}^a	α	$\Delta G_{\text{calcd}}^a$	ΔG_{tr}^a	α
70.0	-33.69	16.00	1.01	-39.34	52.70	0.46
80.0	-30.00	11.70	1.04	-33.90	32.70	0.59
90.0	-25.41	6.30	1.11	-27.45	11.40	0.81
100.0	-19.93	0.00	1.17	-19.97	0.00	1.17

^a in kJ mol⁻¹.

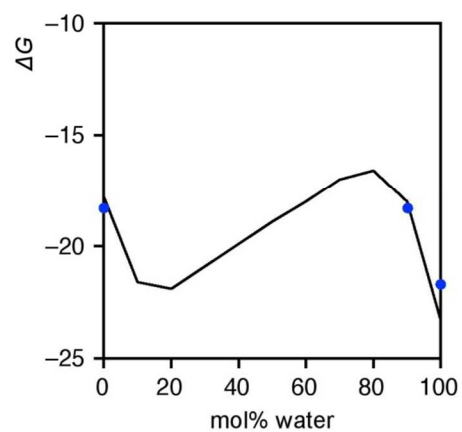


Figure S16: Solvent dependence of the Gibbs free energy of binding of iodide to bis(cyclopeptide) **1** in water/DMSO predicted by using $\Delta G_{\text{calcd}} = -1.26 \Delta G_{\text{tr}} - 19.92 \alpha$ for solvent compositions for which ΔG_{tr} and α are available (black line). The blue circles represent the experimental results.

Correlation of the Enthalpy of Iodide Binding to 1 With Preferential Solvation:

To assess whether the enthalpy of iodide binding in water/methanol or water/acetonitrile could be correlated with preferential solvation parameters, the binding enthalpies in Table S3 and Table S4 were first fitted to a 4th and 5th degree polynomial, respectively.

Table S12: Coefficients of the regression equations resulting after fitting the dependence of the enthalpies of iodide binding of bis(cyclopeptides) **1** on the solvent composition to a 4th and 5th degree polynomial (SC = solvent composition in mol%).

co-solvent	$\Delta H_{\text{calcd}} = c_5 SC^5 + c_4 SC^4 + c_3 SC^3 + c_2 SC^2 + c_1 SC + \text{const}$					
	c_5	c_4	c_3	c_2	c_1	const
methanol	0	-1.283E-6	4.872E-4	-5.333E-2	2.036E+0	-3.400E+1
acetonitrile	1.448E-7	-4.036E-5	4.344E-3	-2.255E-1	5.419E+0	-4.804E+1

As preferential solvation parameters, $\delta x_{X,S}$, describing the preferential solvation of iodide anions by water over solvation by methanol or acetonitrile in the respective solvent mixtures was used⁸ and Reichardt's $E_T(30)$ ⁹ value as a measure for preferential receptor solvation. In addition, also a related parameter $E_T(\text{dye})$ recently introduced for 4-[4-(dimethylamino)styryl]-1-methylpyridinium iodide as dye was tested.¹⁰ It should be noted that the authors of the latter paper showed that solvatochromism of the dye is not influenced by the presence of iodide anions as counterions.

Based on the above regression equations (Table S12), the ΔH values in the different solvent mixtures were calculated at the mol% solvent compositions for which $\delta x_{X,S}$, $E_T(30)$, and $E_T(\text{dye})$ are available. These values were then used for the fitting analysis, which was performed by using StatPlus:mac 6.0.3 (AnalystSoft Inc.). Table S13 summarizes the starting values and Table S14 the coefficients d and e obtained after fitting this data to $\Delta H = d \delta x_{X,S} + e E_T(30)$ or $\Delta H = d \delta x_{X,S} + e E_T(\text{dye})$. The values in the pure solvent mixtures were not considered in the analysis. The goodness of the correlations is depicted graphically in Figure S17.

Table S13: Extrapolated enthalpies of iodide binding ΔH by bis(cyclopeptide) **1** in water/methanol and water/acetonitrile along with the respective $\delta x_{X,S}$, $E_T(30)$, and $E_T(\text{dye})$ at the respective solvent compositions.

mol%		water/methanol				water/acetonitrile		
water	ΔH^a	$\delta x_{X,S}$	$E_T(30)$	$E_T(\text{dye})$	ΔH^a	$\delta x_{X,S}$	$E_T(30)$	$E_T(\text{dye})$
0.0	-34.00	0.000	55.70	60.1	-48.04	0.00	46.00	60.8
10.0	-18.49	-0.019	55.80	60.1	-12.44	-0.09	50.80	61.0
20.0	-10.91	-0.032	56.10	60.2	-1.10	-0.21	53.60	61.1
30.0	-8.79	-0.041	56.50	60.3	-0.30	-0.27	54.90	61.1
40.0	-9.97	-0.043	56.80	60.3	-2.54	-0.25	55.40	61.1
50.0	-12.62	-0.036	57.30	60.5	-4.81	-0.20	55.60	61.2
60.0	-15.18	-0.023	57.80	60.7	-6.81	-0.15	55.80	61.3
70.0	-16.44	-0.008	58.50	61.0	-9.26	-0.12	56.50	61.3
80.0	-15.47	0.002	59.50	61.5	-12.12	-0.09	57.60	61.5
90.0	-11.66	0.005	61.00	62.5	-12.90	-0.05	59.80	61.9
100.0	-4.70	0.000	63.10	63.8	-4.86	0.00	63.10	63.9

^a in kJ mol^{-1} .

