

Cyclopeptide als Bindungsmotive für Anionen in molekularen Käfigen sowie Goldnanopartikelbasierten Sonden

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

D 386



Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 08.10.2020

Vorgelegt von

Dipl.-Chem. Julia Bartl

Geboren in Homburg/Saar

Betreuer:

Prof. Dr. Stefan Kubik

Kaiserslautern, 2020

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2015 bis April 2020 im Fachbereich Organische Chemie im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Stefan Kubik an der Technischen Universität Kaiserslautern angefertigt.

Dekanin: Prof. Dr. Elke Richling

Betreuer: Prof. Dr. Stefan Kubik

Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Markus Gerhards

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Kubik

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

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Dipl.-Chem. Julia Bartl, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Cyclopeptide als Bindungsmotive für Anionen in molekularen Käfigen sowie Goldnanopartikel-basierten Sonden“ gemäß der Promotionsordnung des Fachbereichs Chemie selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie Literaturzitate kenntlich gemacht habe.

Darüber hinaus erkläre ich, dass diese Dissertation, auch nicht in Teilen, als Prüfungsarbeit bereits in einem anderen Fachbereich eingereicht wurde oder Bestandteil eines vorausgegangenen Promotionsverfahrens war.

Kaiserslautern, den

.....

(Julia Bartl)

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

❖ *Anion binding of a cyclopeptide-derived molecular cage in aqueous solvent mixtures.*

J. Bartl, S. Kubik, ChemPlusChem **2020**, 85, 963-969.

❖ *Selective sensing of sulfate anions in water with cyclopeptide-decorated gold nanoparticles.* J. Bartl, L. Reinke, M. Koch, S. Kubik, Chem. Commun. **2020**, 56, 10457-10460.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

An erster Stelle Herrn Prof. Dr. Stefan Kubik, nicht nur für die Möglichkeit, die Promotion in seinem Arbeitskreis durchführen zu können, sondern vor allem für die fortwährende Unterstützung während dieser Zeit. Durch seine engagierte und motivierende Betreuung hat er maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Außerdem danke ich ihm für die Ermöglichung der Teilnahme an zahlreichen nationalen sowie internationalen Tagungen.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Jens Hartung für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Markus Gerhards für die Übernahme des Kommissionsvorsitzes.

Der Carl-Zeiss-Stiftung für die finanzielle Förderung meiner Promotion im Rahmen eines Stipendiums von Juli 2017 bis Februar 2020.

Dem Kooperationspartner Dr. Marcus Koch vom Leibniz-Institut für neue Materialien in Saarbrücken für die Durchführung von TEM-Messungen im Rahmen des Goldnanopartikelprojekts.

Den ehemaligen sowie aktuellen Mitarbeitern des Arbeitskreises Kubik, Beatrice Andrae, Daniel Bauer, Alexander Ganß, Patrick Gaß, Michaela Klische, Ligia Mesquita, Disha Mungalpara, Lena Reinke, Stephanie Scheib, Christian Schneider, Fabian Sommer, Marcel Wasik, Benedict Wyrwol und Serap Yapar für die angenehme Arbeitsatmosphäre und unterhaltsamen Gruppenausflüge.

Den benachbarten Arbeitskreisen von Prof. Dr.-Ing. Hartung und Prof. Dr. Manolikakes für die harmonische Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung.

Meinen Forschungspraktikanten beziehungsweise Bachelorstudentinnen Andrea Mele, Yanik Becker, Heinrich Schneider, Daniel Haufe, Manuela Zouatom, Benedict Wyrwol, Marcel Wasik und Sabrina Knospe für Ihren Einsatz im Labor.

Frau Christiane Müller und Herrn Dr. Harald Kelm für die Messung von zahlreichen NMR-Spektren sowie der Analytikabteilung für die durchgeführten Elementaranalysen.

Dem AK Niedner-Schatteburg, vor allem Maximilian Huber, Matthias Klein, Mike Lembach und Sophie Thommes, für die Unterstützung bei den ESI-MS-Messungen.

Frau Susanne Zeigner und Frau Heike Schramm für die Unterstützung in administrativen Belangen.

Herrn Ludvik Napast, Herrn Jürgen Rahm und Herrn Frank Schröder für Ihre stetige Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen.

Lena, Stephe, Fabian, Christian, Ela und Irina, die die Promotion zu etwas Besonderem gemacht haben.

Meiner Familie und meinem Freund Dominic, die mich immer unterstützt und motiviert haben. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Für Dominic

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Molekulare Erkennung	1
1.2	Relevanz von Anionen als Substrate für supramolekulare Wirte.....	3
1.3	Konzepte der Anionenerkennung in Wasser.....	5
2	Projekt A.....	14
2.1	Stand der Forschung	14
2.1.1	Bis(cyclopeptide) als Anionenrezeptoren in wässrigen Lösungsmittelgemischen	14
2.2	Aufgabenstellung	22
2.3	Ergebnisse und Diskussion	24
2.3.1	Darstellung dreifach verbrückter Bis(cyclopeptide)	24
2.3.2	Darstellung eines einfach verbrückten Bis(cyclopeptids)	59
2.3.3	Untersuchungen zu BCP E und BCP F	66
2.4	Zusammenfassung und Ausblick	96
3	Projekt B.....	99
3.1	Stand der Forschung	99
3.1.1	Goldnanopartikel.....	99
3.1.2	Synthese und Funktionalisierung von Goldnanopartikeln	101
3.1.3	Goldnanopartikel als Sonden	104
3.1.4	Goldnanopartikel-basierte Sonden zur Detektion von Anionen.....	109
3.2	Aufgabenstellung	112
3.3	Ergebnisse und Diskussion	114
3.3.1	Darstellung gemischt-funktionalisierter Goldnanopartikel mittels Ligandenaustauschreaktion	114
3.3.2	Darstellung gemischt-funktionalisierter Goldnanopartikel durch Kombination von Ligandenaustausch- und Kupplungsreaktion	130
3.3.3	Untersuchungen der Goldnanopartikel	145
3.4	Zusammenfassung und Ausblick	155
4	Experimentalteil.....	157
4.1	Vorbemerkungen zu verwendeten Chemikalien sowie apparativen und analytischen Methoden.....	157
4.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	162
4.2.1	Abspaltung der Boc-Schutzgruppe	162
4.2.2	Abspalten von Estern durch Verseifung	162
4.2.3	Abspalten der Benzyl-Schutzgruppe	162
4.2.4	Abspalten der Cbz-Schutzgruppe	163

4.2.5	Abspalten der Allyl-Schutzgruppe	163
4.2.6	Allgemeine Vorgehensweise zur Cyclisierung	163
4.3	Synthese des Kupplungsreagenzes PyCloP	164
4.3.1	Tripyrrolidinophosphinoxid	164
4.3.2	PyCloP	164
4.4	Synthesen zu Projekt A	165
4.4.1	Darstellung der Grundbausteine	165
4.4.2	Darstellung der linearen Peptide	171
4.4.3	Synthese der Cyclopeptide	178
4.4.4	Synthese der Linker	181
4.4.5	Synthese der dreifach verbrückten Bis(cyclopeptide)	188
4.4.6	Synthese des einfach verbrückten Bis(cyclopeptids) BCP F	191
4.5	Synthesen zu Projekt B	193
4.5.1	Synthese L _{TEG}	193
4.5.2	Synthese der funktionellen Liganden	196
4.5.3	Synthese von Aminen für Kupplungen auf Goldnanopartikeln	204
4.5.4	Synthesen der Goldnanopartikel AuNP	207
4.6	Analytische Messungen	214
4.6.1	ITC-Titrations Projekt A	214
4.6.2	NMR-Titration Projekt A	216
4.6.3	EXSY-NMR Projekt A	219
4.6.4	Visuelle qualitative Bindungsstudien Projekt B	221
4.6.5	Konkurrenzexperiment Projekt B	222
4.6.6	UV/VIS Messungen Projekt B	223
4.6.7	TEM-Messungen Projekt B	225
5	Literatur	226
6	Anhang	235
6.1	Massenspektren Projekt A	235
6.2	HPLC Chromatogramme Projekt A	238
6.3	DFT-Rechnungen Projekt A	239
6.4	Veröffentlichte Publikation zu Projekt A	254
6.5	Veröffentlichte Publikation zu Projekt B	288
6.6	Lebenslauf	323

Abkürzungen

All	Allyl
APA	6-Aminopicolinsäure
Apro	4-(2S,4S)-Aminoprolin
aq	wässrig
Äqu.	Äquivalente
ATR	Attenuated Total Reflection
Azpro	4-(2S,4S)-Azidoprolin
AuNP	Goldnanopartikel
BCP	Bis(cyclopeptid)
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CP	Cyclopeptid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Elektronenionisation

ESI	Elektrosprayionisation
EXSY	Exchange Spectroscopy
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
Hyp	4-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-Hydroxyprolin
IR	Infrarot
K_a	Bindungskonstante
M	Molar
MALDI-MS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
N	Normal
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<i>p.a.</i>	zur Analyse
PFP	Pentafluorphenol
Ph	Phenyl
ppm	Parts per Million
Pro	L-Prolin

PyCloP	Chlorotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RP	Reversed Phase
SBP	Sulfat-bindendes Protein
Smp.	Schmelzpunkt
SPR	Surface Plasmon Resonance
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TEG	Triethylenglykolmonomethylether
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time of Flight
TsOH	Toluolsulfonsäure
UV/VIS	Ultravioletter und sichtbarer Bereich der elektromagnetischen Strahlung
(v/v)	Volume to Volume

1 Einleitung

1.1 Molekulare Erkennung

„Um ein Bild zu gebrauchen, will ich sagen, dass Enzym und Glucosid wie Schloss und Schlüssel zu einander passen müssen, um eine chemische Wirkung aufeinander ausüben zu können.“^[1]

Diesen Satz schrieb Emil Fischer in einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1894, in der er seine Ergebnisse zur Untersuchung der Wirkung von Enzymen darlegte. Bis heute prägt dieses sogenannte Schlüssel-Schloss-Prinzip unser Verständnis, wie biologische beziehungsweise biochemische Prozesse ablaufen. Wie ein Schlüssel nur genau in ein bestimmtes Schloss passt und dieses öffnen kann, bindet ein Enzym nur jenes Substrat, das aufgrund seiner Struktur optimal in das aktive Zentrum passt (Abbildung 1).

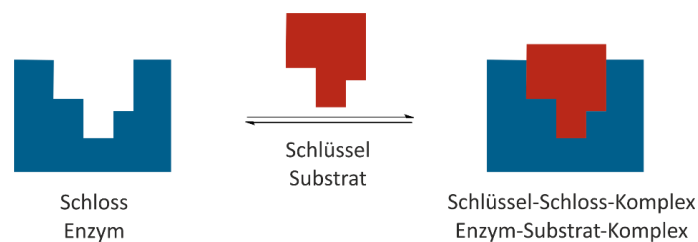


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Schlüssel-Schloss-Prinzips nach Emil Fischer

Die Formulierung des Schlüssel-Schloss-Prinzips war wegweisend und legte den Grundstein eines Konzepts, das man heute als molekulare Erkennung bezeichnet. Dass dieses Prinzip nicht auf Enzyme beschränkt ist, sondern auch für andere molekulare Erkennungsvorgänge gilt, zeigten etwa zehn Jahre nach Fischer der Physiologe und Histologe John Newport Langley und der Mediziner Paul Ehrlich. Die beiden Wissenschaftler beobachteten in ihren Arbeiten eine scheinbar selektive und spezifische Wechselwirkung zwischen Molekülen und führten unabhängig voneinander zur Beschreibung dieser Vorgänge den Begriff des Rezeptors ein. Dieser Begriff leitet sich von dem lateinischen Wort *recipere* ab, was so viel wie empfangen bedeutet^[2] und er wird für den Bindungspartner verwendet, der mit dem Substrat in

Einleitung

Wechselwirkung tritt. Im weiteren Verlauf des 20. Jahrhunderts führte das immer besser werdende Verständnis der Rezeptor-Substrat-Wechselwirkung zu Erweiterungen und Modifikationen des Schlüssel-Schloss-Prinzips. So sind Moleküle keineswegs so starr wie die Begriffe Schlüssel und Schloss suggerieren, sondern aufgrund der meist freien Rotierbarkeit von Bindungen flexibel, wodurch sie verschiedene Konformationen annehmen können. Entsprechend wurde 1958 von Daniel Koshland Jr. die *induced fit*-Theorie eingeführt.^[3] Diese besagt, dass das aktive Zentrum von Enzymen und das dazugehörige Substrat sich erst während des Bindungsvorgangs durch konformative Änderungen aneinander anpassen, sodass im Enzym-Substrat-Komplex eine komplementäre Anordnung entsteht (Abbildung 2).

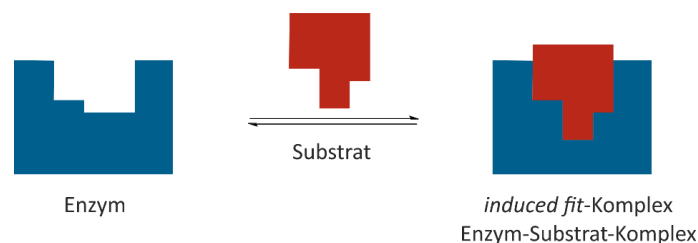


Abbildung 2: Schematische Darstellung der *induced fit*-Theorie nach Daniel Koshland Jr.

Zum besseren Verständnis seiner Theorie verglich Koshland das Enzym mit einem Handschuh und das Substrat mit einer Hand. Ein Handschuh passt sich der Hand erst beim Anziehen an und kann trotz seiner Flexibilität die rechte von der linken Hand unterscheiden.^[4]

Mit der anschließenden Entwicklung zahlreicher synthetischer Rezeptoren, die mit der Entdeckung der Kronenether, welche Metallkationen komplexieren, durch Pedersen^[5] begann und sich kurz darauf mit der Beschreibung von Katapinanden, die Halogenide binden, durch Park und Simmons^[6] und von Kryptanden, welche ebenfalls an Metallkationen binden, durch Lehn^[7] fortsetzte, kam es zu einem besseren Verständnis der molekularen Erkennung. Die folgende Definition geht dabei auf Lehn zurück^[8]:

„Molekulare Erkennung ist als Selektion und Bindung eines Substratmoleküls (oder mehrerer Substratmoleküle) durch ein Rezeptormolekül definiert worden, wobei auch eine spezifische Funktion im Spiel sein kann. Bloße Bindung ist noch keine Erkennung, obwohl dies häufig so verstanden wird.“^[9]

Die Untersuchung molekularer Erkennungsvorgänge von synthetischen Rezeptoren ist seither ein Schwerpunkt der supramolekularen Chemie, die sich mit der Nutzung nicht-kovalenter Wechselwirkungen zur Generierung höhermolekularer Komplexe aus mindesten zwei wechselwirkenden Komponenten beschäftigt.^[10]

1.2 Relevanz von Anionen als Substrate für supramolekulare Wirte

Mit der Entwicklung der supramolekularen Chemie und des Verständnisses der Prinzipien der molekularen Erkennung richtete sich der Fokus zunehmend auf Substrate, die beispielsweise aus ökologischen oder ökonomischen Gründen interessant sind. Hierzu zählen anorganische und organische Anionen.

Berührungspunkte mit Anionen – insbesondere anorganischen – finden sich viele. Chlorid ist nicht nur das am häufigsten vorkommende Anion in Meerwasser,^[11] sondern auch das am häufigsten vorkommende in der extrazellulären Matrix.^[12] So ist zum Beispiel eine der verbreitetsten Stoffwechselerkrankungen, die Mukoviszidose, auf den gestörten Membrantransport von Chloridionen zurückzuführen.^[13] Nitrate und Phosphate werden hauptsächlich als Düngemittel eingesetzt und führen bei übermäßigem Gebrauch zur Eutrophierung von Gewässern.^[14] Weitere anthropogene Schadstoffe, die die Boden- und Wasserqualität negativ beeinflussen, sind Pertechnat, das in der atomaren Energieversorgung bei der Kernspaltung anfällt^[15] und Perchlorat, das als Explosiv- und Raketentreibstoff genutzt wird.^[16] Hoch-toxisches Arsenat hingegen ist hauptsächlich natürlichen Ursprungs und führt zu großen Problemen in der Trinkwasserversorgung zahlreicher Menschen, da beispielsweise in Argentinien, China oder auch Bangladesch große Mengen Grundwasser mit Arsenat belastet sind.^[17] Sulfat trägt als Bestandteil des sauren Regens zu Waldsterben bei^[18] und verursacht Probleme bei der Endlagerung von radioaktivem Abfall.^[19]

Diese Aufstellung verdeutlicht, wie allgegenwärtig Anionen sind und warum sie attraktive Targets für die Entwicklung supramolekularer Rezeptoren darstellen. Aufgrund der intrinsischen Eigenschaften von Anionen ist ihre Erkennung aber schwieriger als die anderer Substrate. So sind Anionen größer als die entsprechenden iso-elektronischen Kationen, wodurch Coulomb-Wechselwirkungen schwächer ausfallen. Sie unterliegen in Abhängigkeit

Einleitung

des pH-Werts oftmals Protonierungsgleichgewichten, was eine Änderung der Ladung und der Wasserstoffbrückendonor- und akzeptoreigenschaften bewirken kann. Anionen kommen darüber hinaus in den verschiedensten Geometrien vor (sphärisch, linear, tetraedrisch...) und können abhängig vom umgebenden Lösungsmittel stark solvatisiert sein, was den Bindungsprozess ebenfalls beeinflusst.^[20]

Dass eine selektive und effektive Bindung von Anionen aber auch in dem kompetitiven Medium Wasser möglich ist, zeigt die Natur. Ein Beispiel eines Anionen-bindenden Proteins ist das Sulfat-bindende Protein (SBP) (Abbildung 3), das als Transportprotein für Sulfat in gram-negativen Bakterien fungiert. Das SBP besteht aus zwei Domänen, die so angeordnet sind, dass in der sich dazwischen befindlichen Spalte Sulfat gebunden werden kann, wo es effektiv vom Lösungsmittel abgeschirmt wird. Das Sulfatanion wechselwirkt über insgesamt sieben Wasserstoffbrückenbindungen mit funktionellen Gruppen des Proteins, wobei Salzbrücken zu geladenen Aminosäureresten oder Gegenionen nicht zur Bindung beitragen.^[21]

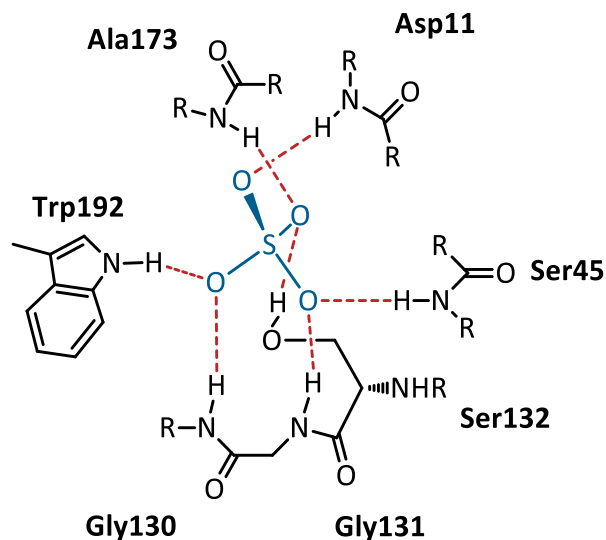


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Wechselwirkung eines Sulfatanions innerhalb der Bindungstasche des Sulfat-bindenden Proteins (SBP)

Die Bindungskonstante des Sulfatkomplexes beträgt $\log K_a$ 6.9. Selenat oder Phosphat werden hingegen, obwohl sie ebenfalls tetraedrische Strukturen besitzen, um bis zu fünf Größenordnungen schlechter gebunden.^[22] Untersuchungen bei denen einzelne Aminosäureuntereinheiten des SBP an der Bindungsstelle ausgetauscht wurden, belegten

zudem, dass die exakte Anordnung der funktionellen Gruppen innerhalb der Bindungstasche maßgeblich für die hohe Sulfataffinität und -selektivität des Proteins verantwortlich ist.^[23] Dieses Beispiel zeigt somit eindrucksvoll wie selektiv Anionen gebunden werden können und kann damit als Inspiration für die Entwicklung synthetischer Rezeptoren dienen.

1.3 Konzepte der Anionenerkennung in Wasser

Die sensitive und selektive Erkennung von Anionen vor allem in wässrigen Medien eröffnet aus medizinischer, ökologischer und chemischer Sicht eine Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten. Daher ist es nicht weiter verwunderlich, dass seit den 1970er Jahren unzählige Anionenrezeptoren entwickelt und hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften untersucht worden sind.^[24] Allen Rezeptoren ist dabei gemeinsam, dass deren Komplexbildung mit Anionen nach dem in Abbildung 4 gezeigten Schema verläuft und in verschiedene Einzelschritte unterteilt werden kann, nämlich der Desolvatisierung von Rezeptor und Anion, der Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen zwischen den Bindungspartnern und der Reorganisation von Lösungsmittelmolekülen.

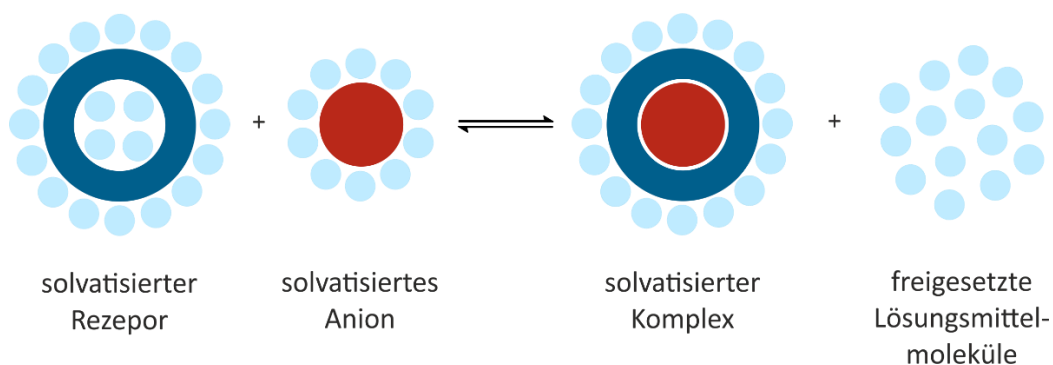


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Komplexbildung unter Berücksichtigung der Solvatisierung der Bindungspartner

Jeder dieser Schritte ist mit einer charakteristischen Enthalpie- und Entropieänderung verbunden, wobei in der Summe ein exergonischer Prozess resultieren muss, wenn die Komplexbildung freiwillig ablaufen soll.

Einleitung

Eine effiziente Anionenbindung in Wasser ist entsprechend zu erwarten, wenn die direkten Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat so stark sind, dass sie nicht nur den Entropieverlust der Komplexbildung, sondern auch die für die Desolvatisierung des Anions und gegebenenfalls die von polaren Molekülbereichen des Rezeptors notwendigen Enthalpiebeiträge überkompensieren können. Dies ist meist bei geladenen Rezeptoren der Fall, die für die Substratbindung starke Ion-Ion-^[6,25] oder koordinative Wechselwirkungen^[26] ausnutzen. Neutrale Rezeptoren, deren Vorteil gegenüber geladenen ist, dass sie kein Gegenion enthalten, welches mit dem Gast um die Bindungsstelle des Rezeptors konkurriert,^[27] nutzen hingegen zur Komplexbildung schwächere Wechselwirkungsarten wie Wasserstoffbrückenbindungen, auch solche zu polarisierten C-H-Bindungen,^[28,29,30] Halogenbrücken,^[31] oder auch Anionen- π -Wechselwirkungen.^[32]

Die Mehrzahl dieser Wechselwirkungsarten ist elektrostatischer Natur, was bedeutet, dass deren Stärke entsprechend zunimmt, je größer der Unterschied der elektrostatischen Potentiale der Bindungspartner in den Molekülbereichen ist, die bei der Komplexbildung in Kontakt kommen. In wässriger Umgebung liegen polare Molekülbereiche jedoch stark hydratisiert vor und erschweren somit diese Wechselwirkungen, sodass die Hydratisierung, die mit zunehmendem Wasseranteil des Lösungsmittels immer effizienter wird, der Komplexbildung entgegenwirkt. Die Eigenschaften des in Abbildung 5 gezeigten und in der Gruppe von Jolliffe entwickelten Rezeptors spiegeln diesen Effekt wider.

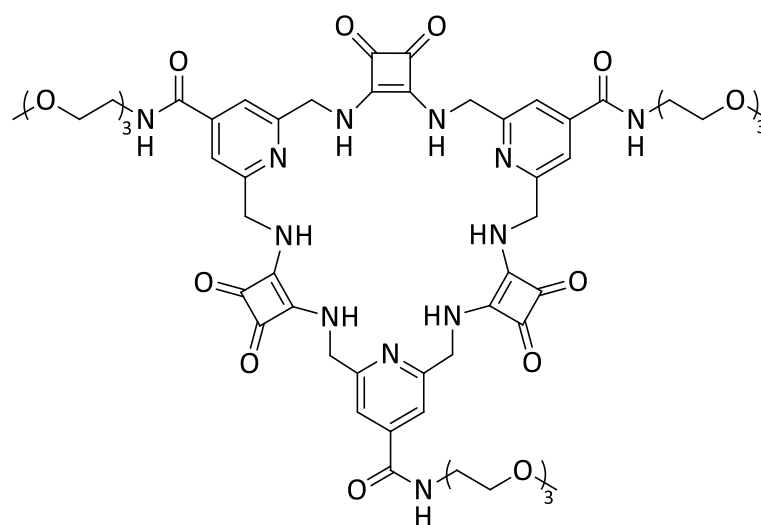


Abbildung 5: Makrocyclisches Tris(quadratsäureamid) nach Jolliffe et al.

Einleitung

Dieser Makrocyclus enthält in alternierender Abfolge Quadratsäure- und Pyridinuntereinheiten, welche über Methylenbrücken miteinander verknüpft sind. In 4-Position der Pyridinuntereinheiten finden sich darüber hinaus Triethylenglycolreste, die zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit dienen. Entsprechend waren Bindungsstudien in DMSO- d_6 /D₂O Gemischen bis hin zu 100 Vol.-% Wasser möglich. Bei einer Lösungsmittelzusammensetzung von 50 Vol.-% D₂O/DMSO- d_6 wurde für den Sulfatkomplex dieses Rezeptors eine Bindungskonstante von $\log K_a$ 3.7 ermittelt. Diese Sulfataffinität wurde auf die Passgenauigkeit des Anions in der Rezeptorkavität zurückgeführt, die die Bildung von sechs Wasserstoffbrücken zwischen den Quadratsäure-NH-Gruppen und den Sulfat-Sauerstoffatomen ermöglicht. Zudem ist für die Bildung des Komplexes keine substantielle konformative Reorganisation des Rezeptors notwendig, da zwischen den Stickstoffatomen der Pyridineinheiten und den Quadratsäure-Amidprotonen intramolekulare Wasserstoffbrücken bestehen, die auch in der Abwesenheit von Anionen eine Rezeptorkonformation stabilisieren, in der alle Quadratsäureamid-Protonen in das Innere der Kavität weisen. Im Komplex ist das Anion außerdem gut vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt. Weitere Untersuchungen in diesem Lösungsmittelgemisch zeigten, dass die Zugabe von Chlorid-, Nitrat-, Hydrogencarbonat- und Dihydrogenphosphatsalzen keine Veränderungen im ¹H-NMR-Spektrum des Rezeptors verursachte, was darauf hindeutet, dass diese Anionen nicht gebunden wurden. Titrations mit Selenat- und Chromatsalzen, deren Anionen bezüglich Form, Ladung und Größe dem Sulfation sehr ähnlich sind, bestätigten die ausgeprägte Selektivität für Sulfat. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Wasseranteils im Lösungsmittelgemisch zu einer Abnahme der Sulfataffinität führte bis schließlich in reinem Wasser keine Sulfatbindung mehr detektiert werden konnte.^[33] Dieser Befund verdeutlicht den Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf die Bindung. DMSO/Wasser Gemische sind weniger kompetitiv als reines Wasser, sodass die Desolvatisierung der Bindungspartner leichter ist und die Stärke der Wasserstoffbrücken entsprechend ausreicht, um eine Bindung des Sulfatanions zu erlauben. In reinem Wasser hingegen ist die Dehydratisierung der stark solvatisierten, polaren Bindungspartner enthalpisch zu aufwendig, sodass keine Komplexbildung stattfindet.

Entsprechend sollte in Wasser also eine effiziente Anionenbindung möglich sein, wenn die Bindungsstellen im Rezeptor zwar positiv polarisiert, aber schwach solvatisiert sind, und auch

Einleitung

das Anion nur schwach hydratisiert vorliegt. Dies wird tatsächlich beobachtet. So binden Ladungs-delokalisierte, schwach hydratisierte Anionen wie beispielsweise Perchlorat oder Iodid stark an Rezeptoren wie die von Sindelar beschriebenen Bambusurile, die eine hydrophobe Kavität aufweisen. Das Bambus[6]uril (Abbildung 6) besteht aus Glycolurileinheiten, in denen die beiden Stickstoffeinheiten in einem der beiden Ringe mit Triethylglycolresten versehen sind, während die Stickstoffeinheiten des anderen Rings über Methyleneinheiten miteinander verbunden sind. Die Methinprotonen der Glycolurileinheiten weisen ins Innere des gebildeten Hohlraums, sodass Wasserstoffbrückenbindungen möglich sind.

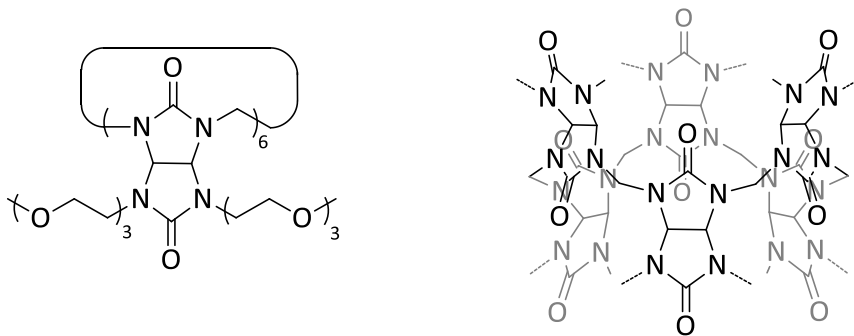


Abbildung 6: Bambus[6]uril nach Sindelar et al. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Triethylglycolreste in der dreidimensionalen Ansicht des Rezeptors nicht abgebildet.

Kalorimetrische Bindungsstudien in Wasser zeigten, dass dieser Rezeptor mit Halogeniden durchweg 1:1 Komplexe bildet. Deren Stabilität nimmt in der Reihenfolge Chlorid < Bromid < Iodid zu, wobei für den Iodidkomplex eine sehr hohe Bindungskonstante $\log K_a$ 7.5 ermittelt wurde. Da der Rezeptor flexibel genug ist, um sich der Größe der Halogenide anzupassen, spiegelt die Zunahme der Komplexstabilität von Chlorid zu Iodid die zunehmende Leichtigkeit wider mit der diese Anionen in Wasser dehydratisiert werden. ^[34]

Umfangreiche Untersuchungen des Bindungsvorgangs ergaben, dass die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen jedoch von untergeordneter Bedeutung für die Komplexstabilität sind und der Bindungsvorgang tatsächlich wesentlich durch Lösungsmittelleffekte getrieben wird. Hierbei spielt eine Rolle, dass konkave Molekülbereiche, wie in diesem Fall die Kavität des Bambus[6]urils, in Lösung Wassermoleküle enthalten, die nicht die optimale Anzahl an Wasserstoffbrücken (3.5^[35]) ausbilden können. Die

Einleitung

Hydratisierung dieser Molekülbereiche ist also enthalpisch ungünstig, sodass deren Desolvatisierung während der Komplexbildung entsprechend zu einem Enthalpiegewinn führt. Es wird angenommen, dass die Freisetzung dieser in der Kavität gebundenen Wassermoleküle – auch *high energy water* genannt^[36] – maßgeblich zur Komplexbildung der Bambusurile beiträgt.

Die Hydratisierung sehr großer konvexer Molekülbereiche kann ebenso enthalpisch ungünstig sein, da die umgebenden Wassermoleküle nicht effizient aneinander binden können. In diesem Fall ist die Komplexbildung ebenfalls mit einem Enthalpiegewinn verbunden, wobei sie gleichzeitig entropisch meist ungünstig ist, da das aus der Hydrathülle freigesetzte Wasser in Lösung stärker geordnet ist als vor der Komplexbildung. Lösungsmittelleffekte, die die Komplexbildung begünstigen und mit einem Enthalpiegewinn aber Entropieverlust verbunden sind, werden allgemein mit dem Begriff nicht-klassischer hydrophober Effekt verbunden.^[37,38]

Eine derartige thermodynamische Signatur wurde auch für die Bildung der Komplexe aus γ -Cyclodextrinen (Abbildung 7) und anionischen Dodecaborat-Clustern in Wasser beobachtet, wobei der Komplex mit $B_{12}Br_{12}^{2-}$ mit einem $\log K_a$ von 5.98 die höchste Bindungskonstante aufwies.^[39]

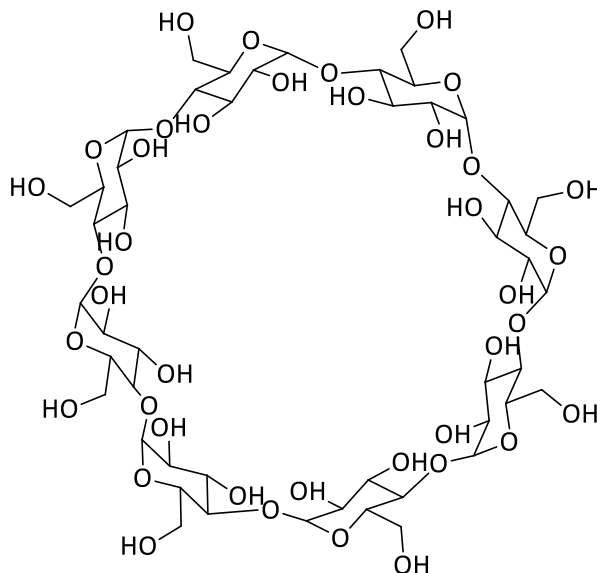


Abbildung 7: Struktur von γ -Cyclodextrin

Einleitung

Aus analogen Gründen wie bei dem zuvor erwähnten Effekt, führt in diesem Fall die Desolvatisierung des sehr großen und stark Ladungs-delokalisierten Anions während des Bindungsvorgangs zu einer enthalpisch günstigen und entropisch ungünstigen Komplexbildung. Da der enthalpische Beitrag zur Komplexbildung maßgeblich durch die Solvatisierung des superchaotropen Anions bestimmt wird und nicht durch die des Rezeptors, spricht man in diesem Fall vom chaotropen Effekt.^[40]

Wird im Gegensatz dazu bei der Komplexbildung ein positiver Entropiebeitrag verzeichnet, weist dies in der Regel darauf hin, dass die Komplexbildung durch den klassischen hydrophoben Effekt begünstigt wird.^[37,38] Dabei führt die Dehydratisierung kleinerer, hydrophober Molekülbereiche während des Bindungsvorgangs zu einem entropischen Gewinn, da die aus der Hydrathülle dieser Bereiche freigesetzten Wassermoleküle in Lösung eine geringere Ordnung aufweisen. Auch der klassische hydrophobe Effekt kann für die Anionenbindung in Wasser ausgenutzt werden. Er spielt beispielsweise in den von Kubik untersuchten Anionenbindenden Cyclopeptiden (CP) eine Rolle. Die Cyclopeptide zeichnen sich dabei im Vergleich zu den bisher genannten Rezeptoren vor allem dadurch aus, dass sie dazu in der Lage sind selbst das stark solvatisierte Sulfatanion in Lösungsmittelgemischen mit sehr hohem Wasseranteil bis hin zu reinem Wasser, effizient zu binden. Strukturell handelt es sich bei dem entsprechenden Rezeptor **R1** um ein cyclisches Hexapeptid, welches aus alternierend angeordneten L-Prolin- und 6-Aminopicolinsäureuntereinheiten besteht (Abbildung 8).

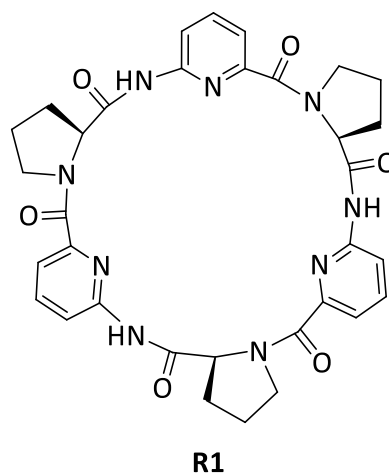


Abbildung 8: Struktur des Cyclopeptids **R1** von Kubik

Einleitung

Das Cyclopeptid **R1** nimmt dabei in polaren Lösungsmitteln im Mittel eine symmetrische Struktur an, bei der die aromatischen Untereinheiten nahezu parallel zur C_3 -Achse angeordnet sind und die tertiären Amidgruppen der Prolineinheiten in der *cis*-Konformation vorliegen (Abbildung 9a).

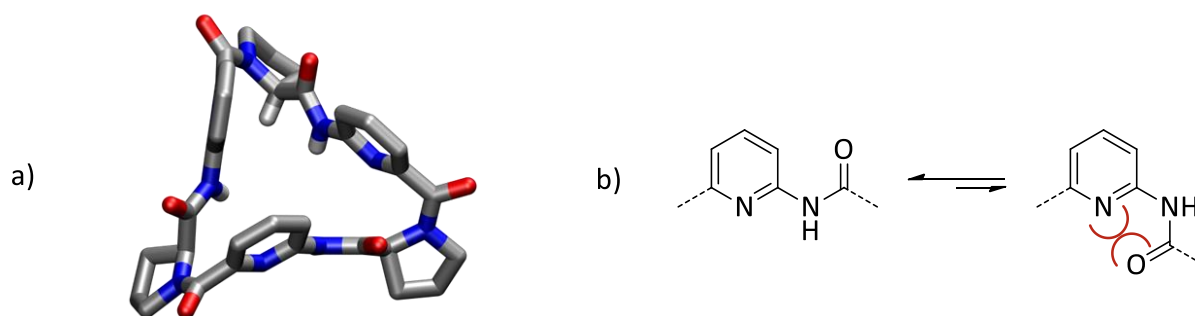


Abbildung 9: a) Kristallstruktur des Cyclopeptids **R1** und b) Mögliche Anordnungen der Amidgruppe in Nachbarschaft der 6-Aminopicolinsäure

Diese Konformation wird auch im Feststoff gefunden. Alle drei NH-Gruppen sind konvergierend entlang einer konkaven Kavität angeordnet, die durch die Prolinringe begrenzt wird. Für diese konformative Stabilisierung sind unter anderem die Stickstoffatome in den Ringen der 6-Aminopicolinsäureeinheiten verantwortlich, die eine Konformation mit divergierenden NH-Gruppen verhindern, da in dieser destabilisierende, repulsive Wechselwirkungen zwischen diesen Stickstoffatomen und den Sauerstoffatomen der benachbarten Amidgruppen auftreten würden (Abbildung 9b).

Das Cyclopeptid erwies sich als sehr gut löslich in polaren Medien, sodass die Anionenaffinität in einem 20 Vol.-% MeOD- d_4 /D $_2$ O Gemisch untersucht werden konnte. Dabei wurde eine schwache Wechselwirkung mit Hydrogencarbonat, Hydrogenphosphat, Dihydrogenphosphat, Nitrat und Acetat festgestellt und stärkere Wechselwirkungen mit Carbonat, Benzylsulfonat, Sulfat, Chlorid, Bromid und Iodid. Weitere Untersuchungen konzentrierten sich auf die fünf zuletzt genannten Anionen, da diese bei pH 7 keinen Protonierungsgleichgewichten unterliegen und die Bindungsstudien somit ohne Verwendung von gegebenenfalls störenden Puffersalzen durchgeführt werden konnten. Es zeigte sich, dass **R1** mit Benzylsulfonat einen 1:1 Komplex bildet, wohingegen mit den anderen Anionen 2:1 Komplexe gebildet werden. Die

Einleitung

Struktur der 2:1 Komplexe wurde anhand der erhaltenen Kristallstruktur des Iodidkomplexes (Abbildung 10) aufgeklärt. In dieser Struktur wird das Anion in einer Kavität zwischen zwei Cyclopeptiden gebunden, wobei es über sechs Wasserstoffbrückenbindungen mit den NH-Gruppen von **R1** wechselwirkt und vollständig vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt wird.^[41]

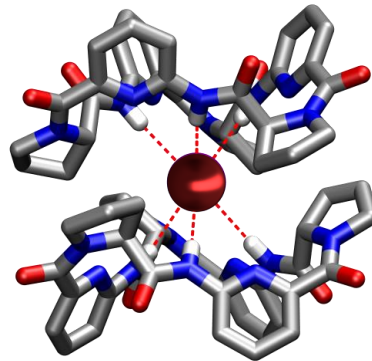


Abbildung 10: Kristallstruktur des Iodidkomplexes von **R1**

Aus quantitativen Bindungsstudien in 20 Vol.-% MeOD- d_4 /D₂O ging hervor, dass in der Reihe der Halogenide Chlorid am schwächsten und Iodid mit einem $\log K_a$ von 5.20 am stärksten gebunden wird. Eine fast ebenso hohe Bindungskonstante von $\log K_a$ 5.09 wurde auch für den Sulfatkomplex beobachtet.^[41] Diese Trends stehen in Einklang mit einer Korrelation der Komplexstabilität mit der Größe der Anionen. Iodid und Sulfat sind in etwa gleich groß und füllen die Kavität somit nicht nur optimal aus, sondern können aufgrund ihrer Größe mit allen Wasserstoffbrückendonorguppen gleichzeitig wechselwirken. Bromid und Chlorid weisen einen kleineren Anionenradius auf, können den Hohlraum dadurch nicht vollständig ausfüllen und werden dementsprechend schwächer gebunden. Die Bildung eines 1:1 Komplexes mit Benzylsulfonat kann damit erklärt werden, dass dieses Anion aufgrund seiner Größe die Bildung eines Sandwichkomplexes verhindert.

Die räumliche Nähe der hydrophoben Prolinringe in den Sandwichkomplexen indiziert, dass der hydrophobe Effekt die Bildung dieser Anionenkomplexe begünstigt. Tatsächlich wurde für die Komplexbildung der Cyclopeptide mit Anionen die für den klassischen hydrophoben Effekt charakteristische thermodynamische Signatur mit einem positiven Entropiebeitrag

Einleitung

beobachtet. Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Desolvatisierung der Prolinringe die Anionenbindung begünstigt, wurde anhand von Untersuchungen mit einem zu **R1** analogen Cyclopeptid mit Hydroxyprolinuntereinheiten erhalten. Dieses Cyclopeptidderivat bildete mit Anionen nämlich keine 2:1 Sandwichkomplexe, was auf die höhere Polarität des Hydroxyprolins und der damit einhergehenden schwierigeren Desolvatisierung dieser Untereinheiten im Vergleich zu den Prolineinheiten zurückgeführt wurde.^[42]

Anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass Rezeptoren, die auf vermeintlich schwachen Wechselwirkungsarten basieren, auch stark solvatisierte Anionen in Wasser binden können, sofern die Komplexbildung durch Lösungsmittelleffekte begünstigt wird.

Demnach wird die Anionenbindung nicht nur von der direkten attraktiven Wechselwirkung mit dem Rezeptor kontrolliert, sondern hängt in wässrigen Lösungsmittelgemischen maßgeblich auch von Lösungsmittelleffekten ab. Die charakteristische Veränderung der Wasserstruktur beim Übergang von hydratisierten isolierten Bindungspartnern zum hydratisierten Komplex hat enthalpische und entropische Konsequenzen, die Hinweise auf die Triebkraft der Komplexbildung geben. Es gilt jedoch zu bedenken, dass die Komplexbildung auf einem Wechselspiel vieler Parameter beruht, die nicht unabhängig voneinander analysierbar sind. Daher kann anhand thermodynamischer Messungen nicht immer eindeutig auf den genauen Mechanismus der Komplexbildung geschlossen werden.

2 Projekt A

Ein dreifach verbrücktes Bis(cyclopeptid) zur Anionenerkennung

2.1 Stand der Forschung

2.1.1 Bis(cyclopeptide) als Anionenrezeptoren in wässrigen Lösungsmittelgemischen

Ausgehend von dem in der Einleitung vorgestellten Cyclopeptid **R1** wurden durch kovalente Verknüpfung zweier Cyclopeptidringe Bis(cyclopeptide) (BCP) erhalten, die mit Anionen 1:1 Komplexe bilden und deren Komplexierungsgleichgewichte darum leichter charakterisierbar sind. Die räumliche Nähe der beiden Cyclopeptidringe in den entsprechenden BCPs führt zu einer besseren Vororganisation, die die Anionenbindung entropisch günstig beeinflusst, da ein Rezeptormolekül bei der Bildung eines 1:1 Komplexes weniger Translationsfreiheitsgrade aufgibt als zwei Rezeptoren bei der Bildung eines 2:1 Komplexes. Für die Einführung der Linker erschienen die Prolineinheiten am geeignetsten, da diese sich in den Anionenkomplexen sehr nahe kommen und einfach strukturell modifizierbar sind.

Mit Hilfe von *molecular modeling* Studien basierend auf der Kristallstruktur des Iodidkomplexes von **R1** wurde Adipinsäure als geeigneter Linker identifiziert und entsprechend **R2** (Abbildung 11) als erster Vertreter eines BCPs synthetisiert.

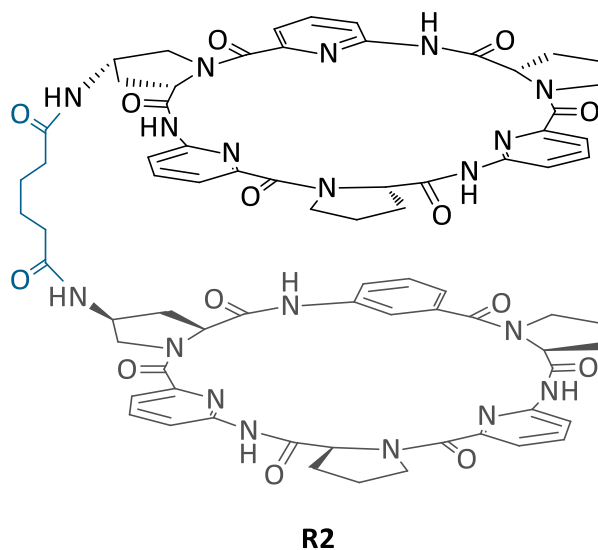


Abbildung 11: Struktur des Adipinsäure-verbrückten BCPs **R2**

BCP **R2** war etwas schlechter löslich als **R1**, sodass Untersuchungen zum Bindungsverhalten in 50 Vol.-% Methanol/Wasser durchgeführt wurden. Bindungsstudien mit den Halogeniden und Sulfat bestätigten die Bildung von 1:1 Komplexen. Innerhalb der Halogenide wurde mit einem $\log K_a$ von 3.79 der stabilste Komplex mit Iodid gebildet. Am stärksten wurde in diesem Lösungsmittelgemisch aber Sulfat gebunden, wobei der $\log K_a$ des Komplexes 4.55 betrug. Wie Tabelle 1 zeigt, ist die Bindung beider Anionen sowohl enthalpisch als auch entropisch begünstigt. Letzteres ist ein wichtiger experimenteller Hinweis auf die Bedeutung des bereits erwähnten hydrophoben Effekts bei der Komplexbildung.