Table S14: Coefficients d and e of the equation $\Delta H = d \delta x_{X,S} + e E_T(30)$ or $\Delta H = d \delta x_{X,S} + e E_T(\text{dye})$, which describes the dependence of the enthalpy of iodide binding to **1** in water/methanol and water/acetonitrile with preferential solvation parameters $\delta x_{X,S}$, $E_T(30)$, and $E_T(\text{dye})$.

solvents	E_T	d	e	R^2
water/methanol	$E_T(30)$	-75.24	-0.26	0.9587
water/methanol	$E_T(\text{dye})$	-87.50	-0.25	0.9614
water/acetonitrile	$E_T(30)$	-59.96	-0.29	0.9727
water/acetonitrile	$E_T(\text{dye})$	-63.30	-0.28	0.9810

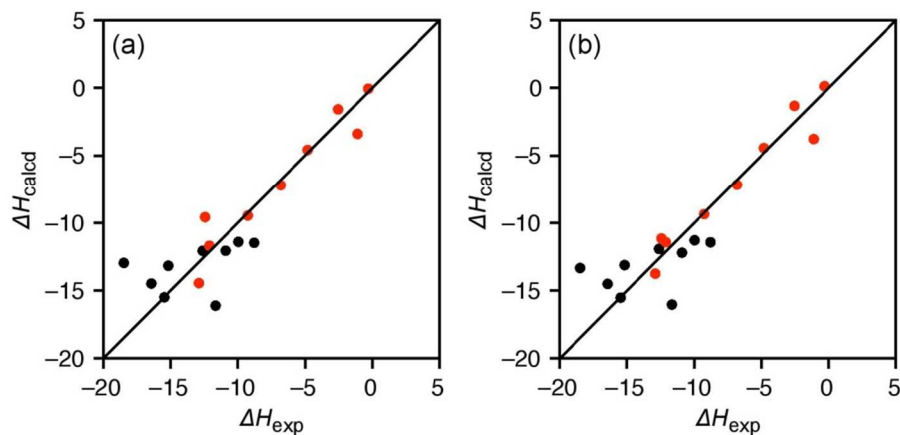


Figure S17: Correlation of the experimental ΔH values with the ones calculated on the basis of the regression analyses by using $E_T(30)$ (a) or $E_T(\text{dye})$ (b) for the preferential solvation of the receptor; iodide binding in water/methanol (black), iodide binding in water/acetonitrile (red).

Table S14 shows that the correlation is not yet satisfactory but that the dependence of the experimental enthalpy of iodide to **1** in water/methanol and in water/acetonitrile can be reasonably well described by using the preferential solvation parameters for the anion in the respective solvents, $\delta x_{X,S}$, and the ones assumed for the receptor, $E_T(30)$, and $E_T(\text{dye})$. The individual coefficients d and e for the two solvent systems are in acceptable agreement, considering the assumptions made. They show that the anion has the more pronounced effect on the solvent-dependence of binding enthalpy, which is expected. Figure S17 illustrates that the correlation is better in water/acetonitrile. The largest deviations are observed in mixtures in which one component of the solvent strongly dominates, indicating that other solvent properties contribute to binding in these mixtures more strongly than in the medium region of solvent composition.

References

1. Sommer, F.; Kubik, S. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8851-8860.
2. Keller, S.; Vargas, C.; Zhao, H.; Piszczek, G.; Brautigam, C. A.; Schuck, P. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5066-5073.
3. Houtman, J. C. D.; Brown, P. H.; Bowden, B.; Yamaguchi, H.; Appella, E.; Samelson, L. E.; Schuck, P. *Protein Sci.* **2007**, *16*, 30-42.
4. <http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedphat/download.htm>.
5. Marcus, Y. *Z. Naturforsch., A* **1995**, *50*, 51-58.
6. Marcus, Y. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3880-3897.
7. Marcus, Y. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1994**, 1751-1758.
8. Marcus, Y. *J. Chem. Thermodynamics* **2007**, *39*, 1338-1345.
9. Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319-2358.
10. Bevilaqua, T.; Gonçalves, T. S.; Venturini, C. D. G.; Machado, V. G. *Spectrochim. Acta, Part A* **2006**, *65*, 535-542.

Lebenslauf

Fabian Sommer

Bildungsweg

- 05.2013-03.2017** **Promotion**
Technische Universität Kaiserslautern, Betreuer: Prof. Dr. S. Kubik
Thema: „Cyclopeptid-basierte Rezeptoren zur Erkennung und Detektion von Anionen in Wasser“
- 07.2012-04.2013** **Diplomarbeit**
Technische Universität Kaiserslautern, Betreuer: Prof. Dr. S. Kubik
Thema: „Strategien zur Synthese wasserlöslicher, anionenbindender Bis(cyclopeptide) und Cyclopseudopeptide“
- 10.2005-04.2013** **Studium Diplom-Chemie**
Technische Universität Kaiserslautern
- 08.1996-03.2005** **Gymnasium Kusel**
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studienbegleitende Praktika

- 10.2011-11.2011** **Forschungspraktikum**
Technische Universität Kaiserslautern, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. med. D. Schrenk
Thema: „Versuche zur geeigneten Darstellung von Z, Z-Muconaldehyd“
- 02.2011-04.2011** **Forschungspraktikum**
Technische Universität Kaiserslautern, Arbeitskreis Prof. Dr. S. Kubik
Thema: „Untersuchungen von Ligandenaustauschreaktionen mit Thymin- & Pyrenfunktionalisierten Alkylthiolen an Octadecan-thiol-geschützten Goldnanopartikeln“
- 12.2009-02.2010** **Forschungspraktikum**
Technische Universität Kaiserslautern, Arbeitskreis Prof. Dr.-Ing. J. Hartung
Thema: „Polare Substituenteneffekte in intermolekularen Alkoxyradikalreaktionen“