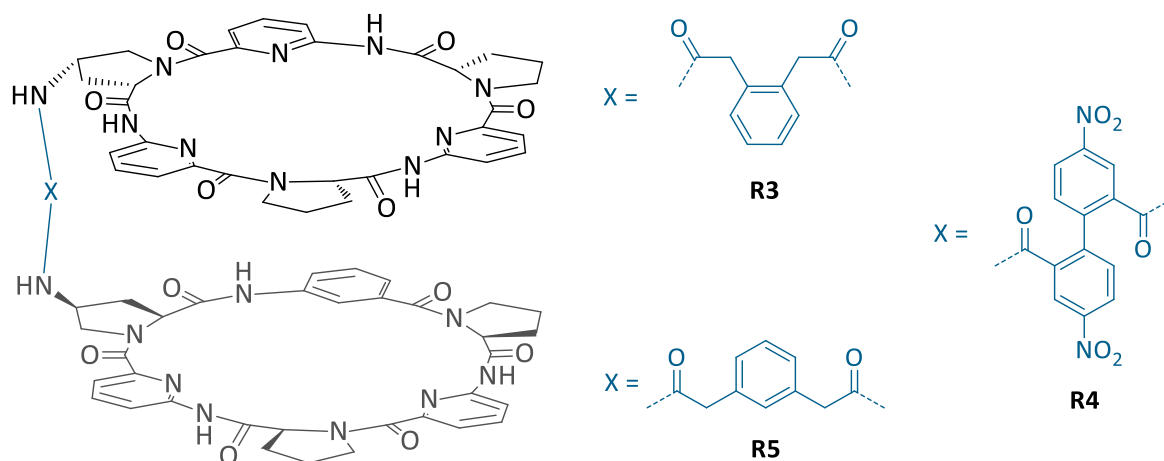
Tabelle 1: Mittels ITC bestimmte Bindungskonstanten $\log K_a$, sowie freie Komplexbildungsenthalpie ΔG^0 , Komplexbildungsenthalpie ΔH^0 und -entropie $T \cdot \Delta S^0$ für die Komplexbildung des BCPs **R2**^a

Anion	$\log K_a$	ΔG^0	ΔH^0	$T \cdot \Delta S^0$
I ⁻	3.79	-21.6	-13.2	8.40
SO ₄ ²⁻	4.55	-26.0	-15.0	11.0

^a $T = 298 \text{ K}$, Anionen als Natriumsalze, 50 Vol.-% Methanol/Wasser, Energien in kJ/mol

Ein Vergleich der Anionenaffinität von **R2** mit der von **R1** zeigte, dass die freie Komplexbildungsenthalpie von **R2** kleiner ist, was vermutlich darauf zurückgeführt werden kann, dass sich Adipinsäure nachteilig auf die optimale Komplexgeometrie auswirkt und damit nicht die optimale Linkerstruktur darstellt.^[43]

Um den Einfluss der Linkerstruktur auf die Bindungseigenschaften der BCPs genauer zu charakterisieren, wurden weitere BCPs **R3-R5** (Abbildung 12) synthetisiert und bezüglich ihrer Anionenaffinität untersucht. Die Linker in **R3** beziehungsweise **R4** wurden so gewählt, dass sie dieselbe Anzahl an Atomen zwischen den Amidgruppen aufweisen wie **R2**. Allerdings nimmt die Anzahl der rotierbaren Bindungen von **R2** über **R3** zu **R4** ab, wodurch die BCPs zunehmend starrer werden sollten. **R5** hingegen wurde mittels einer Struktur-basierten Software identifiziert (HostDesigner^[44]), die für die strukturelle Optimierung von Rezeptoren entwickelt wurde.

Abbildung 12: Struktur unterschiedlich verbrückter BCPs **R3**, **R4** und **R5**

Die Ergebnisse der ITC-Bindungsstudien sind zusammen mit den für **R2** erhaltenen Daten auszugsweise in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Mittels ITC bestimmte Bindungskonstanten $\log K_a$, sowie freie Komplexbildungsenthalpie ΔG^0 , Komplexbildungsenthalpie ΔH^0 und -entropie $T \cdot \Delta S^0$ für die Komplexbildung der BCPs **R2-R5**^a

Anion		R2	R3	R4	R5
I ⁻	$\log K_a$	3.79	4.00	3.61	4.43
	ΔG^0	-21.6	-22.7	-20.6	-25.2
	ΔH^0	-13.2	-9.10	-4.2	-15.4
	$T \cdot \Delta S^0$	8.40	13.6	15.4	9.8
SO ₄ ²⁻	$\log K_a$	4.55	5.10	5.32	5.97
	ΔG^0	-26.0	-29.2	-30.3	-34.1
	ΔH^0	-15.0	-13.5	-8.6	-13.2
	$T \cdot \Delta S^0$	11.0	15.7	21.7	20.9

^a T = 298 K, Anionen als Natriumsalze, 50 Vol.-% Methanol/Wasser, Energien in kJ/mol

Der Vergleich der Affinitäten von **R2**, **R3** und **R4** für Sulfat und Iodid zeigt, dass Sulfat von allen Rezeptoren um ein bis zwei Größenordnungen stärker gebunden wird als Iodid. Unterschiede in den Eigenschaften der Rezeptoren werden bei einem Vergleich der enthalpischen und

entropischen Beiträge zur Komplexbildung offensichtlich. So nimmt die Komplexbildungsenthalpie für Iodid und Sulfat von **R2** über **R3** nach **R4** ab, während die Komplexbildungsentropie in dieser Reihenfolge zunimmt. Dies steht in Einklang mit der Annahme, dass die Rigidiät der Linker von **R2** über **R3** nach **R4** zunimmt, sodass die Komplexbildung mit einem in dieser Reihenfolge abnehmenden Verlust an Freiheitsgraden verbunden ist, was die Bildungsentropie begünstigt. Gleichzeitig können die starreren Linker aber dazu führen, dass die Rezeptoren nicht mehr die optimalen Komplexgeometrien annehmen können, was zu einer verringerten Komplexbildungsenthalpie führt. Die gegenläufigen Trends für ΔH^0 und $T \cdot \Delta S^0$, die am Ende zu etwa gleichen ΔG^0 bzw. $\log K_a$ führen, stehen im Einklang mit einer Enthalpie-Entropie-Kompensation.^[45] Rezeptor **R5** weist in dieser Vergleichsstudie die höchsten Bindungskonstanten für Iodid und Sulfat auf, was zeigt, wie hilfreich *molecular modeling* zur Identifizierung neuer Rezeptoren sein kann. Mit 1,3-Phenylendiessigsäure wurde scheinbar ein Linker gefunden, der in dem davon abgeleiteten BCP zu einem guten Verhältnis zwischen Rigidität, Flexibilität und Struktur führt. So liegt der enthalpische Beitrag bei der Bildung des Sulfatkomplexes in der Nähe des flexibleren Derivats **R2**, gleichzeitig tritt aber auch ein sehr günstiger entropischer Beitrag auf, der dem entspricht, der bei der Komplexbildung des starreren BCP **R4** beobachtet wurde, was im Zusammenspiel zu einem effizienten Rezeptor führt. Mit Hilfe dieser Studie konnte also gezeigt werden, wie sensitiv sich die Struktur des Linkers auf die Bindungseigenschaften dieser BCPs auswirkt, und wie komplex der Zusammenhang zwischen Enthalpie, Entropie und Bindungskonstanten ist.^[30]

Da die Verbrückung zweier Cyclopeptide offensichtlich zu Rezeptoren führt, die mit Anionen stabile 1:1 Komplexe bilden, erschien es folgerichtig, zu evaluieren, ob die Bindungseigenschaften von BCPs durch die Einführung zusätzlicher Linker noch weiter verbessert werden können. Hierdurch könnte gegebenenfalls eine noch bessere Vororganisation des Rezeptors und effizientere Abschirmung des Anions vom Lösungsmittel gewährleistet werden. Dazu wurde mit Hilfe der dynamisch-kombinatorischen Chemie das zweifach verbrückte BCP **R7** dargestellt und dessen Anionenaffinität in 67 Vol.-% Acetonitril/Wasser mit der des einfach verbrückten Analogons **R6** verglichen (Abbildung 13).

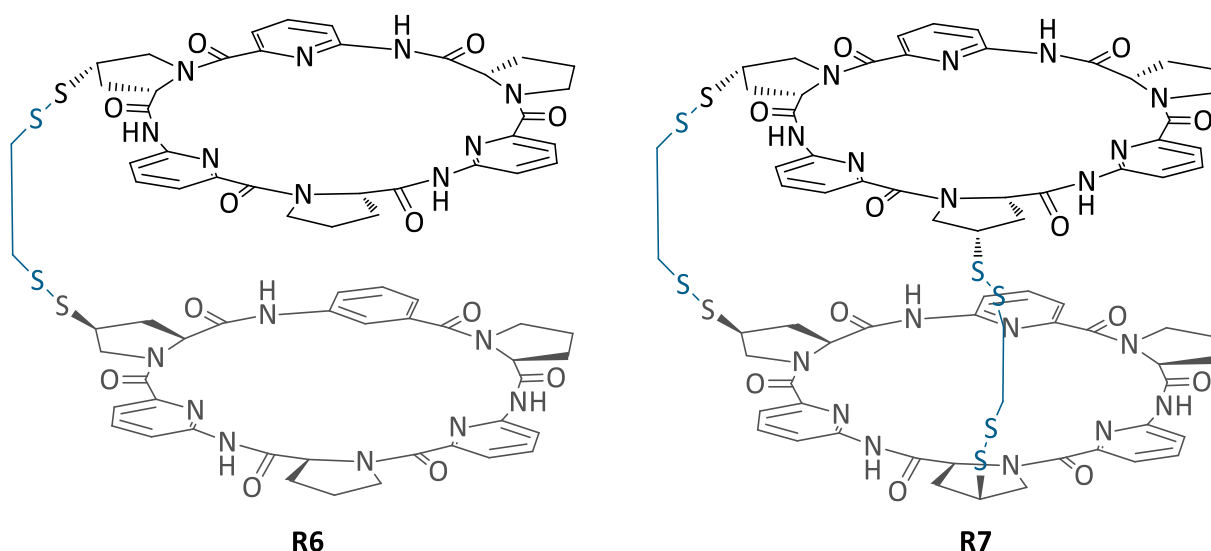
Abbildung 13: Struktur der einfach und zweifach Disulfid-verbrückten BCPs **R6** und **R7**

Tabelle 3 zeigt, dass die Einführung eines zweiten Linkers zu einer außerordentlich hohen Anionenaffinität führt, die die des einfach verbrückten BCPs um bis zu zwei Größenordnungen übersteigt. Für den Iodidkomplex von **R7** wird ein $\log K_a$ von 6.04 beobachtet, während **R6** dieses Anion nur mit einem $\log K_a$ von 4.89 bindet. Für Sulfat wird ein noch signifikanterer Anstieg der Bindungskonstanten von 6.78 auf 8.67 für **R7** verzeichnet.

Tabelle 3: Mittels ITC bestimmte Bindungskonstanten $\log K_a$, sowie freie Komplexbildungsenthalpie ΔG^0 , Komplexbildungsenthalpie ΔH^0 und -entropie $T \cdot \Delta S^0$ für die Komplexbildung des BCPs **R6** und **R7**^a

Anion		R6	R7
I ⁻	$\log K_a$	4.89	6.04
	ΔG^0	-27.9	-34.4
	ΔH^0	-18.7	-12.7
	$T \cdot \Delta S^0$	9.20	21.7
SO ₄ ²⁻	$\log K_a$	6.78	8.67
	ΔG^0	-38.6	-49.5
	ΔH^0	2.80	9.60
	$T \cdot \Delta S^0$	41.4	59.1

^a T = 298 K, Iodid als Kaliumsalz, Sulfat als Natriumsalz, 67 Vol.-% Acetonitril/Wasser, Energien in kJ/mol

Die Erhöhung der Bindungskonstanten ist bei beiden Anionen ausschließlich entropisch bedingt, was zum einen auf eine verbesserte Vororganisation der Rezeptoren durch die beiden Linker, aber auch auf eine Erhöhung des Beitrags der Rezeptordesolvatisierung zur Komplexbildung zurückgeführt wird. Gleichzeitig wird der enthalpische Beitrag etwas ungünstiger, möglicherweise aufgrund der Tatsache, dass der zweite Linker die optimale Anordnung zur Anionenbindung stört und/oder eine höhere Enthalpie zur Rezeptordesolvatisierung aufgebracht werden muss. Dies wird jedoch durch die entropischen Beiträge mehr als überkompensiert, was entsprechend in den beobachteten, sehr hohen Affinitäten resultiert.^[46]

Zur Vervollständigung dieser Untersuchungen wurde zudem das dreifach verbrückte BCP **R8** synthetisiert, dessen Struktur durch eine Kristallstruktur des Sulfatkomplexes bestätigt werden konnte (Abbildung 14). Leider wurde dieses Derivat jedoch nicht in analysenreiner Form erhalten und es neigte nach der Isolierung zur Oxidation an den Disulfidbrücken, sodass keine Bindungskonstante ermittelt werden konnten.

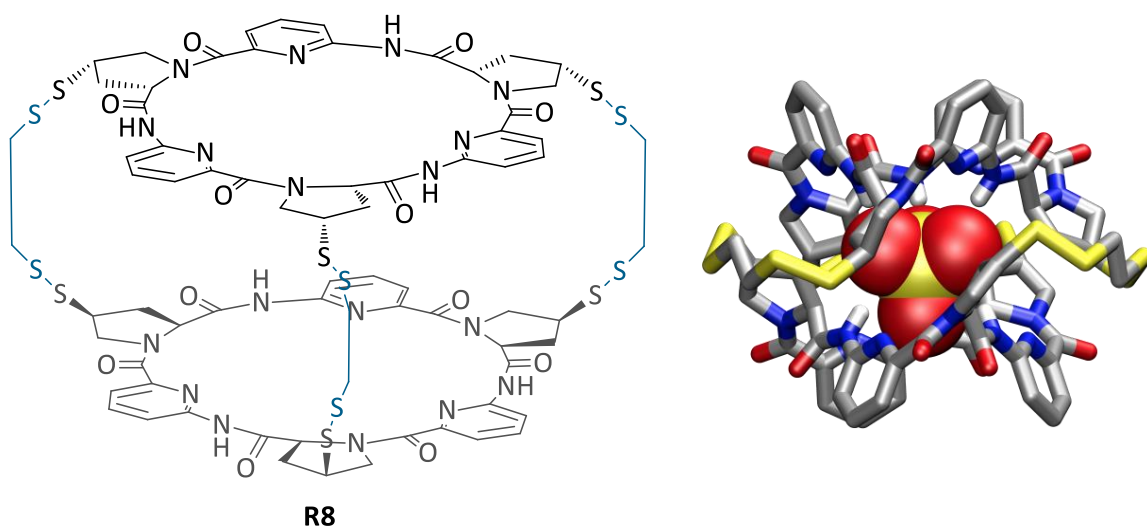


Abbildung 14: Struktur des dreifach verbrückten BCPs **R8** und Kristallstruktur des Sulfatkomplexes von **R8**

Ein Vergleich der Bindungseigenschaften, mit denen der einfach und zweifach verbrückten Analoga **R6** und **R7** war dementsprechend nicht möglich, sodass auch unklar blieb, inwiefern die thermodynamischen Parameter der Komplexbildung durch die Einführung des dritten Linkers beeinflusst werden. Qualitative NMR-Studien zeigten allerdings einen sehr langsamen

H/D-Austausch an den NH-Gruppen, wenn Anionen, insbesondere Sulfat, im Hohlraum von **R8** gebunden sind. Vergleichbares wurde bei den BCPs mit ein oder zwei Linkern nicht beobachtet. Dieser Befund belegt entsprechend die effiziente Abschirmung des Anions im Hohlraum von **R8** und weist auf eine Verlangsamung des Gastaustausches hin, der wahrscheinlich in einer hohen Komplexstabilität resultiert.^[47,48]

Eine andere Vorgehensweise zur Darstellung von dreifach verbrückten BCPs wurde bei Verbindung **R10** verfolgt. In diesem Fall wurde eine irreversible Reaktion zum Aufbau des BCPs genutzt, nämlich die Kupfer-katalysierte Cycloaddition von Alkinen an Azide (Click-Reaktion), wodurch 1,2,3-Triazol-haltige Linker erhalten wurden. Zu Vergleichszwecken wurde auch hier das analoge einfach verbrückte BCP **R9** synthetisiert, um den Einfluss der Anzahl der Linker auf die Thermodynamik der Komplexbildung zu evaluieren (Abbildung 15). Die Bindungsstudien wurden in 50 Vol.-% Methanol/Wasser durchgeführt, sodass ein direkter Vergleich mit den Eigenschaften der Disulfid-verbrückten BCPs nicht möglich war.

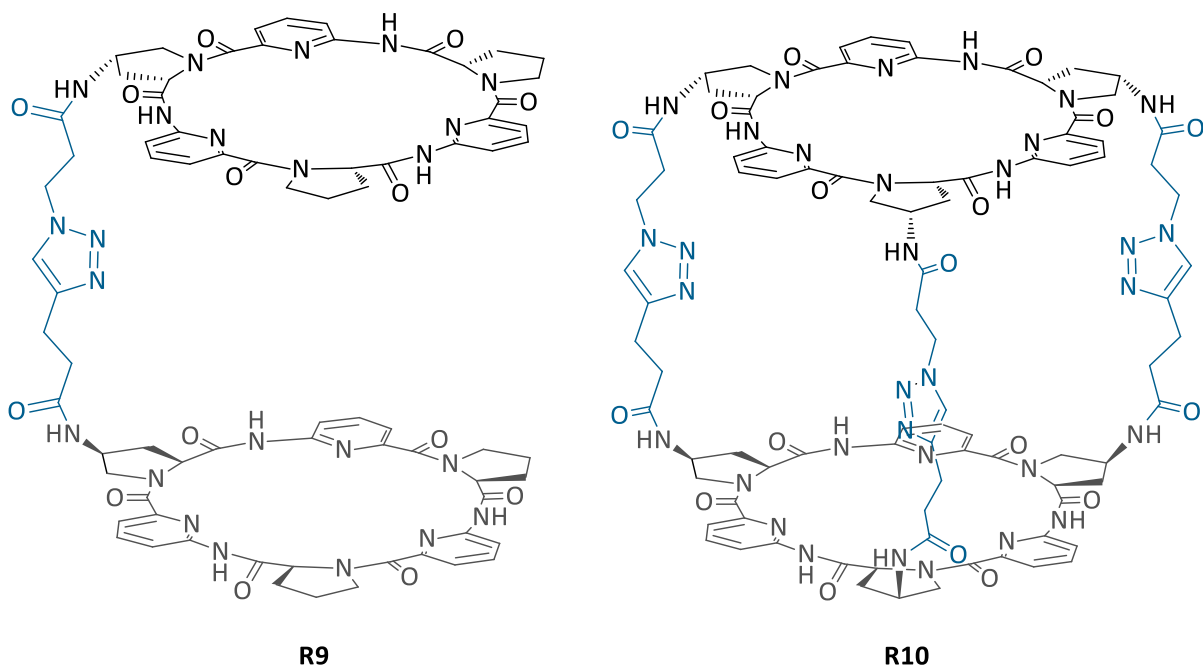


Abbildung 15: Struktur der einfach und zweifach Triazol-verbrückten BCPs **R9** und **R10**

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der ITC-Titrationsen zusammengefasst, mit denen die Sulfataffinität von **R9** und **R10** ermittelt wurde. Es wird deutlich, dass die Erhöhung der Linkeranzahl zu einer Erhöhung der Bindungskonstante führt. Diese Erhöhung fiel jedoch mit nur etwa einer Größenordnung unerwartet gering aus.

Tabelle 4: Mittels ITC bestimmte Bindungskonstanten $\log K_a$, sowie freie Komplexbildungsenthalpie ΔG^0 , Komplexbildungsenthalpie ΔH^0 und -entropie $T \cdot \Delta S^0$ für die Komplexbildung des BCPs **R9** und **R10**^a

Anion		R9	R10
SO ₄ ²⁻	$\log K_a$	4.96	5.70
	ΔG^0	-28.4	-32.6
	ΔH^0	-13.5	10.1
	$T \cdot \Delta S^0$	14.9	42.7

^a $T = 298$ K, Anion als Natriumsalz, 50 Vol.-% Methanol/Wasser, Energien in kJ/mol

Hinweise auf die Ursachen dieser Beobachtung liefert ein Vergleich der thermodynamischen Parameter der Komplexbildung beider Rezeptoren. Während die Komplexbildung im Fall des einfach verbrückten BCPs **R9** exotherm verläuft, ist diese bei **R10** endotherm. Die höhere Bindungskonstante von **R10** für Sulfat resultiert daher allein aus dem sehr günstigen entropischen Beitrag, der den ungünstigen Enthalpiebeitrag überkompensiert. Insgesamt führt der günstige Entropieterm aber nur zu einer geringfügigen Erhöhung von $\log K_a$ im Vergleich zu **R9**. Strukturelle Untersuchungen zeigten, dass **R10** für die Anionenbindung nicht gut vororganisiert ist und die drei Linker im Sulfatkomplex energetisch ungünstige Konformationen annehmen müssen. Darüber hinaus könnte die Desolvatisierung von **R10** im Vergleich zu der von **R9** enthalpisch schwieriger sein. Beide Effekte erklären, warum die Einführung der drei Linker den Enthalpiebeitrag zur Komplexbildung von exotherm zu endotherm verändert. Die reine Erhöhung der Linkeranzahl führt also nicht zwangsläufig zu einer deutlichen Erhöhung der Anionenaffinität. Es muss darüber hinaus gewährleistet werden, dass die Thermodynamik der Komplexbildung nicht ungünstig beeinflusst wird. Somit besteht bei der Entwicklung dreifach verbrückter BCPs noch Optimierungsbedarf.^[29]

2.2 Aufgabenstellung

Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse sollten im Rahmen dieser Arbeit neue dreifach verbrückte BCPs synthetisiert und hinsichtlich ihrer Anionenaffinität untersucht werden. Dabei sollte die Synthese dieser BCPs durch dreifache Verknüpfung zweier CP-Derivate mit drei 4-(2S,4S)-Aminoprolin-Untereinheiten mit geeigneten Dicarbonsäuren erfolgen (Abbildung 16). Aufgrund der so generierten Amidbindungen sollten die entsprechenden BCPs chemisch stabiler sein als die mittels dynamischer kombinatorischer Chemie erhaltenen BCPs mit Disulfidbindungen zwischen den CP-Ringen.

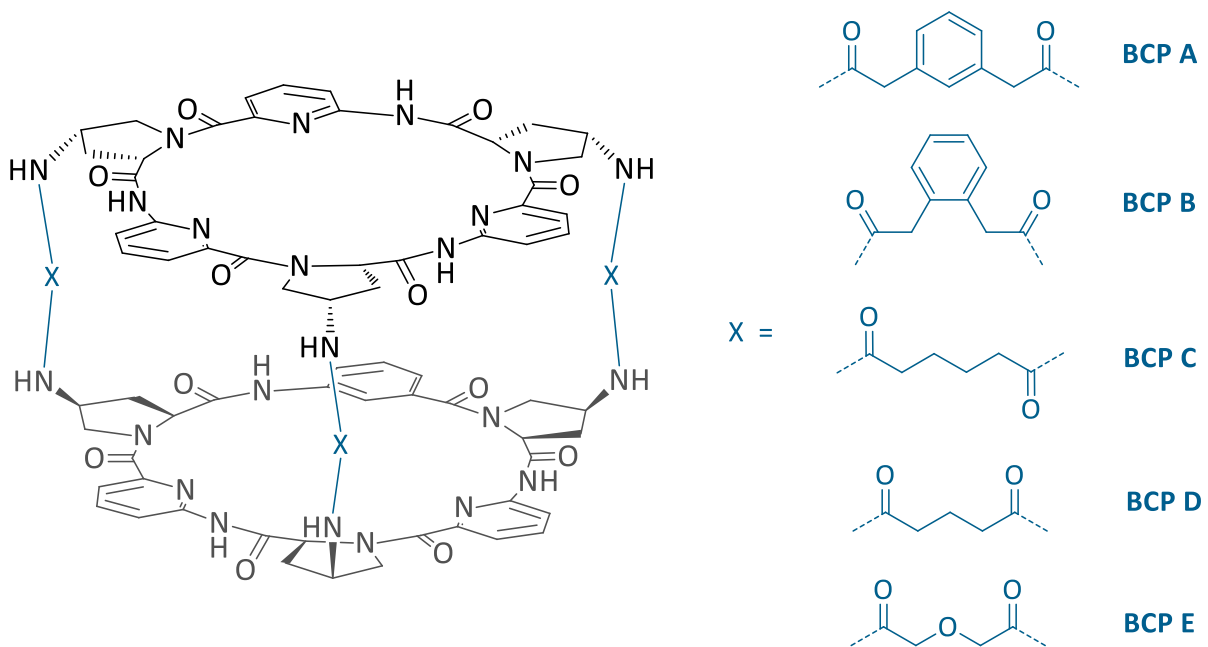


Abbildung 16: Strukturen der Zielverbindungen BCP A - E

Der erste Teil der Arbeit sollte in der Synthese des benötigten Cyclopeptidtriamins und der Linkervorstufen bestehen. Da Amidkupplungen zur Synthese der dreifach verbrückten BCPs bisher noch nicht verwendet wurden, sollten eingehende Untersuchungen zur effizienten Darstellung der gewünschten Verbindungen durchgeführt werden. Nach Etablierung einer geeigneten Syntheseroute, sollten die gewünschten BCPs im präparativen Maßstab dargestellt werden. Im folgenden Teil des Projekts sollte dann die Untersuchung der Bindungseigenschaften der erhaltenen Produkte im Fokus stehen. Mittels geeigneter

Verfahren wie NMR-Titrationsen, isothermer Titrationskalorimetrie und EXSY-Spektroskopie sollten sowohl thermodynamische als auch kinetische Aspekte der Anionenbindung untersucht werden. Abschließend sollte durch einen Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit bereits vorliegenden, ein genaueres Verständnis der Korrelation von strukturellen Parametern und Bindungseigenschaften bei dieser Rezeptorklasse entwickelt werden.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Darstellung dreifach verbrückter Bis(cyclopeptide)

2.3.1.1 Synthetische Vorüberlegungen zur Darstellung der dreifach verbrückten Bis(cyclopeptide)

Bei den Zielverbindungen dieser Arbeit handelt es sich um dreifach verbrückte Bis(cyclopeptide), deren CP-Ringe über Amidbindungen miteinander verknüpft sind. Ähnliche BCPs wurden zuvor von T. Fiehn dargestellt, indem zwei unterschiedlich funktionalisierte Cyclopeptide über Click-Reaktionen miteinander verbunden wurden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte jedoch ein alternativer Ansatz zum Aufbau dieser Käfig-artigen Rezeptoren verfolgt werden. Hierbei sollen zwei identische Cyclopeptidbausteine mit drei 4-(2S,4S)-Aminoprolinuntereinheiten im letzten Schritt der Synthese durch Umsetzung mit geeigneten Dicarbonsäuren in die dreifach verbrückten BCPs überführt werden. Ein großer Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass lediglich ein Cyclopeptidderivat synthetisiert werden muss, welches mit verschiedenen Dicarbonsäuren umgesetzt werden kann (Abbildung 17), wodurch die Struktur und Länge der Linker sehr leicht variierbar ist.

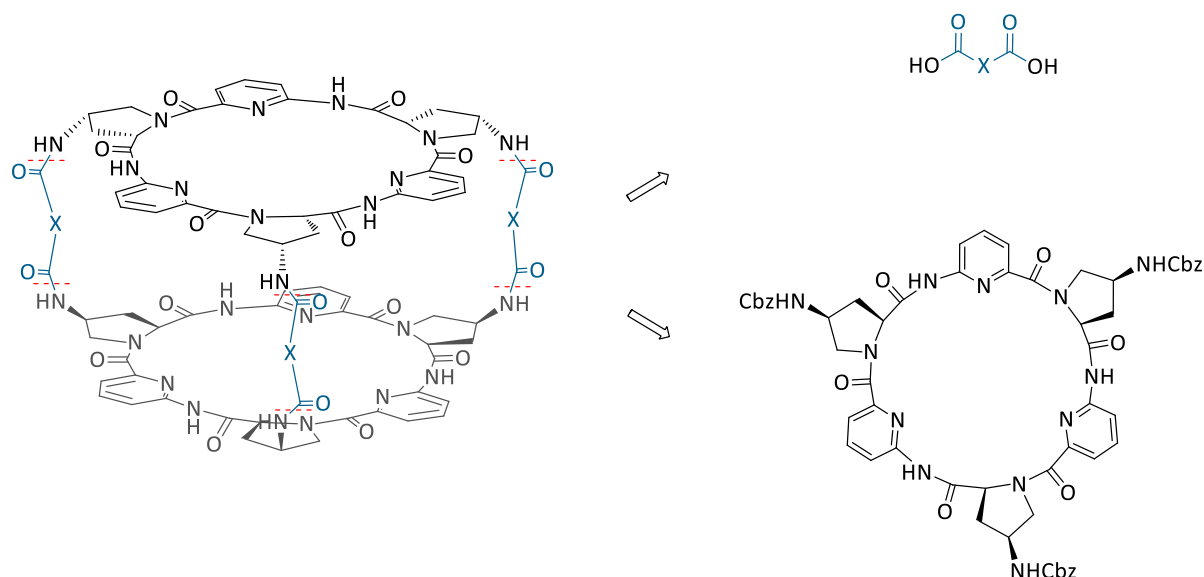


Abbildung 17: Retrosynthetische Zerlegung der dreifach verbrückten Bis(cyclopeptide), die in diesem Projekt die Zielverbindungen darstellten

Da zu Beginn der Arbeit unklar war, ob die gewählte Strategie den Aufbau von BCPs gestattet, musste ein besonderes Augenmerk auf der Erarbeitung geeigneter Bedingungen für den letzten entscheidenden Syntheseschritt liegen.

Die Synthesen der benötigten Grundbausteine sind hingegen weitestgehend etabliert. So wurde das Cyclopeptid mit den 4-(2*S*,4*S*)-Aminoprolineneinheiten bereits von T. Fiehn verwendet. Es kann mit Hilfe von Standardpeptidchemie in Lösung ausgehend von drei identischen Dipeptiden dargestellt werden, welche wiederum in einer mehrstufigen Synthese aus den kommerziell erhältlichen Bausteinen L-Hydroxyprolinmethylesterhydrochlorid und 6-Aminopicolinsäure zugänglich sind. Dabei ist die Wahl einer orthogonalen Schutzgruppenchemie wichtig, um die Bindungen selektiv knüpfen zu können. Für den N-Terminus der linearen Peptide hat sich die Boc-Schutzgruppe bewährt und für den Schutz des C-Terminus wurden in der Vergangenheit wahlweise Methyl- oder Allylester verwendet. Die Aminogruppe in 4-Position des Prolinrings soll mit einer Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Cbz) versehen werden. Dies hat den Vorteil, dass die drei für die Verknüpfung der beiden CP-Einheiten benötigten Aminogruppen nach der erfolgten CP-Synthese hydrogenolytisch freigesetzt werden können. Die Cbz-Schutzgruppen sind außerdem unter den für die Entschützung der terminalen Enden des Peptids notwendigen Bedingungen stabil.

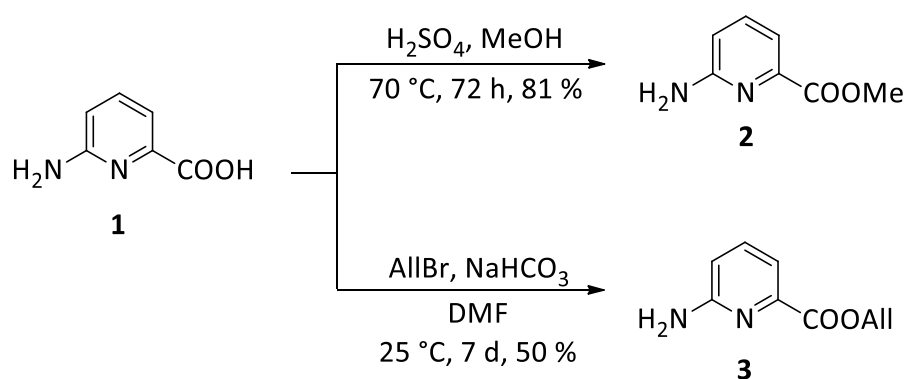
Neben den Cyclopeptiden werden geeignete Dicarbonsäuren zur Darstellung der dreifach verbrückten BCPs benötigt. Die Verknüpfung des CP-Triamins mit den Dicarbonsäuren kann wahlweise direkt unter dem Einfluss von Kupplungsreagenzien realisiert werden oder durch Überführung der Dicarbonsäuren in Aktivester und anschließender Reaktion mit dem Triamin. Der letzteren Vorgehensweise wurde der Vorzug gegeben, da bei der Verwendung von Aktivestern weniger Nebenprodukte anfallen als bei der von freien Carbonsäuren und Kupplungsreagenzien. Im konkreten Fall sollen Pentafluorphenolaktivester verwendet werden, da diese gut isolierbar und reaktiv sind.

2.3.1.2 Darstellung des Cyclopeptids

Synthetische Ergebnisse

Am Beginn der Cyclopeptidsynthese stand die Darstellung der benötigten Grundbausteine aus kommerziell erhältlichen Reagenzien. Da ursprünglich unklar war, ob sich Methyl- oder Allylester besser zum Schutz der Carboxylgruppen in den benötigten Peptiden eignen, wurden beide Möglichkeiten evaluiert.

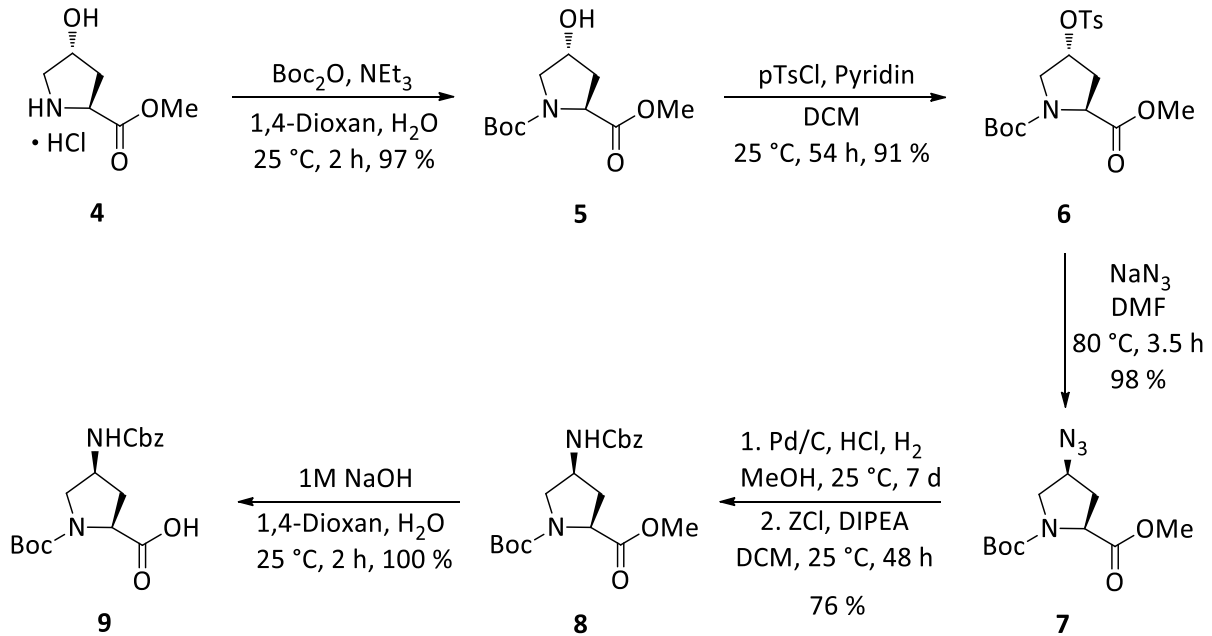
6-Aminopicolinsäuremethylester **2** wurde ausgehend von 6-Aminopicolinsäure **1** in einer säurekatalysierten Veresterungsreaktion in 81 % Ausbeute dargestellt.^[49] Der entsprechende Allylester **3** wurde unter der Verwendung von Allylbromid und Natriumhydrogencarbonat mit einer Ausbeute von 50 % erhalten (Schema 1).^[29]



Schema 1: Darstellung des 6-Aminopicolinsäuremethylesters **2** und des -allylesters **3**

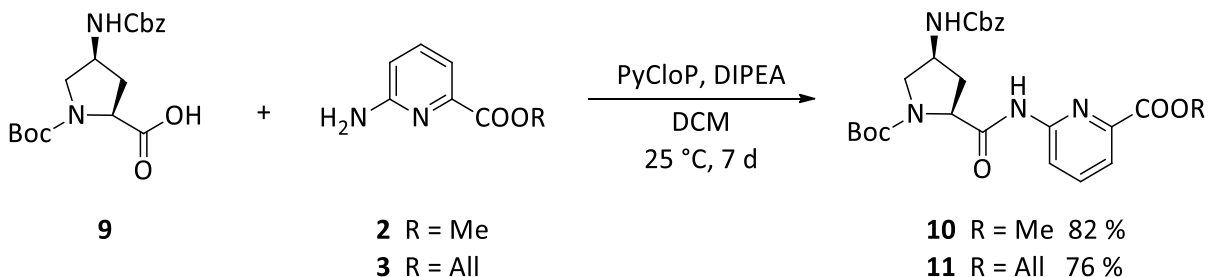
In einer fünf Stufen umfassenden Synthese wurde der Cbz-geschützte Aminoprolinbaustein **9** synthetisiert (Schema 2). Hierfür wurde L-Hydroxyprolinmethylesterhydrochlorid **4** zunächst unter Verwendung von Di-*tert*-butyldicarbonat Boc-geschützt^[50] und das Produkt **5** anschließend an der Hydroxyfunktion mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid tosyliert. Im Anschluss wurde die Tosylgruppe unter Inversion der Konfiguration des C4-Kohlenstoffatoms in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion in das Azid **7** überführt. Verbindung **7** wurde nachfolgend unter einer Wasserstoffatmosphäre zum Amin reduziert, welches anschließend ohne Aufarbeitung mit Benzylchlorformiat zum Cbz-geschützten Amin **8** umgesetzt wurde.^[51] Abschließend wurde

der gewünschte Prolinbaustein am C-Terminus entschützt, sodass Verbindung **9** erhalten wurde.



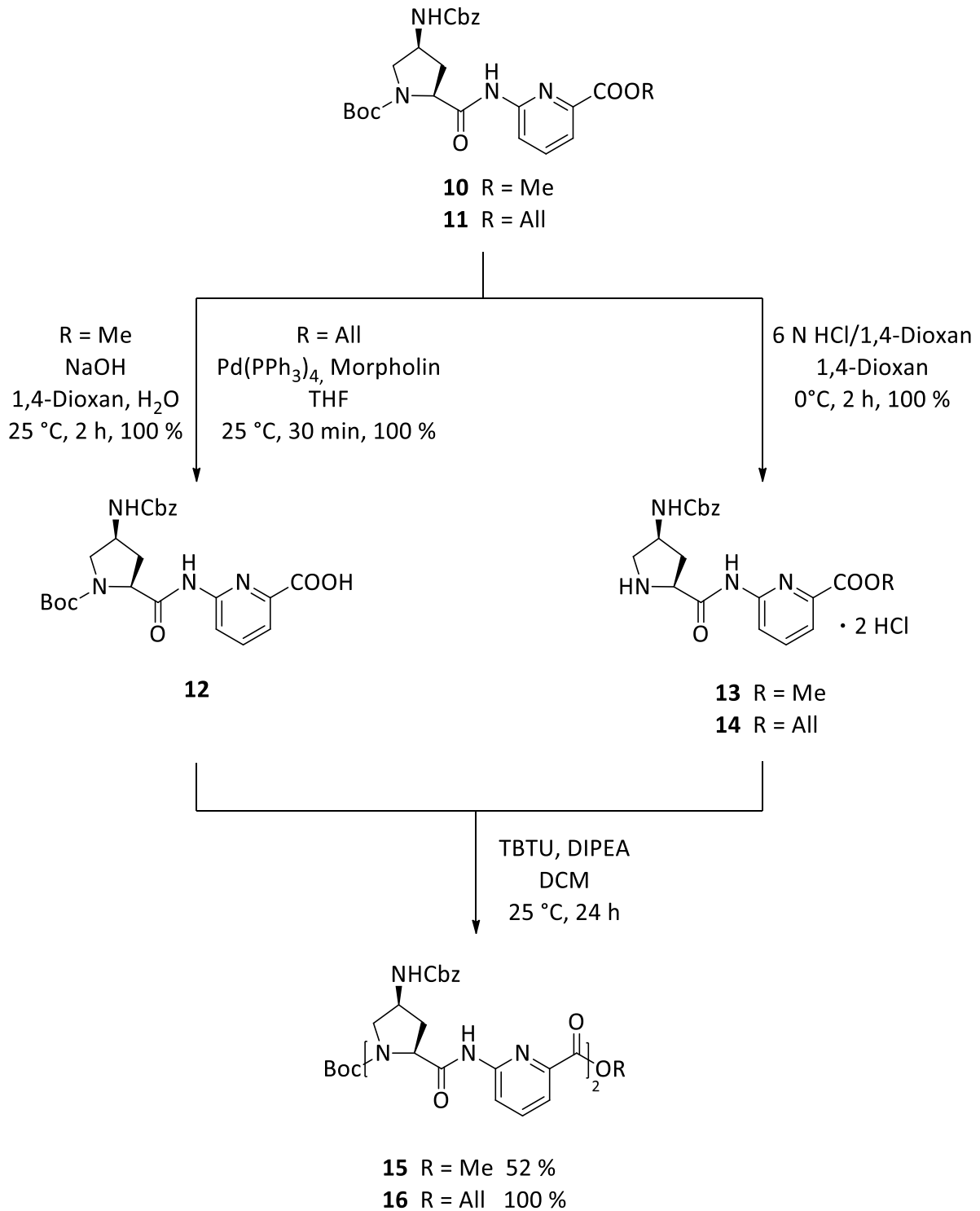
Schema 2: Darstellung des Prolinbausteins **9**

Der C-terminal entschützte Prolinbaustein **9** wurde unter Verwendung von Chlortripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyCloP) als Kupplungsreagenz mit **2** bzw. **3** gekuppelt, wobei die entsprechenden Dipeptide in beiden Fällen in circa 80 % Ausbeute anfielen (Schema 3).



Schema 3: Kupplungsreaktion zu den Dipeptiden **10** bzw. **11**

Ausgehend von diesen Dipeptiden erfolgte nun die Kettenverlängerung zu den jeweiligen linearen Tetra- und Hexapeptiden.

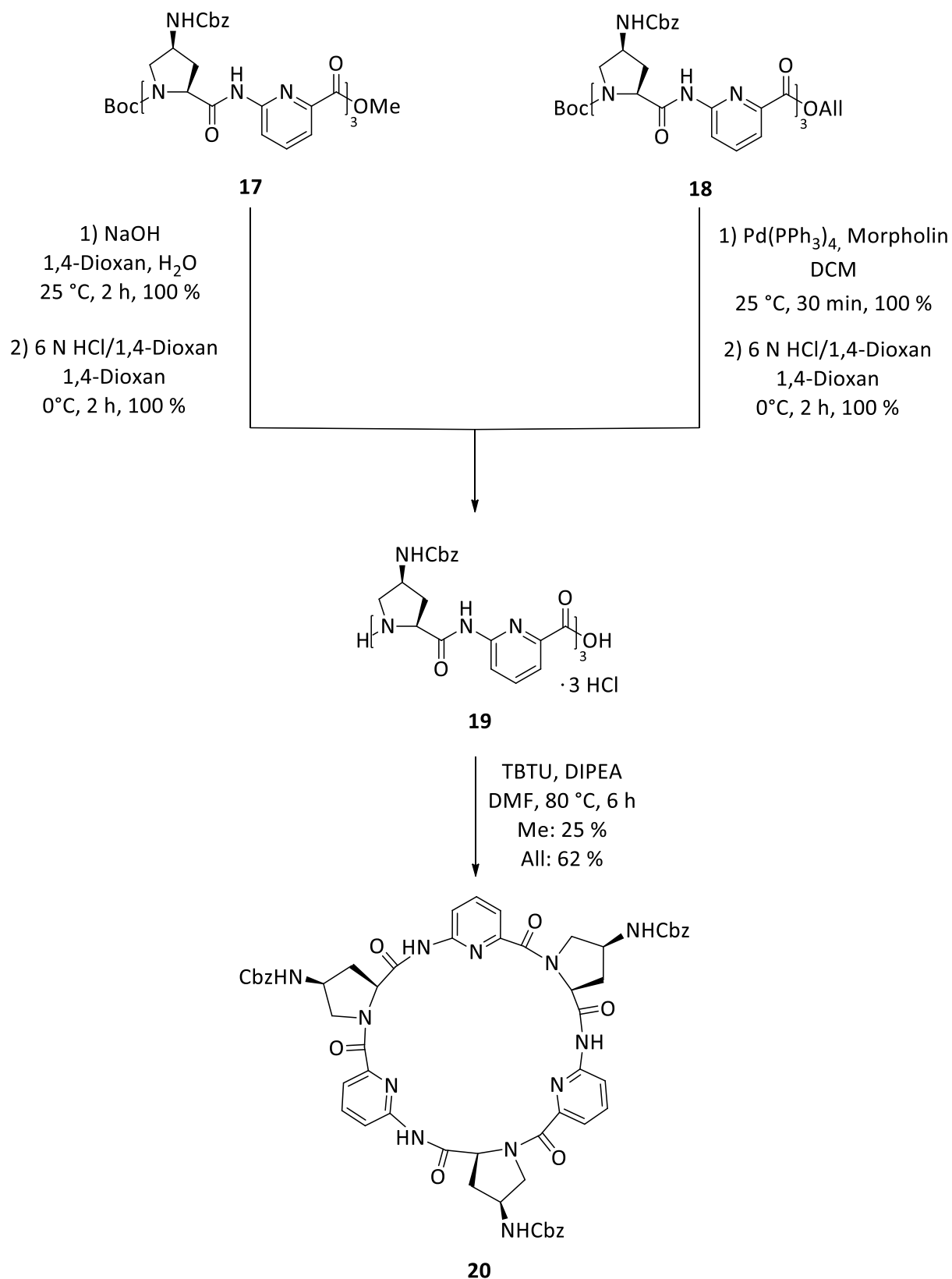


Schema 4: Synthese der linearen Tetrapeptide **15** bzw. **16**

Dazu wurden äquivalente Mengen der Dipeptide jeweils N-terminal unter sauren Bedingungen und C-terminal im Falle des Methylesters basisch oder im Falle des Allylesters unter Palladium(0)-Katalyse entschützt. Die erhaltenen Produkte wurden anschließend mit *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) als Kupplungsreagenz umgesetzt.

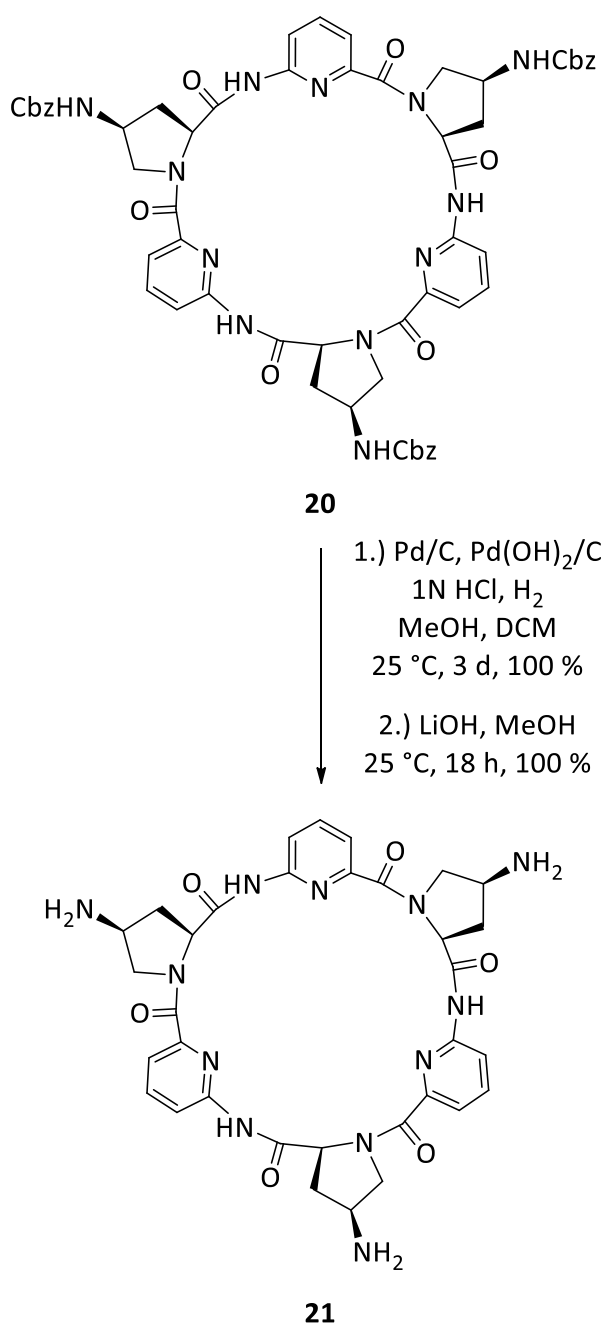
Während die Entschützungen durchgehend quantitativ verliefen, wiesen die Kupplungsreaktionen zu den Tetrapeptiden signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer Ausbeuten auf. So wurde der Allylester **16** mit quantitativer Ausbeute isoliert, während der Methylester **15** lediglich mit 52 %-iger Ausbeute anfiel. Dieser Trend setzt sich bei der Synthese der linearen Hexapeptide weiter fort. Analog zur Darstellung der Tetrapeptide wurden **15** bzw. **16** C-terminal entschützt und die jeweils entsprechenden Dipeptide N-terminal. Die erhaltenen Zwischenprodukte wurden mit TBTU zu den jeweiligen Hexapeptiden gekuppelt, wobei das Hexapeptid **17** mit Methylschutzgruppe in 62 % Ausbeute erhalten wurde, **18** mit der Allylschutzgruppe in quantitativer Ausbeute.

Nachdem die linearen Vorläufer für das benötigte Cyclopeptid erfolgreich dargestellt wurden, wurden sie jeweils zuerst am C-Terminus und nachfolgend am N-Terminus entschützt und anschließend unter Pseudohochverdünnung bei 80 °C unter Verwendung einer Spritzenpumpe cyclisiert. Auch im Schritt der Cyclisierung unterschieden sich die Ausbeuten deutlich. So konnte das Cyclopeptid **20** ausgehend vom Methylester lediglich in 25 % Ausbeute erhalten werden, wohingegen ausgehend vom Allylester eine Ausbeute von 62 % erreicht wurde (Schema 5).



Schema 5: Darstellung des CPs 20

Zur weiteren Funktionalisierung des CPs war es notwendig, dieses an den drei Aminogruppen zu entschützen. Dies gelang am besten unter Verwendung eines Zwei-Komponenten Katalysatorsystems, das aus gleichen Mengen 10 % Pd/C und 20 % Pd(OH)₂/C bestand. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Hydrogenolyse bei 1 atm unter Zugabe von drei Äquivalenten Salzsäure, wodurch das CP zunächst als Trihydrochlorid anfiel. Dieses wurde abschließend mit Lithiumhydroxid in das entsprechende Triamin überführt (Schema 6).



Schema 6: Darstellung des CP-Triamins **21**

Diskussion der synthetischen Ergebnisse

Für die Darstellung des benötigten CP-Triamins **21** wurden zwei Synthesewege getestet, die sich in der Art der Schutzgruppe am C-Terminus unterschieden. Dabei erschien die Wahl des Methylesters zunächst attraktiver, da aus vorangegangenen Arbeiten bekannt war, dass der 6-Aminopicolinsäuremethylester schneller und in höheren Ausbeuten als der entsprechende Allylester zugänglich ist. Darüber hinaus können Methylester einfach, unter basischen Bedingungen gespalten werden, wohingegen zur Abspaltung der Allylgruppe metallhaltige Katalysatoren zum Einsatz kommen müssen und eine Schutzgasatmosphäre nötig ist. Die Verwendung des Allylester wurde entsprechend erst erwogen, als sich zeigte, dass bei Verwendung der Methylester unerwartet niedrige Ausbeuten resultierten. Der Vergleich beider Synthesestrategien ergab folgende Unterschiede.

6-Aminopicolinsäuremethylester **2** wurde in einer säurekatalysierten Veresterungsreaktion in einer guten Ausbeute von 81 % erhalten. Im Vergleich dazu fiel die Ausbeute des 6-Aminopicolinsäureallylester **3** mit lediglich 50 % moderat aus. Gründe für die recht gering ausfallende Ausbeute bei der Synthese von **3** waren zum einen, dass bei der Reaktion kein vollständiger Umsatz erzielt wurde und zum anderen, dass sie mit der Bildung von nicht näher charakterisierten Nebenprodukten verbunden war. Versuche, die Reaktion zu optimieren, beinhalteten die Variation der Reaktionsdauer, der Temperatur oder die Art der Base. Außerdem wurde auch die Verwendung frisch destillierten Allylbromids oder DMF getestet. In keinem Fall konnte jedoch eine Ausbeute von über 50 % erzielt werden. Andere Strategien, wie beispielsweise die Darstellung des Allylesters unter Verwendung von Kupplungsreagenzien oder unter Säurekatalyse, brachten ebenfalls keine Verbesserung. Zumeist wurden sogar wesentlich schlechtere Ausbeuten erzielt, sodass letztendlich der ersten Methode der Vorzug gegeben wurde.

Die Darstellung des Prolinbausteins **9** gelang mit literaturbekannten Methoden und lieferte über alle Stufen hinweg sehr gute Ausbeuten, sodass das Produkt am Ende der fünf-stufigen Sequenz in einer Gesamtausbeute von 66 % isoliert wurde.

Ausgehend von den beiden Grundbausteinen lieferten die Dipeptidsynthesen weitestgehend analoge Ausbeuten um 80 %, unabhängig davon, ob der Methyl- oder der Allylester der 6-

Aminopicolinsäure Verwendung fand. Die lange Reaktionszeit von sieben Tagen ebenso wie der Einsatz von PyCloP als Kupplungsreagenz sind essenziell und lassen sich durch die geringe Nucleophilie der Aminogruppe von **2** bzw. **3** erklären. Die Verwendung des aromatischenamins auf der Stufe der Synthese des Dipeptids ist sinnvoll, da so im weiteren Verlauf der Synthese alle nachfolgenden Kupplungen mit der wesentlich reaktiveren aliphatischen Aminogruppe am Prolinbaustein erfolgen können.

Unterschiede bei der Verwendung von Methyl- oder Allylester-geschützten Peptiden traten erstmals bei der Darstellung der Tetrapeptide auf und setzten sich über die Hexapeptide bis hin zu den Cyclopeptiden fort. Obwohl bei allen Entschützungen stets vollständiger Umsatz beobachtet wurde und die jeweiligen entschützten Derivate quantitativ isoliert wurden, lieferten die Kupplungsreaktionen in Abhängigkeit der ursprünglich verwendeten Ester deutlich unterschiedliche Ausbeuten. Der Vergleich in Tabelle 5 macht deutlich, dass bis zu 48 % bessere Ausbeuten erzielt werden konnten, wenn Allylester in der Synthese verwendet wurden. Eine Erklärung für diese überraschende Beobachtung wurde im Zuge der Untersuchungen nicht gefunden. Möglicherweise sind jedoch Verunreinigungen in den Zwischenprodukten hierfür verantwortlich.

Tabelle 5: Ausbeute der Tetra-, Hexa- und des Cyclopeptids in Abhängigkeit des verwendeten Esters

Verwendeter Ester in den geschützten Peptiden	Ausbeute der Kupplung zum		
	Tetrapeptid	Hexapeptid	Cyclopeptid
Methyl	52 %	62 %	25 %
Allyl	100 %	100 %	62 %

Diese Ergebnisse waren reproduzierbar und führten zu dem Schluss, dass aufgrund der signifikant höheren Ausbeuten, insbesondere auf der Stufe des CPs, die Verwendung von Allylestern zielführender war, wodurch dieser Vorgehensweise letztlich der Vorzug gegeben wurde.

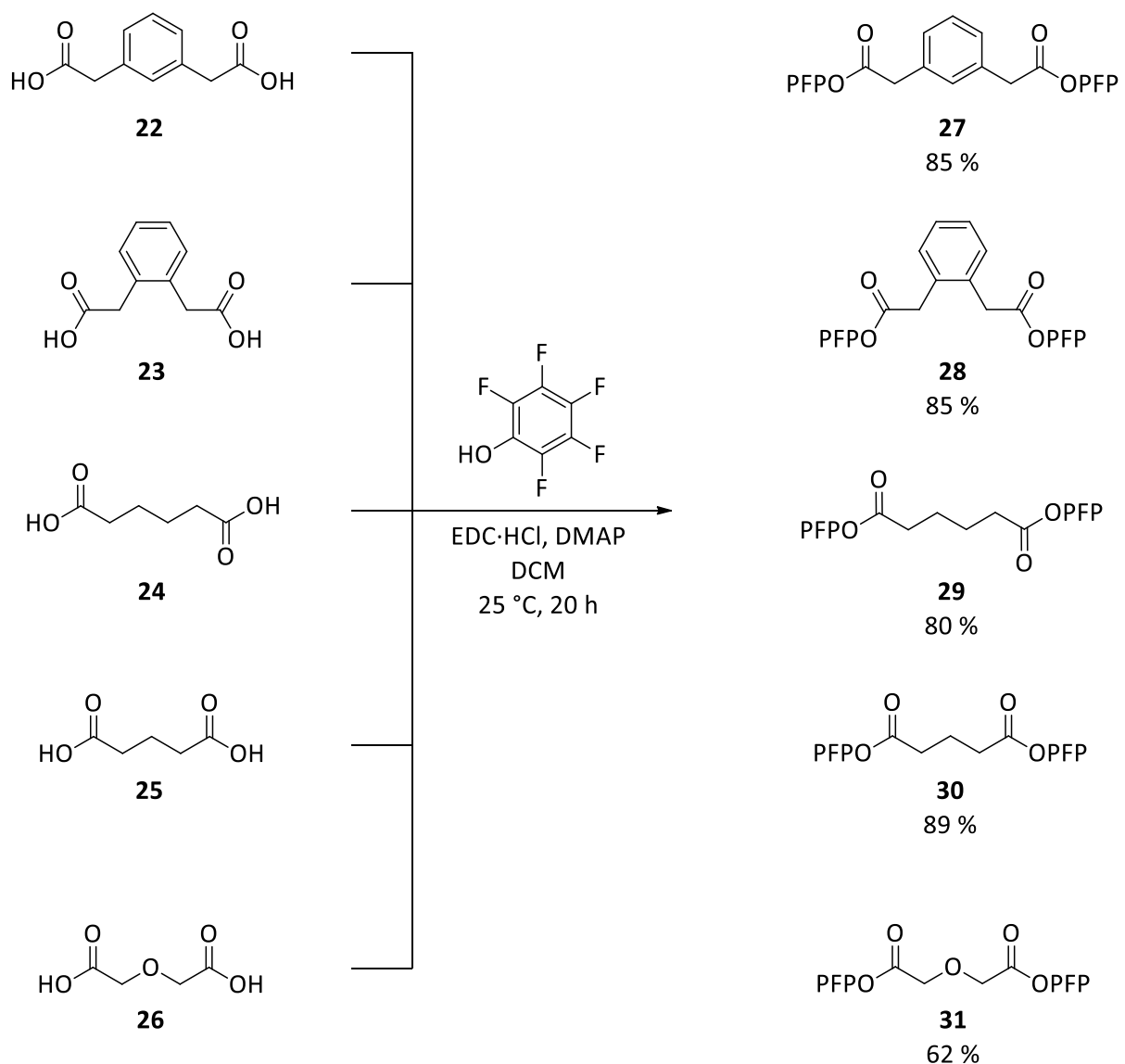
Die Ausbeute des Cyclopeptids **20** wurde durch Modifikation der Reaktionsbedingungen von den in vergangenen Arbeiten erreichten 34 % auf 62 % deutlich verbessert, was in Anbetracht des hohen Syntheseaufwands sehr vorteilhaft ist.

Für die Entfernung der Cbz-Schutzgruppen unter Wasserstoffatmosphäre waren signifikante Mengen zweier Palladiumkatalysatoren notwendig. Bei einer Verringerung der Katalysatormenge oder der Verwendung nur eines Katalysators wurde jedoch entweder keine vollständige Entschützung erreicht oder es waren sehr lange Reaktionszeiten von mehr als zehn Tagen notwendig.

2.3.1.3 Darstellung der Linker

Synthetische Ergebnisse

Zur Verbrückung der beiden Cyclopeptiduntereinheiten wurden geeignete Dicarbonsäuren in Form ihrer Aktivester benötigt. Hierfür wurden die Bis(pentafluorphenol)ester von 1,3-Phenylendiessigsäure **22**, 1,2-Phenylendiessigsäure **23**, Adipinsäure **24**, Glutarsäure **25** und Diglycolsäure **26** dargestellt (Schema 7).



Schema 7: Darstellung der verwendeten Bis(pentafluorphenol)ester **27 - 31**

Alle Dicarbonsäuren wurden unter Steglich-Bedingungen mit Pentafluorphenol umgesetzt. Die Produkte fielen in Ausbeuten zwischen 80 und 90 % an. Lediglich der Aktivester der Diglycolsäure wurde in einer etwas geringeren Ausbeute von 62 % isoliert.

Diskussion der synthetischen Ergebnisse

Die Auswahl der Linker wurde zum Teil basierend auf vorangegangenen Arbeiten getroffen, in denen einfach verbrückte BCPs mit 1,3-Phenylendiessigsäure **22**, 1,2-Phenylendiessigsäure **23** oder auch Adipinsäure **24** untersucht wurden. Glutarsäure **25** sowie Diglycolsäure **26** wurden verwendet, um Dicarbonsäuren mit einem geringeren Abstand der beiden Carboxylatgruppen als in den bislang verwendeten Linkern in die Untersuchungen einzubeziehen. Die jeweiligen Aktivester wurden ausgehend von den entsprechenden Dicarbonsäuren und Pentafluorphenol mit EDC als Kupplungsreagenz und unter dem Einfluss katalytischer Mengen DMAP erhalten. Die Aufarbeitung erfolgte extraktiv und mittels Säulenchromatographie. Auf diese Weise wurden alle Aktivester in zufriedenstellenden Ausbeuten isoliert.

2.3.1.4 Voruntersuchungen zur Darstellung von dreifach verbrückten Bis(cyclopeptiden)

Testreaktionen im analytischen Maßstab

Im nächsten Schritt wurden geeignete Reaktionsbedingungen für die Synthese der geplanten BCPs ausgehend von den vorliegenden Komponenten identifiziert. Während dieser Synthese müssen sechs Amidbindungen in einem Schritt auf korrekte Weise gebildet werden. Aufgrund der Multifunktionalität von **21** können bei Verwendung dieses CPs und den Aktivestern aber selbst bei richtigem 2:3 Verhältnis der Komponenten zahlreiche Produkte entstehen, beispielsweise falsch verknüpfte Dimere, Oligomere oder Polymere (Abbildung 18). Hinzu kommt, dass es sich bei der Bildung von Amidien um eine irreversible Reaktion handelt, sodass die Bildung eines fehlerhaft verknüpften Produkts nicht mehr korrigiert werden kann.

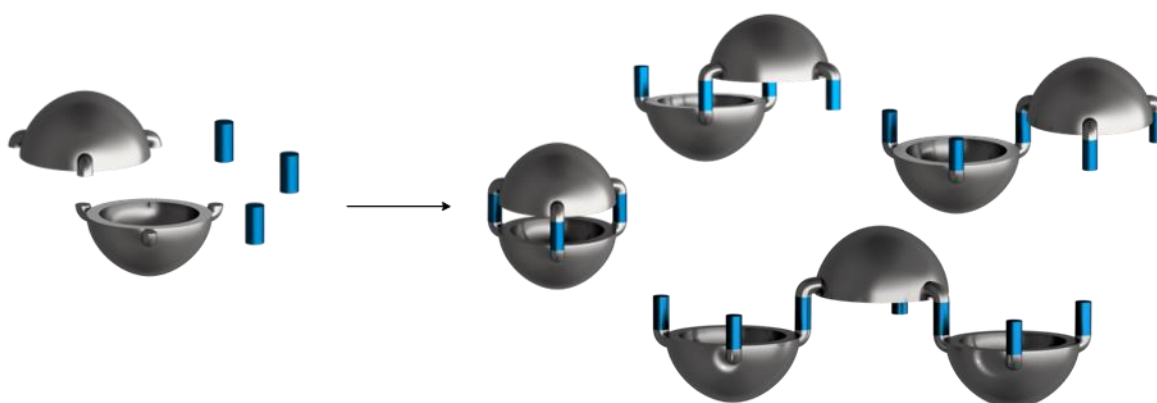


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Reaktion dreier Linker mit zwei Cyclopeptidtriaminen zu einem dreifach verbrückten BCP sowie möglichen Nebenprodukten

Bei der gewählten Synthesestrategie kann also ein komplexes Produktgemisch entstehen und die Ausbeute des gewünschten Produkts somit niedrig sein. Die Reaktionsbedingungen sollten diesem Aspekt Rechnung tragen und so gewählt werden, dass eine möglichst selektive Produktbildung gewährleistet ist. So wurde angenommen, dass geeignete Template einen positiven Einfluss auf die BCP-Bildung haben könnten. In diesem Zusammenhang war die Fähigkeit der Cyclopeptide, mit Anionen 2:1 Komplexe zu bilden, von Vorteil. Diese Komplexbildung sollte es erlauben, zwei Cyclopeptide durch ein geeignetes Anion in einer für

die Produktbildung günstigen Orientierung vorzuorganisieren. (Abbildung 19). Dieser kinetische Templateffekt sollte also die Wahrscheinlichkeit der BCP-Bildung erhöhen und die der Bildung unerwünschter Nebenprodukte verringern.

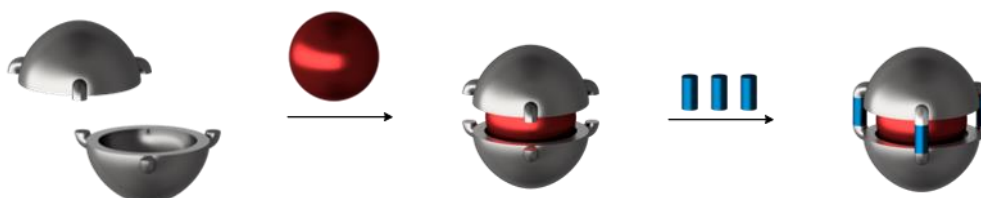


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Bildung eines dreifach verbrückten BCPs unter Nutzung eines Templateffekts.

Um zu überprüfen, ob ein geeignetes Anion einen Templateffekt auf die BCP-Bildung ausüben kann, wurden ^1H -NMR-spektroskopische Bindungsstudien durchgeführt, mit denen evaluiert wurde, ob es unter den für die Reaktion von **21** mit den Aktivestern notwendigen Reaktionsbedingungen zur Bildung eines Sandwichkomplexes kommt. Aufgrund der Reaktivität der Aktivester war die Reaktion bei Raumtemperatur möglich, was für die Komplexbildung günstig ist. Allerdings musste sie aufgrund der Löslichkeit von **21** in einem aprotischen Lösungsmittel stattfinden, vorzugsweise in N,N'-Dimethylformamid. In diesem Lösungsmittel wurden zuvor keinerlei Bindungsstudien durchgeführt, sodass entsprechend zunächst der Effekt von Tetramethylammoniumchlorid und-sulfat auf das ^1H -NMR-Spektrum des unsubstituierten Analogons von **21**, Cyclopeptid **R1**, in DMF- d_7 untersucht wurde.

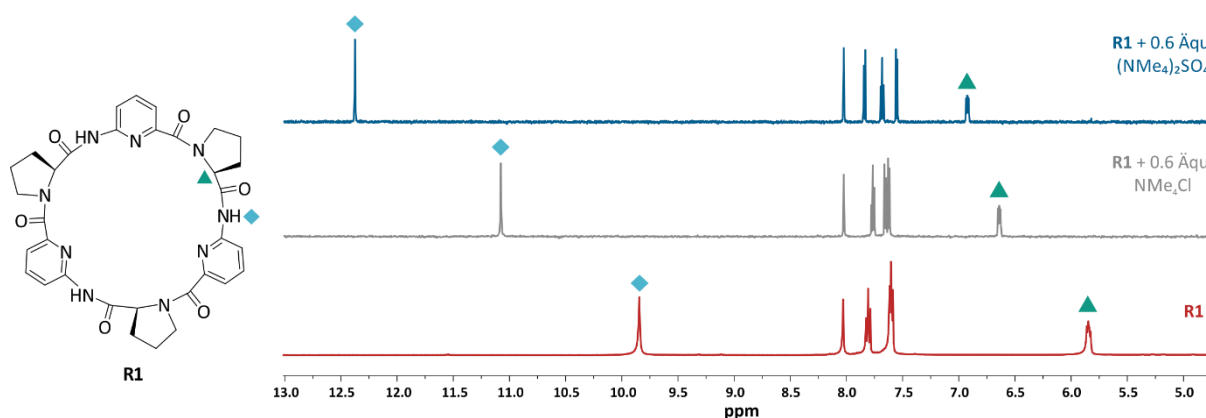
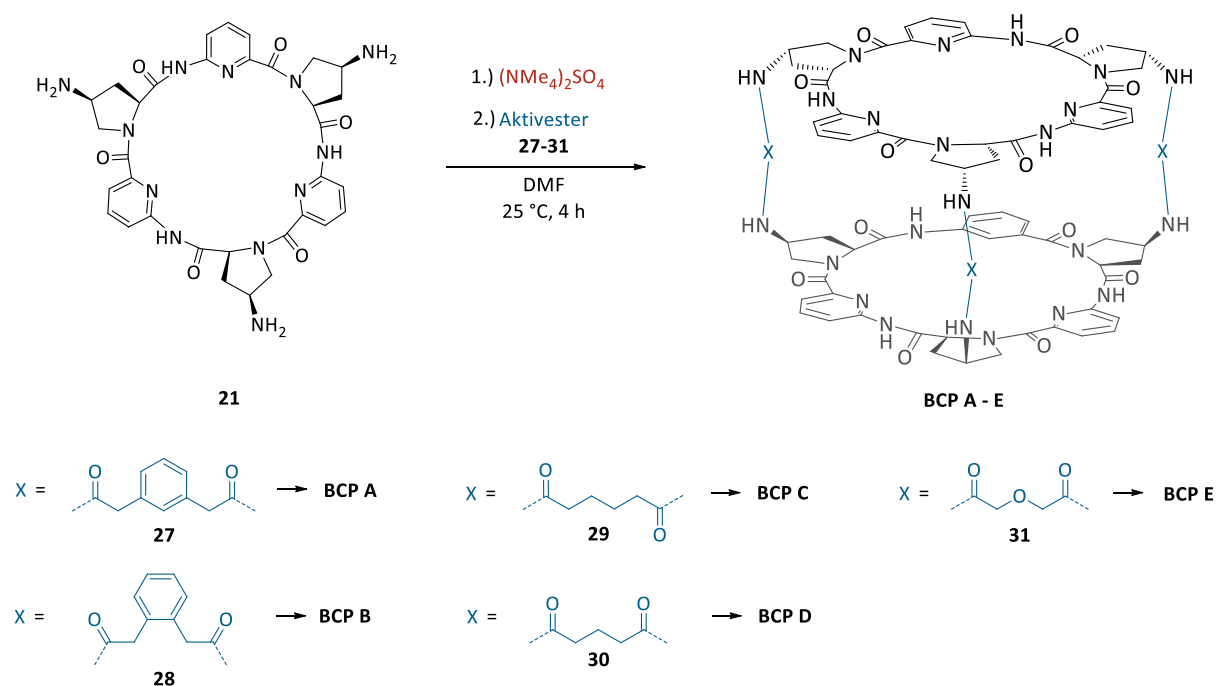


Abbildung 20: ^1H -NMR-Spektren von **R1** und von **R1** (1 mM) nach Zugabe von 0.6 Äqu. NMe_4Cl bzw. 0.6 Äqu. $(\text{NMe}_4)_2\text{SO}_4$ (600 MHz, 25 °C, DMF- d_7)

Aus den Spektren (Abbildung 20) geht hervor, dass in Gegenwart beider Salze eine Tieffeldverschiebung der Signale der Prolin-C α -Protonen (\blacktriangle) und der Amidprotonen (\blacklozenge) erfolgt. Beide Effekte sind typisch für die Wechselwirkung von **R1** und damit verwandter CPs mit Anionen. Sie sind auf die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Anionen und den Peptid-NH-Gruppen zurückzuführen beziehungsweise auf die Entschirmung der Prolin-C α -Protonen, wenn in deren räumlicher Nähe das Anion gebunden wird. Dieses Ergebnis lässt also den Schluss zu, dass auch in DMF eine Anionenbindung erfolgt. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass es zur Bildung von Sandwichkomplexen kommt, da der Zusatz von 0.6 Äquivalenten der Salze bereits den maximalen Effekt in den Spektren verursachte und die Erhöhung der Salzkonzentration zu keinen weiteren Veränderungen in den Spektren führte.

Auf Basis dieses Ergebnisses wurden erste Versuche zur BCP-Synthese durchgeführt (Schema 8). Hierbei wurde der 1,3-Phenylendiessigsäureester **27** verwendet, da der von dieser Dicarbonsäure abgeleitete Linker in einem einfach verbrückten BCP zu einer hohen Anionenaffinität führte.^[30] Als Templat wurde Tetramethylammoniumsulfat gewählt, da Sulfat typischerweise stärker an die CPs bindet als Chlorid.



Schema 8: Allgemeines Reaktionsschema zur BCP Synthese mit Templat

In einem ersten Versuch wurde **21** in DMF (0.76 mM) gelöst, mit 0.5 Äquivalent $(\text{NMe}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt und anschließend langsam **27** zugetropft, um die Konzentration des Linkers stets niedrig zu halten und somit die Bildung von Nebenprodukten zu verringern.

Bei der Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie wurde erwartungsgemäß die Bildung von Pentafluorphenol nachgewiesen sowie die Bildung weiterer Produkte. Die Analyse des Reaktionsgemischs mit MALDI-Massenspektrometrie lieferte ein Spektrum, in dem lediglich zwei Signale bei m/z -Verhältnissen von 1874.21 und 1890.22 zu beobachten sind (Abbildung 21). Diese Signale sind dem Lithium- beziehungsweise dem Natriumaddukt des gewünschten BCPs zuzuordnen. Das Fehlen von Signalen des Edukts spricht für einen vollständigen Umsatz.

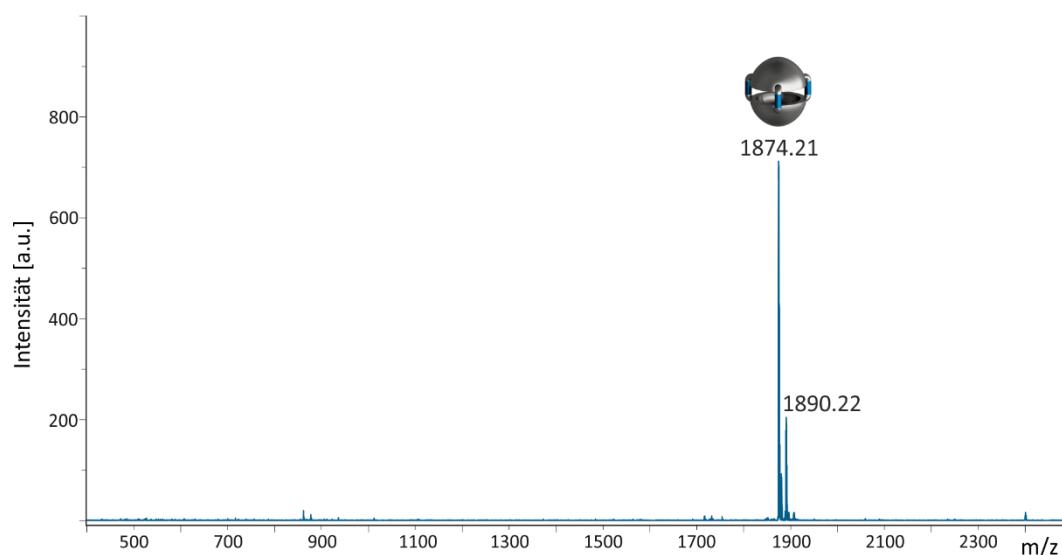


Abbildung 21: MALDI-TOF Massenspektrum der Reaktion von **21** mit **27** in Gegenwart von 0.5 Äqu. $(\text{NMe}_4)_2\text{SO}_4$

Um zu analysieren, ob das Reaktionsgemisch auch Produkte enthielt, die nicht massenspektrometrisch nachweisbar waren oder tatsächlich nur das gewünschte Produkt, wurde es zudem mittels analytischer HPLC untersucht.

Hierzu wurde das Reaktionsgemisch zur Trockne eingeeengt, der Rückstand mit Diethylether gewaschen, um das gebildete Pentafluorphenol zu entfernen und der verbleibende Feststoff erneut gelöst und untersucht. Dabei wurde das in Abbildung 22 gezeigte Chromatogramm erhalten, welches zwei deutlich voneinander separierte Peaks bei knapp 26 und 41 min enthält und damit belegt, dass während der Reaktion ein Produktgemisch entstanden ist.

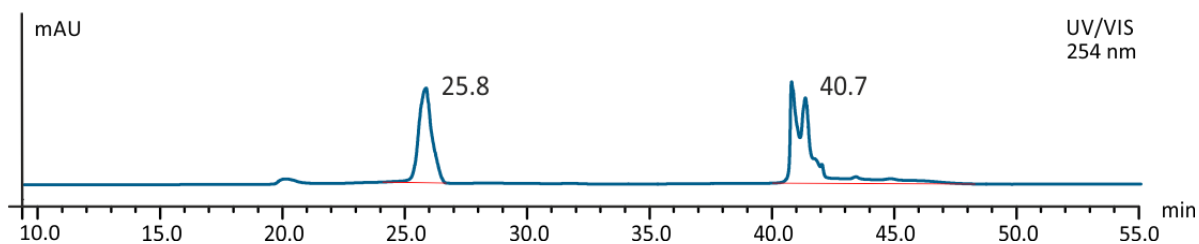


Abbildung 22: HPLC-Spektrum der Reaktion von **21** mit **27** in Gegenwart von 0.5 Äqu. $(NMe_4)_2SO_4$

Durch das Einsammeln der entsprechenden Fraktionen und einer erneuten Untersuchung dieser Lösungen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnte das Signal bei kleinerer Retentionszeit dem gewünschten dreifach verbrückten **BCP A** zugeordnet werden. Das zweite stark verbreiterte, strukturierte Signal hingegen konnte mit Hilfe der Massenspektrometrie keiner niedermolekularen Verbindung mit einem m/z -Verhältnis < 3000 zugeordnet werden. Unter der Annahme, dass das gewünschte Produkt und die Nebenprodukte ähnliche Extinktionskoeffizienten aufweisen, wurde aus den Flächen der Signale im Chromatogramm das Produktverhältnis abgeschätzt. Der Anteil von **BCP A** betrug dabei 40 %, der der Nebenprodukte entsprechend 60 %.

Zur Überprüfung des Einflusses von Sulfat auf das Produktspektrum wurde eine zweite Testreaktion unter analogen Bedingungen durchgeführt, bei der jedoch auf die Zugabe des Sulfatsalzes verzichtet wurde. Die massenspektrometrische Analyse des Reaktionsgemischs lieferte in diesem Fall das in Abbildung 23 gezeigte Spektrum.

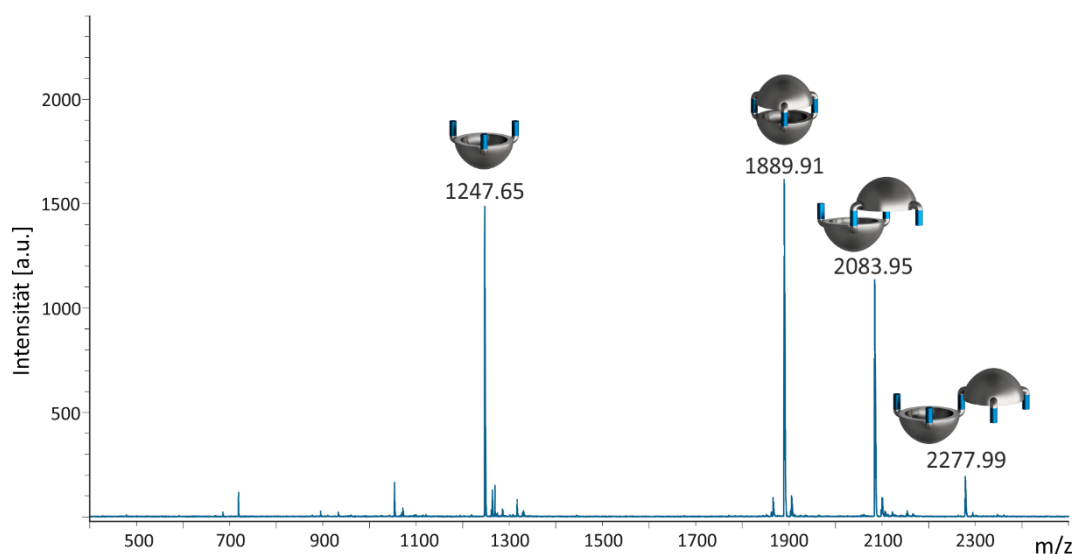


Abbildung 23: MALDI-TOF Massenspektrum der Reaktion von **21** mit **27** in Abwesenheit von $(NMe_4)_2SO_4$

Auch in diesem Spektrum wurde das Signal des gewünschten Produkts detektiert und ein Signal des Edukts war nicht erkennbar. Jedoch traten bei der BCP-Synthese ohne Templatsalz weitere Signale auf, die unvollständig verbrückten Derivaten zugeordnet wurden.

Ausgehend von diesen Voruntersuchungen wurde getestet, ob sich auch die anderen Aktivester für die Synthese von BCPs eignen. Dazu wurden weitere Testreaktionen durchgeführt, in denen **21** mit den vier Linkern **28 – 31** unter den zuvor erarbeiteten Synthesebedingungen umgesetzt wurde (vgl. Schema 8). Diese Untersuchungen wurden unter meiner Anleitung gemeinsam mit Manuela Zouatom im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.^[52]

Alle jeweils erhaltenen Reaktionsmischungen wurden massenspektrometrisch (vgl. Anhang Abbildung 93 – Abbildung 96) und mittels analytischer HPLC (vgl. Anhang Abbildung 97) untersucht. Dabei wurden ähnliche Beobachtungen gemacht wie bei der Umsetzung mit **27**. So zeigten alle Massenspektren den vollständigen Umsatz des Edukts und sie enthielten Signale für die jeweils gewünschten dreifach verbrückten BCPs. Ebenso waren sich alle erhalten HPLC-Chromatogramme sehr ähnlich und enthielten jeweils zwei separierte Peaks. Einer konnte massenspektrometrisch dem gewünschten Produkt zugeordnet werden, während das Nebenprodukt, das in allen Fällen bei einer Retentionszeit von etwa 41 min eluierte, mittels MALDI-TOF strukturell nicht genauer charakterisiert werden konnte. Die Verhältnisse der Flächen beider Peaks in diesen Chromatogrammen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Prozentuale Verhältnisse der Flächen für BCPs und Nebenprodukte in den HPLC-Chromatogrammen

Verbindung	Anteil BCP [%]	Anteil Nebenprodukte [%]
BCP A	40	60
BCP B	55	45
BCP C	39	61
BCP D	43	57
BCP E	48	52

Tabelle 6 zeigt, dass die Anteile der BCPs in den Reaktionsgemischen zwischen 39 und 55 % variierten und die der Nebenprodukte entsprechend zwischen 61 und 45 % lagen.

Diskussion der Testreaktionen zur Darstellung von dreifach verbrückten Bis(cyclopeptiden) im analytischen Maßstab

Die eingangs durchgeführten Bindungsstudien zeigten, dass eine Modellverbindung für das CP-Triamin **21** in DMF sowohl mit Chlorid- als auch mit Sulfationen wechselwirkt. Dabei wurde ein maximaler Effekt der CP-Signalverschiebungen bereits bei Zugabe von 0.6 Äquivalenten des jeweiligen Salzes beobachtet, was Hinweise darauf lieferte, dass das CP auch in dem für die Amidkupplungen benötigten Lösungsmittel Sandwichkomplexe mit Anionen bildet. Darum erschien es vielversprechend, die BCP-Synthesen unter dem Templateffekt von Anionen durchzuführen. Da Sulfat zumeist die stabilsten Komplexe bildet, wurde dieses Anion als Templat gewählt. Der Vergleich einer BCP-Synthese in Abwesenheit und in Anwesenheit von Natriumsulfat belegte den günstigen Einfluss des Templats auf die Produktbildung.

Die Testreaktionen im μmol -Maßstab zeigten, dass alle untersuchten Linker **27** – **31** unter den gewählten Reaktionsbedingungen die gewünschten BCPs lieferten, unabhängig von ihrer Flexibilität oder dem Abstand zwischen den beiden Carboxylatgruppen. Neben den gewünschten Produkten entstanden in allen Reaktionen aber zusätzlich erhebliche Mengen strukturell nicht näher charakterisierter Nebenprodukte. Da diese Verbindungen keine Signale in den Massenspektren lieferten und sehr breite Peaks in den Chromatogrammen verursachten, könnte es sich dabei um polymere Produkte handeln, die aus einer unkontrollierten Reaktion der Edukte hervorgehen. Laut HPLC betrug der Anteil dieser Verbindungen in den Reaktionsmischungen unabhängig von der Struktur des eingesetzten Aktivesters circa 50 %. Eine Korrelation zwischen Linkerstruktur und dem Anteil des gewünschten BCPs in dem Reaktionsgemisch wurde somit nicht gefunden.

Dreifach verbrückte BCPs können demnach unter den gefundenen Reaktionsbedingungen dargestellt werden. Die Isolierung erfordert aber die Abtrennung der ebenfalls gebildeten Nebenprodukte.

2.3.1.5 Darstellung von BCP A

Synthese und Isolierung

Da alle getesteten Aktivester in den Voruntersuchungen zu dreifach verbrückten BCPs führten und eine direkte Korrelation zwischen der Struktur des Linkers und der Effizienz der Synthese nicht erkennbar war, wurde der Linker **27** für die Darstellung eines BCPs im präparativen Maßstab ausgewählt, da das entsprechende einfach verbrückte Analogon die höchste bislang beobachtete Anionenaffinität derartiger BCPs aufwies. Zudem legten quantenchemische Rechnungen nahe, dass die beiden CP-Ringe in **BCP A** bei Sulfatbindung eine Konformation annehmen können (Abbildung 24), die der in der zuvor experimentell ermittelten Kristallstruktur des Sandwichkomplexes von **R1** mit Iodid sehr nahe kommt. Der Käfig weist näherungsweise ein C_3 symmetrische Struktur auf, bei der die Linker von der Kavität weg weisen. Darüber hinaus wurden in der berechneten Struktur sechs Wasserstoffbrücken zwischen den NH-Gruppen der Cyclopeptide und den Sauerstoffatomen des Anions gefunden.

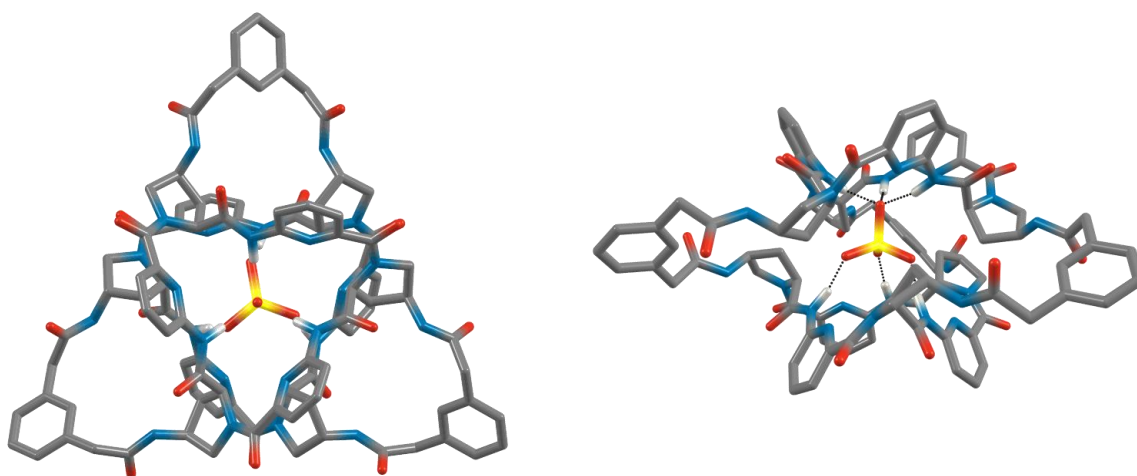


Abbildung 24: Berechnete Struktur des Sulfatkomplexes von **BCP A** (B3LYP/6-31G*) aus verschiedenen Perspektiven. Wasserstoffatome, welche nicht an der Bindung des Anions beteiligt sind, wurden zur besseren Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

Es zeigte sich, dass die für die Synthese von **BCP A** im analytischen Maßstab gefundenen Bedingungen auf den präparativen Maßstab übertragen werden konnten. Die massenspektrometrische Untersuchung und die HPLC-Analyse der Reaktionsmischung belegten eindeutig die Bildung des erwarteten Produkts. Die Aufarbeitung und Isolierung des

Produkts gestalteten sich jedoch schwierig. Erste Versuche zur Aufreinigung von **BCP A** orientierten sich an im Arbeitskreis etablierten Vorgehensweisen, bei denen zur Vorreinigung zunächst eine Kieselgel-Säulenchromatographie durchgeführt und anschließend mittels RP-Säulenchromatographie oder semi-präparativer HPLC das reine Produkt isoliert wird. Die ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchung des so erhaltenen Feststoffs zeigte, dass auf diese Weise ein Produktgemisch erhalten wurde. So enthielt das ^1H -NMR-Spektrum eine Vielzahl von Signalen. Versetzte man die Probe jedoch mit $(\text{NMe}_4)_2\text{SO}_4$, so vereinfachte sich das Spektrum deutlich zu einem einfachen Signalsatz, der dem für das gewünschte Produkt erwarteten entsprach (Abbildung 25).

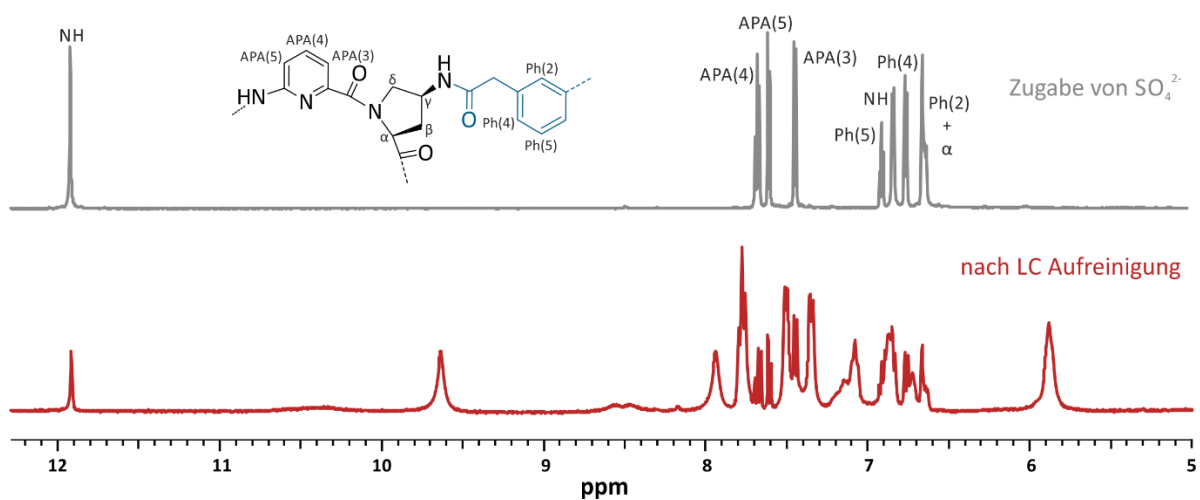


Abbildung 25: Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums des bei dem Versuch der präparativen Synthese von **BCP A** nach chromatographischer Aufreinigung erhaltenen Feststoffs und ^1H -NMR-Spektrum nach Zugabe von $(\text{NMe}_4)_2\text{SO}_4$ (400 MHz, 25 °C, DMSO-d_6)

Dieses Experiment zeigte, dass das isolierte Produkt, **BCP A** zwar als konstitutionell einheitliche Verbindung enthielt, daneben aber auch vermutlich verschiedene Salze als Verunreinigungen, die chromatographisch nicht abgetrennt werden konnten und deren Anionen wahrscheinlich von dem BCP komplexiert wurden. Daher konzentrierten sich die folgenden Aufreinigungsversuche auf die Isolierung des Sulfatkomplexes. Hierzu wurde dem Laufmittel bei der RP-chromatographischen Aufreinigung Natriumsulfat zugesetzt. Auf diese Weise konnte zwar der Sulfatkomplex isoliert werden, nicht aber in analysenreiner Form. Folgende weitere Verfahren wurden getestet, um **BCP A** in salzfreier Form oder als Komplex analysenrein zu isolieren:

- Präparative HPLC mit RP-Säulen
- Präparative HPLC mit HILIC-Säulen
- Präparative DC
- Größenausschlusschromatographie
- Zusatz von Additiven zu den Elutionsmitteln
- Waschen des isolierten Feststoffs mit Wasser zur Entfernung von überschüssigen Salzen
- Ausfällen von Sulfat mit Bariumsalzen
- Verwendung eines leichter entfernbaren Templats während der Synthese (z.B. Chlorid)

Keine der genannten Methoden führte jedoch zu einem für die Bindungsstudien ausreichend reinen Produkt.

Diskussion der synthetischen Ergebnisse

Die Übertragung der Synthese von **BCP A** vom analytischen in den präparativen Maßstab war erfolgreich. Die Isolierung des Produkts in für Bindungsstudien ausreichender Reinheit gestaltete sich jedoch sehr schwierig. So konnte zwar konstitutionell einheitliches Produkt isoliert werden, nicht aber in einer salzfreien Form oder als einheitlicher Komplex definierter Zusammensetzung.

Das nach der chromatographischen Aufreinigung erhaltene Material lieferte ein komplexes ^1H -NMR-Spektrum, welches nicht unmittelbar dem Produkt zugeordnet werden konnte. Dieses Spektrum vereinfachte sich nach Zugabe eines Sulfatsalzes und war danach im Einklang mit dem Spektrum des C_3 -symmetrischen Sulfatkomplexes von **BCP A**. Die Komplexierung der im Überschuss vorhandenen Sulfatanionen in die Kavität von **BCP A** korreliert mit der hohen chemischen Verschiebung des Aminoprolin- C_α -H-Signals bei 6.7 ppm und des Signals der NH-Protonen bei 12.0 ppm (vgl. Abbildung 25). Beide Signale wurden auch im Spektrum des

erhaltenen Produktgemisches beobachtet, was zeigte, dass das BCP trotz der zweifachen, chromatographischen Aufreinigung noch immer teilweise als Sulfatkomplex vorlag. Daneben traten intensivere Signale der Aminoprolin-C α -Protonen und der NH-Protonen bei 5.90 ppm und 9.60 ppm auf. Diese könnten eventuell Protonen des unkomplexierten BCPs zugeordnet werden, die recht hohe chemische Verschiebung dieser Signale deutet aber an, dass es sich auch um einen weiteren Anionenkomplex handeln könnte, z.B. dem mit ubiquitär vorhandenen Chloridionen, die während der Aufarbeitung in den BCP Hohlraum aufgenommen wurden. Zusätzliche Signale im Spektrum weisen auf das Vorliegen weiterer Komplexe hin.

Diese Ergebnisse zeigen indirekt, dass **BCP A** eine hohe Anionenaffinität besitzt. Ein weiteres Argument hierfür ist, dass die verschiedenen Spezies im Produktgemisch in Lösung in einem langsamen Gleichgewicht stehen. Diese hohe Anionenaffinität ist wohl der Grund, warum sich die Aufreinigung des BCPs so schwierig gestaltete. Auch die Versuche **BCP A** stattdessen als Sulfatkomplex zu isolieren, führten leider nicht zum Erfolg, sodass diese Verbindung nicht analysenrein isoliert werden konnte.

2.3.1.6 Darstellung von BCP E

Synthese und Isolierung des Sulfatkomplexes von BCP E

Da die Isolierung von **BCP A** nicht gelang, wurde versucht, ein BCP mit einem anderen Linker im präparativen Maßstab zu synthetisieren und analysenrein zu erhalten. Die Wahl fiel auf Diglycolsäure, da vorangegangene Arbeiten gezeigt hatten, dass die Anionenaffinität von einfach verbrückten BCPs mit kürzeren Linkern meist höher war als die mit längeren.^[30,46,53] Außerdem erschien das zentrale Sauerstoffatom in diesem Linker günstig, da es potenzielle *gauche* Konformationen, die für die Verbrückung der beiden CP-Ringe wahrscheinlich notwendig sein könnten, begünstigt. Quantenchemische Rechnungen zeigten, dass tatsächlich Torsionswinkel an den C(=O)-CH₂-OCH₂ Bindungen von circa 60° möglich sind. Zudem führt die Überbrückung zweier Cyclopeptidringe mit Diglycolsäureeinheiten ebenfalls näherungsweise zu einer C₃ symmetrischen Struktur, bei der die Linker von der Kavität wegweisen und die beiden Cyclopeptidringe eine für die Anionenbindung geeignete Anordnung besitzen (Abbildung 26).

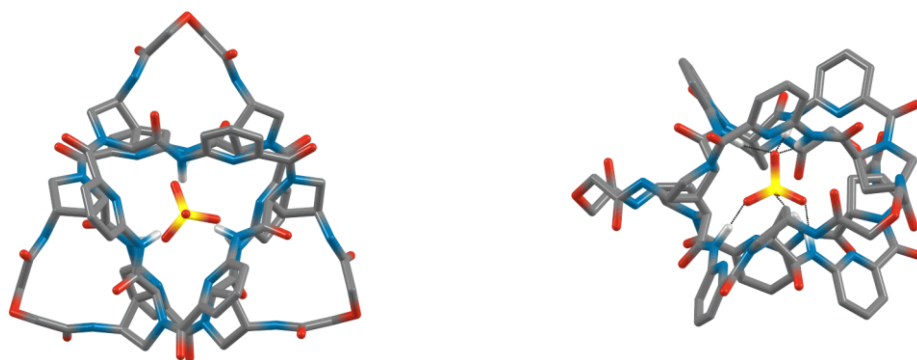
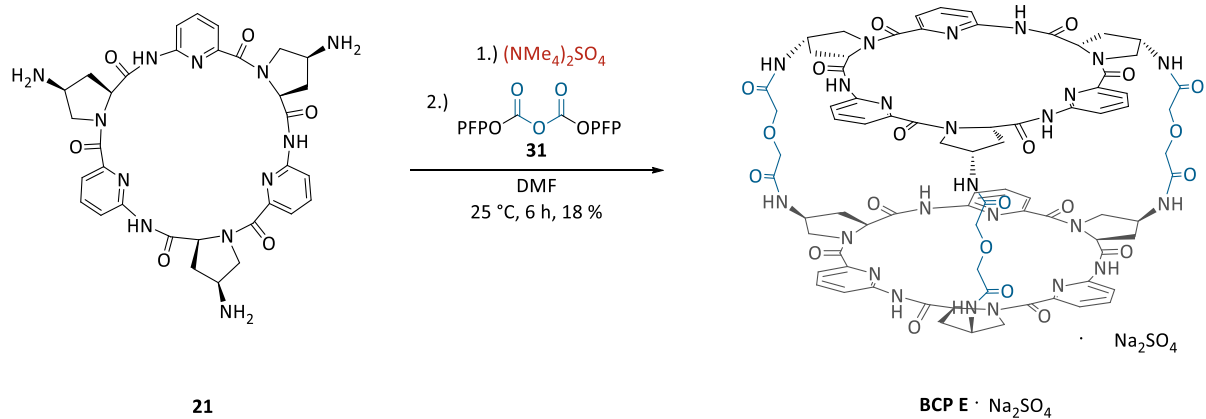


Abbildung 26 Berechnete Struktur des Sulfatkomplexes von **BCP E** (B3LYP/6-31G*) aus verschiedenen Perspektiven. Wasserstoffatome, welche nicht an der Bindung des Anions beteiligt sind, wurden zur besseren Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

Die für die Synthese von **BCP A** verwendeten Reaktionsbedingungen erwiesen sich auch für die Darstellung von **BCP E** als geeignet (Schema 9).



Schema 9: Darstellung von **BCP E · Na₂SO₄**

In diesem Fall gelang die Isolierung des Sulfatkomplexes von **BCP E** durch eine Kombination einer Kieselgel-Säulenchromatographie und einer anschließenden RP-Säulenchromatographie, bei der dem Laufmittel Natriumsulfat zugesetzt wurde. Um überschüssiges Natriumsulfat aus dem Rohprodukt zu entfernen, wurde der nach der RP-Säulenchromatographie erhaltene Feststoff zunächst gefriergetrocknet und anschließend in DCM/MeOH (1:1 (v/v)) suspendiert. Während **BCP E · Na₂SO₄** in Lösung ging, konnte in diesem organischen Lösungsmittelgemisch unlösliches Natriumsulfat mittels Zentrifugation entfernt werden. **BCP E · Na₂SO₄** wurde auf diese Weise analysenrein in einer Ausbeute von 18 % isoliert.

Dass es sich bei der isolierten Verbindung tatsächlich um den Sulfatkomplex handelte, wurde neben der Elementaranalyse auch ¹H-NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch bestätigt.

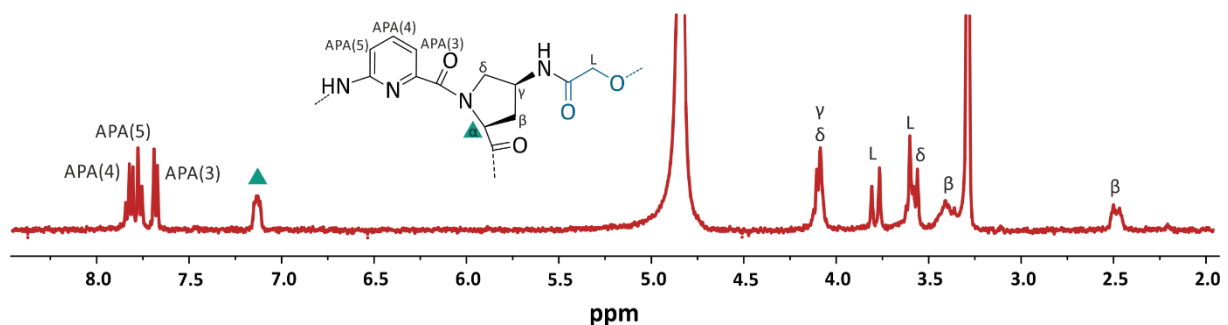


Abbildung 27: ¹H-NMR-Spektrum von **BCP E · Na₂SO₄** (400 MHz, 25 °C, 50 Vol.-% MeOD-*d*₄/D₂O)

So belegt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produkts (Abbildung 27) seine C_3 symmetrische Struktur. Die Signale der Aminoprolin- C_α -Protonen (\blacktriangle) treten im Spektrum bei 7.15 ppm auf und sind damit im Vergleich zu entsprechenden Signalen dieser Protonen in unkomplexierten BCPs, die typischerweise zwischen 5.50 und 6.00 ppm zu finden sind, deutlich entschirmt. Diese Entschirmung wird typischerweise bei Anionenbindung beobachtet und wird durch das in räumlicher Nähe gebundene Sulfation bedingt.

Im ESI-Massenspektrum von **BCP E** \cdot Na_2SO_4 (Abbildung 28) war im negativen Ionisierungsmodus nur ein Signal sichtbar, dessen m/z Verhältnis $[\text{BCP E} \cdot \text{SO}_4]^{2-}$ zugeordnet werden konnte.

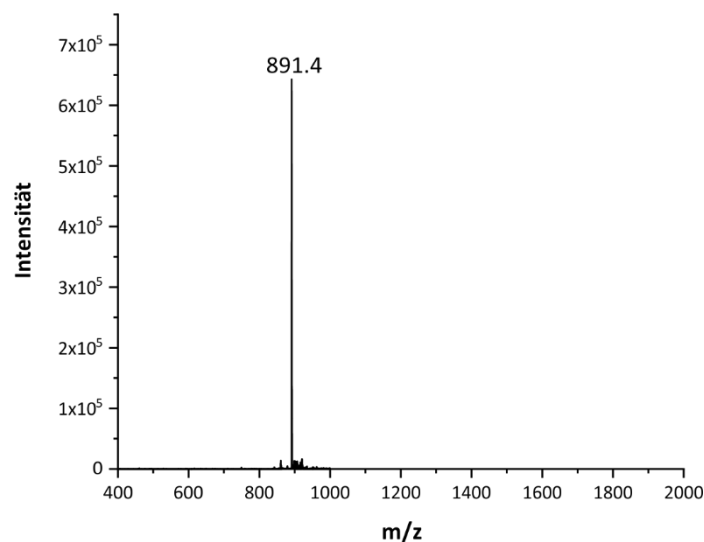


Abbildung 28: ESI-Massenspektrum (neg. Modus) von **BCP E** \cdot Na_2SO_4 in 50 Vol.-% MeOH/ H_2O

Diskussion der Synthese des Sulfatkomplexes von BCP E

Anders als **BCP A** konnte **BCP E** analysenrein in Form des Sulfatkomplexes mit Hilfe von zwei aufeinanderfolgenden chromatographischen Reinigungsschritten isoliert werden. Versuche **BCP E** während der Aufarbeitung in salzfreier Form zu erhalten, schlugen fehl. Darum wurde dem Elutionsmittel im RP-chromatographischen Reinigungsschritt Natriumsulfat zugesetzt, um gezielt den Sulfatkomplex isolieren zu können. Überschüssiges Salz konnte im Zuge der Aufarbeitung abgetrennt werden, wodurch **BCP E** mit genau einem Äquivalent Natriumsulfat

als Produkt anfiel. Für die Bindung des Sulfatanions in der Rezeptorkavität sprachen neben der Elementaranalyse, der ^1H -NMR-spektroskopische Befund, dass die Aminoprolin- C_α -Protonen (\blacktriangle) vergleichsweise stark entschirmt waren (vgl. Abbildung 27) und das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse, bei der ausschließlich das Ion des Sulfatkomplexes nachgewiesen wurde (vgl. Abbildung 28).

Mit 18 % fiel die Ausbeute an **BCP E** · Na_2SO_4 niedrig aus. Allerdings zeigte schon die HPLC Analyse der Synthesen im analytischen Maßstab, dass das gewünschte Produkt in der Reaktion aufgrund der Bildung vermutlich polymerer Nebenprodukte mit einer maximalen Ausbeute von circa 50 % gebildet wird. Die beiden chromatographischen Aufarbeitungsschritte sowie die aufwendige Abtrennung des überschüssigen Sulfatsalzes waren zusätzlich mit Ausbeuteverlusten verbunden. Mit 18 % war die Ausbeute dieses Rezeptors aber mit Ausbeuten vergleichbar, die für andere Käfig-artige Rezeptoren erreicht wurden.^[54]

Isolierung von BCP E als Anionen-freier Käfig

Voruntersuchungen

Da für quantitative Bindungsstudien der salzfreie Rezeptor benötigt wurde, wurde ein Verfahren entwickelt, um **BCP E** · Na₂SO₄ nach seiner Isolierung in den freien Rezeptor zu überführen. Dieses basierte auf der Fällung des gebundenen Sulfatanions als schwerlösliches Bariumsulfat. Bei der Wahl des benötigten Bariumsalzes musste berücksichtigt werden, dass dessen Anion nicht vom BCP gebunden wird. Als potenziell geeignetes Fällungsreagenz wurde Bariumbistriflimid (Abbildung 29) identifiziert, da es zum einen kommerziell erhältlich ist und dazu die beiden Triflimidanionen aufgrund ihrer Größe und sehr schwach koordinierenden Eigenschaften keine ausgeprägte Affinität für das BCP haben sollten. Die Studien zur Isolierung des salzfreien BCPs unter Verwendung von Bariumbistriflimid (Ba(trif)₂) wurden unter meiner Anleitung im Rahmen der Bachelorarbeit von Sabrina Knospe durchgeführt.^[55]

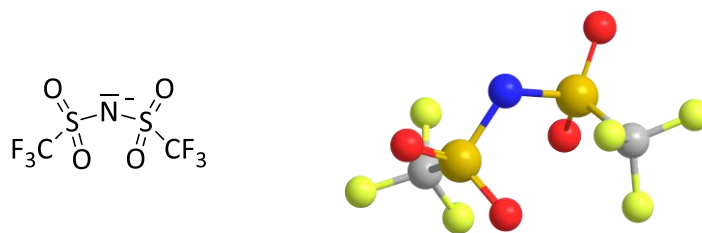


Abbildung 29: Struktur und Kalottenmodell des Triflimidanions

Zunächst wurde überprüft, ob das Triflimidanion tatsächlich kein geeigneter Gast für CP-basierte Rezeptoren darstellt. Dazu wurde Cyclopeptid **R1** in 20 Vol.-% Methanol/Wasser mit 0.5 und 2 Äquivalenten Bariumbistriflimid versetzt und die ¹H-NMR-Spektren dieser Lösungen mit dem Spektrum des Cyclopeptids im selben Lösungsmittelgemisch verglichen (Abbildung 30). Die erhaltenen Spektren zeigen, dass die Gegenwart von Bariumbistriflimid keine spektralen Veränderungen im Vergleich zu dem Spektrum von Cyclopeptid **R1** verursacht.

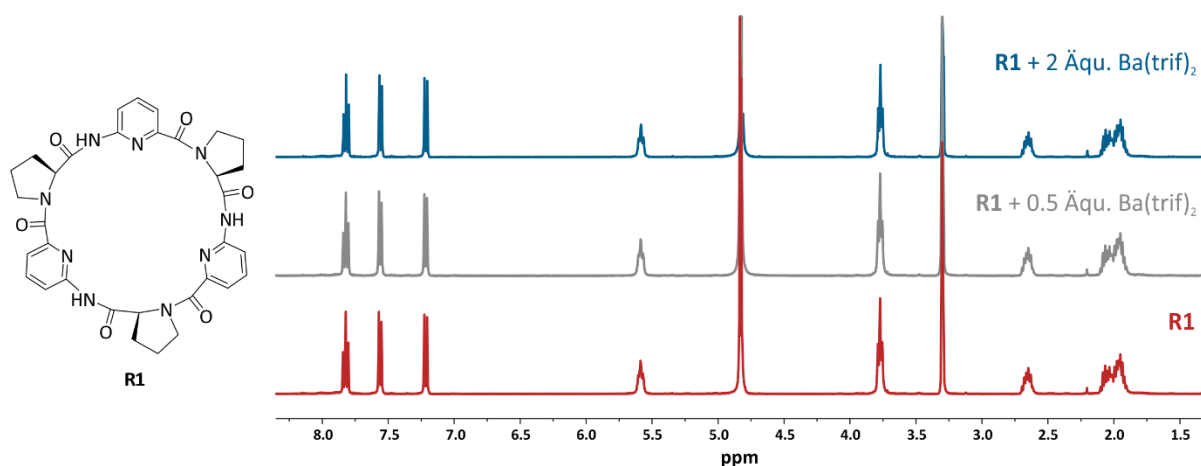


Abbildung 30: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **R1** ohne und mit 0.5 und 2 Äquivalenten Bariumbistriflimid (400 MHz, 25 °C, 20 Vol.-% MeOD- d_4 /D $_2$ O)

Um zu untersuchen, ob $\text{Ba}(\text{trif})_2$ in der Lage ist, **BCP E** in die Sulfat-freie Form zu überführen, wurden Lösungen von **BCP E** · Na_2SO_4 in 50 Vol.-% MeOD- d_4 /D $_2$ O mit 0.5 und 1 Äquivalent $\text{Ba}(\text{trif})_2$ versetzt und sofort und eine Stunde nach Zugabe jeweils $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch vermessen.

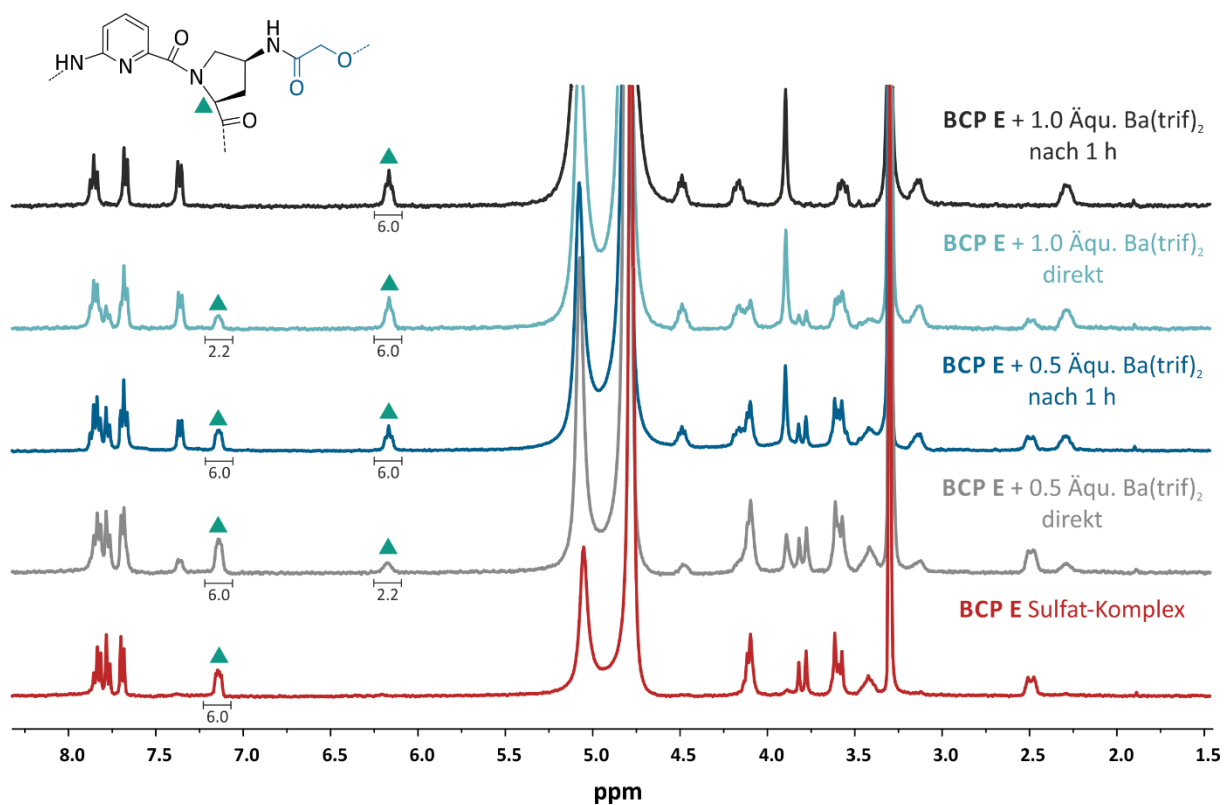


Abbildung 31: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **BCP E** · Na_2SO_4 ohne und mit 0.5 und 1 Äquivalent Bariumbistriflimid direkt nach Zugabe des Salzes sowie nach 1 h (400 MHz, 25 °C, 50 Vol.-% MeOD- d_4 /D $_2$ O)

Dass unter diesen Bedingungen Bariumsulfat gebildet wurde, konnte qualitativ anhand der auftretenden Trübung der Lösungen nachvollzogen werden. Die Spektren in Abbildung 31 zeigen, dass bereits nach Zugabe von 0.5 Äquivalenten $\text{Ba}(\text{trif})_2$ ein neuer Signalsatz entstanden ist, in dem das Signal der Aminoprolin- C_α -Protonen (\blacktriangle) bei 6.18 ppm auftritt, während das entsprechende Signal im Signalsatz des Sulfatkomplexes bei 7.15 ppm zu finden ist. Dieser neue Signalsatz wurde dem freien **BCP E** zugeordnet und sein Entstehen zeigt, dass die Dynamik des Sulfataustausches langsam auf der NMR-Zeitskala ist. Erst nach einer Stunde waren die beiden Signalsätze gleich intensiv, zu diesem Zeitpunkt lagen das freie **BCP E** und **BCP E** · Na_2SO_4 entsprechend in dem erwarteten 1:1 Verhältnis vor. In Gegenwart von 1 Äquivalent $\text{Ba}(\text{trif})_2$ waren kurz nach Zugabe ebenfalls noch zwei Signalsätze zu sehen, aber nach einer Stunde lediglich der Signalsatz des freien **BCP E** erkennbar.

Ergänzend zu den NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde zusätzlich eine Lösung von **BCP E** · Na_2SO_4 in 50 Vol.-% Methanol/Wasser kurz nach Zugabe von 1.1 Äquivalenten Bariumbistriflimid mittels ESI-MS vermessen. Das erhaltene ESI-Massenspektrum (Abbildung 32) zeigt mehrere Signale.

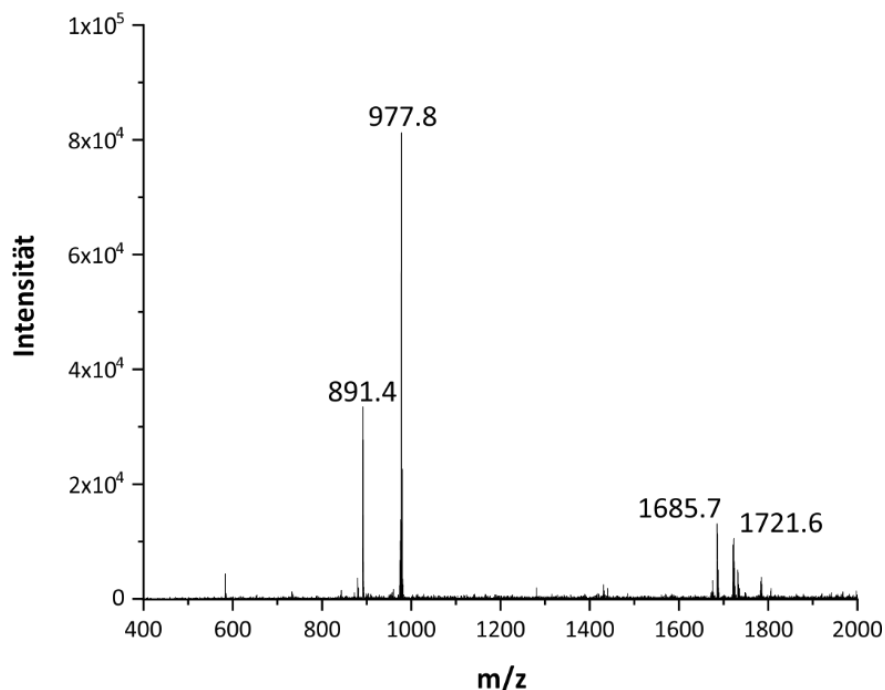


Abbildung 32: ESI-Massenspektrum (neg. Modus) des Sulfatkomplexes von **BCP E** nach Zugabe von 1.1 Äquivalenten $\text{Ba}(\text{trif})_2$ in 50 Vol.-% $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$

Das Signal bei einem m/z -Verhältnis von 891.4 kann dem zweifach negativ geladenen Sulfatkomplex von **BCP E** zugeordnet werden, der zum Zeitpunkt der Messung (20 Minuten nach Sulfatzugabe) wahrscheinlich noch nicht vollständig dissoziiert war. Zusätzlich wird ein Signal bei $m/z = 977.8$ beobachtet, das einem Addukt aus Barium mit drei Triflimidanionen zuzuordnen ist. Interessant ist das Signal bei $m/z = 1685.7$, das dem einfach deprotonierten, Anionen-freien **BCP E** entspricht und das bei $m/z = 1721.6$, welches dem Chloridkomplex von **BCP E** zugeordnet werden kann, der vermutlich während der Messung aus der Anionen-freien Form von **BCP E** mit ubiquitär vorkommendem Chlorid gebildet wurde. Kein Signal wird hingegen bei $m/z = 1966.5$ detektiert, welches auf das Vorliegen des Triflimidkomplexes von **BCP E** hinweisen würde.

Diskussion der Ergebnisse der Voruntersuchungen

Für die Überführung von **BCP E** · Na₂SO₄ in eine Anionen-freie Form, sollte das in der Kavität gebundene Sulfatanion als schwerlösliches Bariumsulfat ($\log K_{sp}(\text{BaSO}_4) = 1.1 \times 10^{-10} \text{ mol}^2/\text{L}^2$ in Wasser bei 25 °C)^[56] gefällt werden. Hierfür musste gewährleistet werden, dass das Gegenion des verwendeten Bariumsalzes nicht von dem BCP gebunden wird und entsprechend kein neuer Anionenkomplex entsteht.

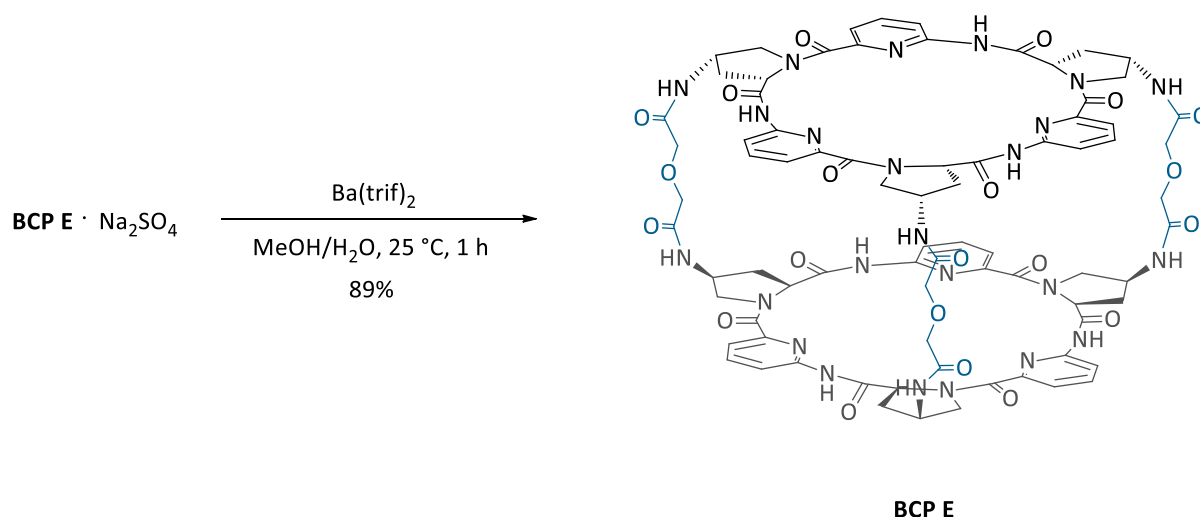
Voruntersuchungen zeigten, dass hierfür Bariumbistriflimid geeignet sein könnte, da das schwach koordinierende Triflimidanion laut ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen nicht oder sehr schwach an das Modell-CP **R1** bindet (vgl. Abbildung 30). Dementsprechend wurden Testreaktionen mit **BCP E** · Na₂SO₄ im NMR-Maßstab durchgeführt. Die Bildung eines Niederschlags bei Versetzen einer Lösung von **BCP E** · Na₂SO₄ in 50 Vol.-% MeOD-*d*₄/D₂O mit Ba(trif)₂ lieferte einen ersten qualitativen Hinweis, dass das von dem BCP gebundene Anion tatsächlich als Bariumsulfat gefällt werden kann. Die ¹H-NMR-Spektren dieser Lösung (vgl. Abbildung 31) bestätigten zudem die Bildung eines neuen Produkts, bei dem es sich nicht mehr um den Sulfatkomplex von **BCP E** handelte.

Ergänzende, massenspektrometrische Untersuchungen einer mit 1.1 Äquivalenten Ba(trif)₂ versetzten Lösung von **BCP E** · Na₂SO₄ im gleichen Lösungsmittelgemisch gaben keine Hinweise darauf, dass mit Triflimidanionen ein neuer Komplex gebildet wird. Auch wenn nicht

vollständig ausgeschlossen werden kann, dass Triflimidanionen schwach mit **BCP E** wechselwirken, schien es vielversprechend, die Überführung von **BCP E** · Na₂SO₄ in die salzfreie Form im präparativen Maßstab mit Ba(trif)₂ zu testen.

Präparative Darstellung von BCP E

Auf Basis der Ergebnisse dieser Voruntersuchungen wurde eine Lösung von **BCP E** · Na₂SO₄ in 20 Vol.-% Methanol/Wasser mit 1.5 Äquivalenten Ba(trif)₂ versetzt (Schema 10), wobei unter diesen Bedingungen **BCP E** zusammen mit Bariumsulfat ausfiel. Die entstandene Suspension wurde zentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Der verbliebene Feststoff wurde mit 50 Vol.-% Dichlormethan/Methanol versetzt, wodurch **BCP E** in Lösung ging und unlösliches Bariumsulfat durch erneute Zentrifugation abgetrennt werden konnte. Durch Einengen der organischen Phase wurde das salzfreie Produkt isoliert.



Schema 10: Darstellung des salzfreien **BCP E**

Die Gesamtausbeute der Synthese von **BCP E** ausgehend von dem CP-Triamin **21** und dem Aktivester **31** betrug 16 %. Da **BCP E** · Na₂SO₄ mit einer Ausbeute von 18 % erhalten wurde, kam es bei der Überführung in die salzfreie Form trotz mehrerer Aufarbeitungsschritte zu keinem nennenswerten Ausbeuteverlust.

Die Elementaranalyse des isolierten Produkts zeigte eindeutig, dass es sich um die salzfreie Form von **BCP E** handelte. Bestätigt wurde dies ¹H-NMR-spektroskopisch. Um den Unterschied zwischen dem ¹H-NMR-Spektrum von **BCP E** · Na₂SO₄ und dem des Anionen-freien **BCPs E** zu verdeutlichen, sind beide Spektren in Abbildung 33 in 67 Vol.-% MeCN-*d*₃/D₂O dargestellt.

Besonders hervorzuheben ist der Unterschied der chemischen Verschiebungen der Aminoprolin- C_{α} -H-Signale (\blacktriangle), der 1.42 ppm beträgt.

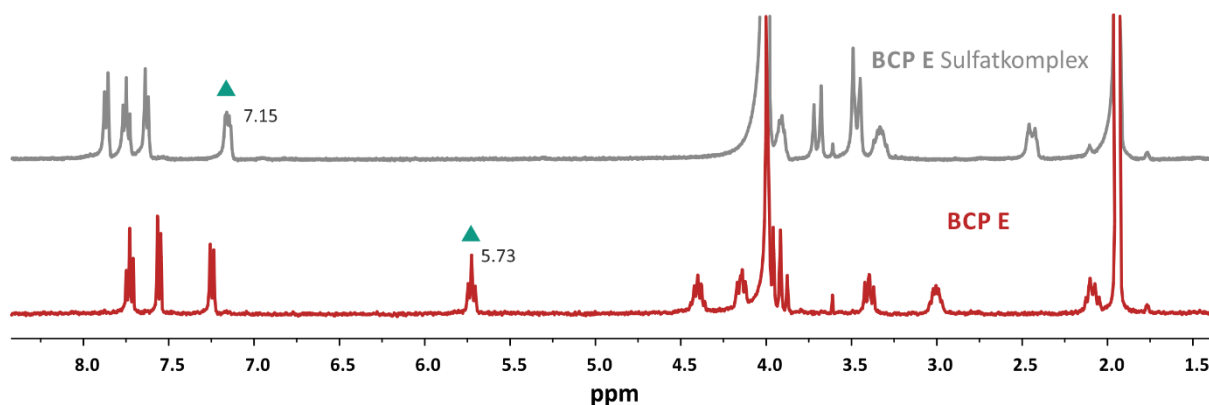


Abbildung 33: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **BCP E** und des Sulfatkomplexes von **BCP E** (400 MHz, 25 °C, 67 Vol.-% $\text{MeCN-d}_3/\text{D}_2\text{O}$)

Bei dem Versuch die Synthese von **BCP E** in größeren Maßstäben durchzuführen, um Ausbeuteverluste durch Aufarbeitungsschritte zu minimieren und die für die Bindungsstudien benötigten Mengen zügig zugänglich zu machen, zeigte sich, dass die optimale Ansatzgröße circa 90 μmol beträgt. Die Erhöhung der Ansatzgröße führte zu substantziellen Ausbeuteverlusten, sodass die Durchführung mehrerer Parallelansätze sinnvoller erschien.

Diskussion der präparativen Darstellung von **BCP E**

Die Überführung von **BCP E** \cdot Na_2SO_4 in seine Anionen-freie Form gelang auch im präparativen Maßstab, wobei das salzfreie Produkt in typischen Absolutmengen von circa 10 mg erhalten wurde. Die Elementaranalyse des erstmals in ausreichenden Mengen isolierten Produkts bestätigte eindeutig, dass es sich um das Anionen-freie **BCP** handelte. Die Ausbeuteverluste bei der Isolierung von **BCP E** waren trotz mehrerer Reinigungsschritte vertretbar.

Da ein Hochskalieren des Reaktionsansatzes nicht ohne signifikante Einbußen bei der Ausbeute möglich war, konnten pro Ansatz immer nur kleine Mengen **BCP E** analysenrein erhalten werden. Durch Wiederholung der Synthese wurde aber genügend Material für die nachfolgenden Bindungsstudien erhalten.

2.3.2 Darstellung eines einfach verbrückten Bis(cyclopeptids)

2.3.2.1 Synthetische Vorüberlegungen zur Darstellung des einfach verbrückten Bis(cyclopeptids)

Um den Einfluss der drei Linker in **BCP E** auf die Bindungseigenschaften evaluieren zu können, sollte zu Vergleichszwecken auch das entsprechend einfach verbrückte **BCP F** in die Untersuchungen einbezogen werden. Dieses BCP sollte in Anlehnung an beschriebene Synthesen ausgehend von einem bekannten Cyclopeptid mit einer 4-(2S,4S)-Aminoprolinereinheit synthetisiert werden. Die Verbrückung der zwei CP-Ringe sollte im letzten Schritt der Synthese durch Umsetzung mit Diglycolsäure und einem geeigneten Kupplungsreagenz erfolgen (Abbildung 34).

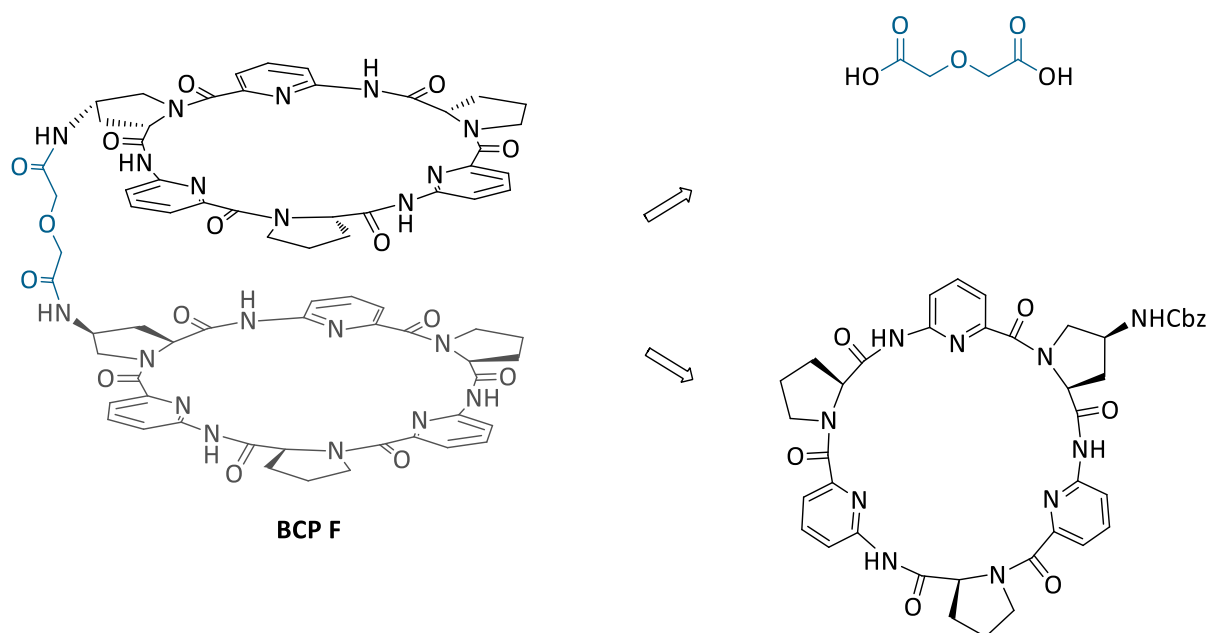
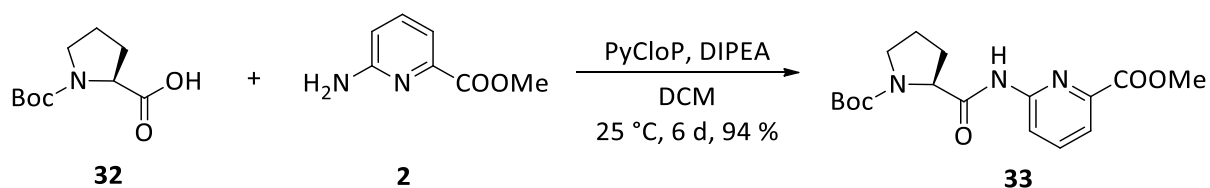


Abbildung 34: Retrosynthese des einfach verbrückten Bis(cyclopeptids) **BCP F**

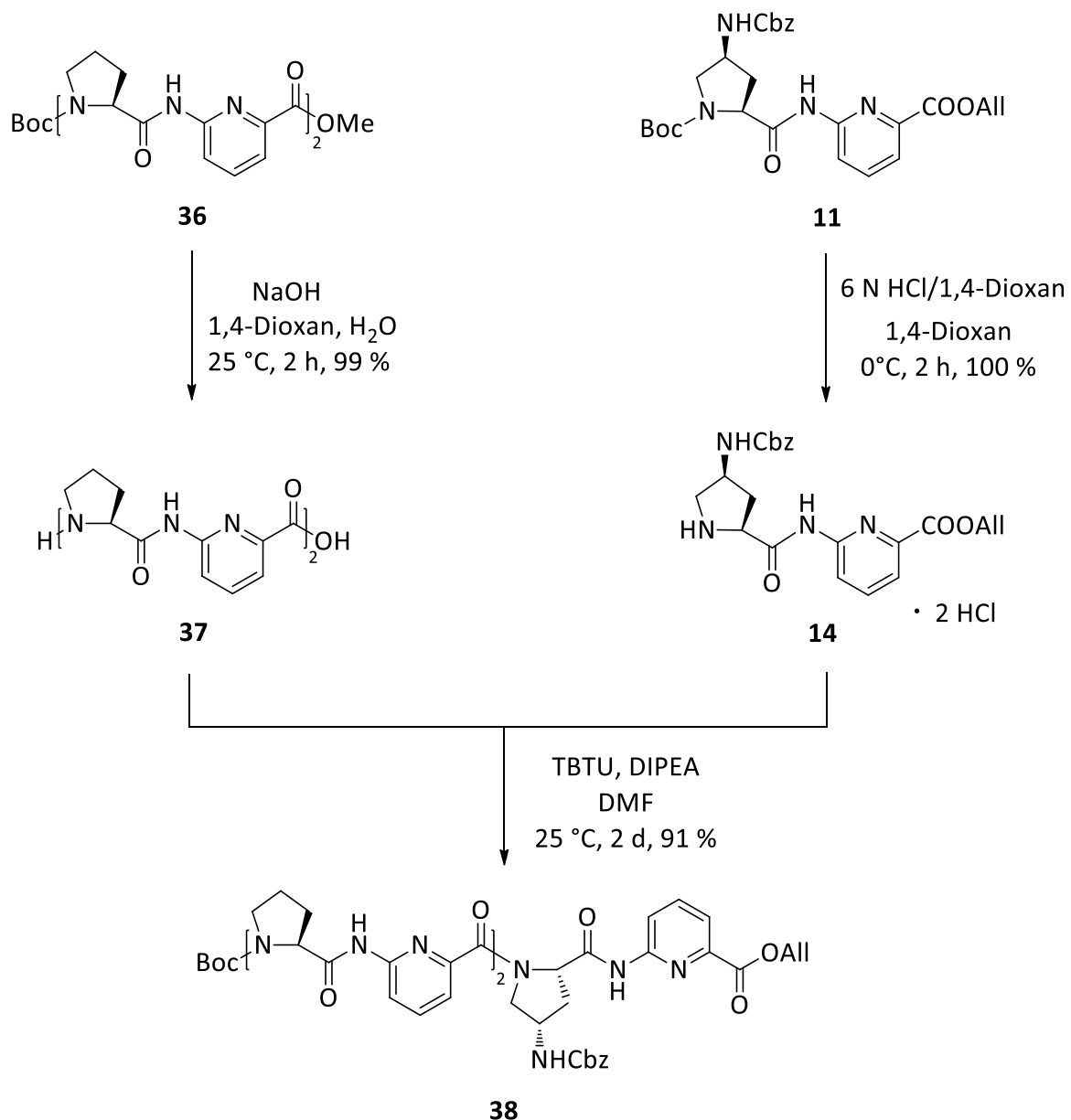
2.3.2.2 Synthese des einfach verbrückten BCPs F

Für die Synthese des für **BCP F** benötigten Cyclopeptidbausteins wurde zunächst kommerziell erhältliches Boc-L-Prolin **32** mit 6-Aminopicolinsäuremethylester **2** zu dem Dipeptid **33** gekuppelt, welches in einer Ausbeute von 94 % erhalten wurde (Schema 11).



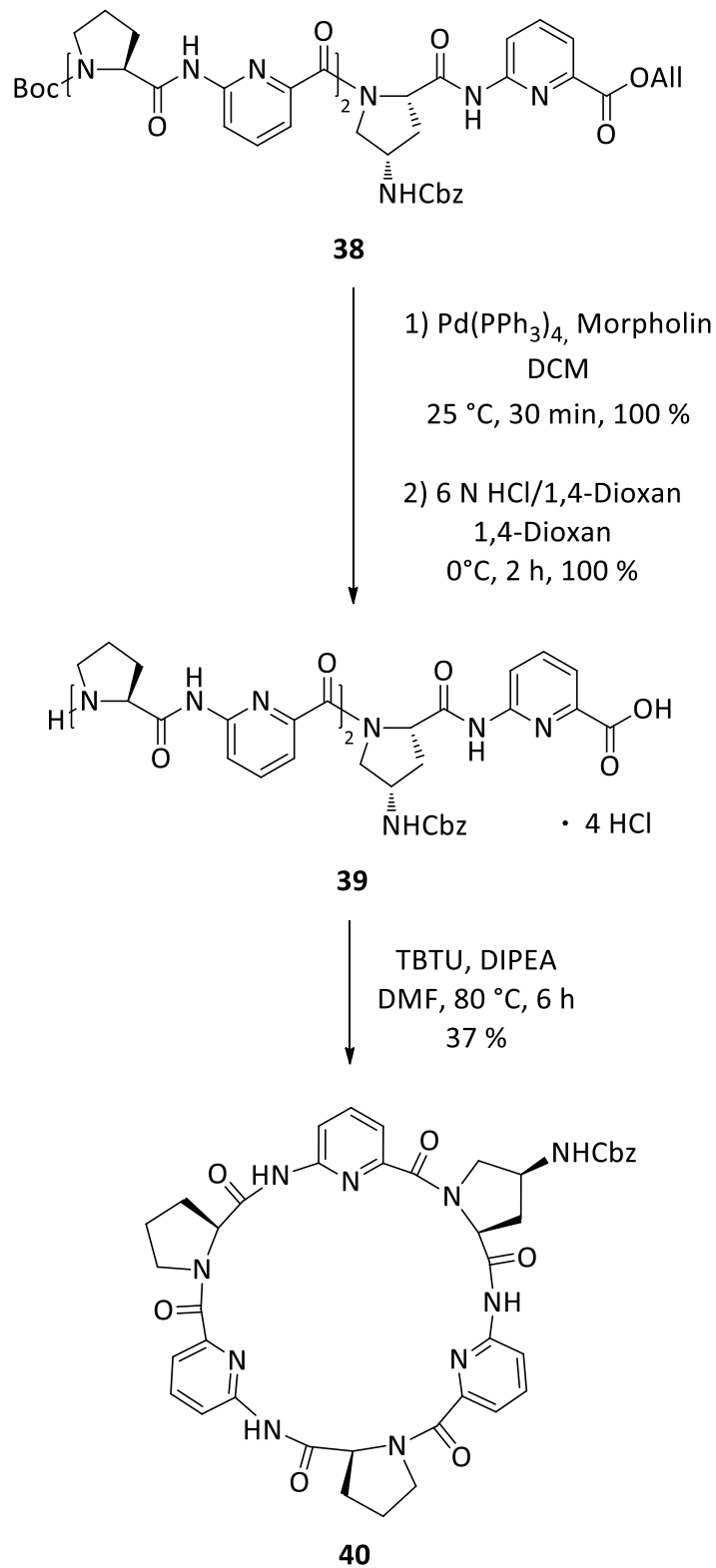
Schema 11: Darstellung des Dipeptids **33**

Anschließend wurden äquivalente Mengen von **33** unter jeweils sauren bzw. basischen Bedingungen am N- bzw. C-Terminus entschützt. Die dabei in quantitativer Ausbeute erhaltenen teilentschützten Zwischenprodukte wurden unter Verwendung von TBTU zum linearen Tetrapeptid **36** gekuppelt. Das Tetrapeptid wurde in einer Ausbeute von 91 % isoliert (Schema 12).

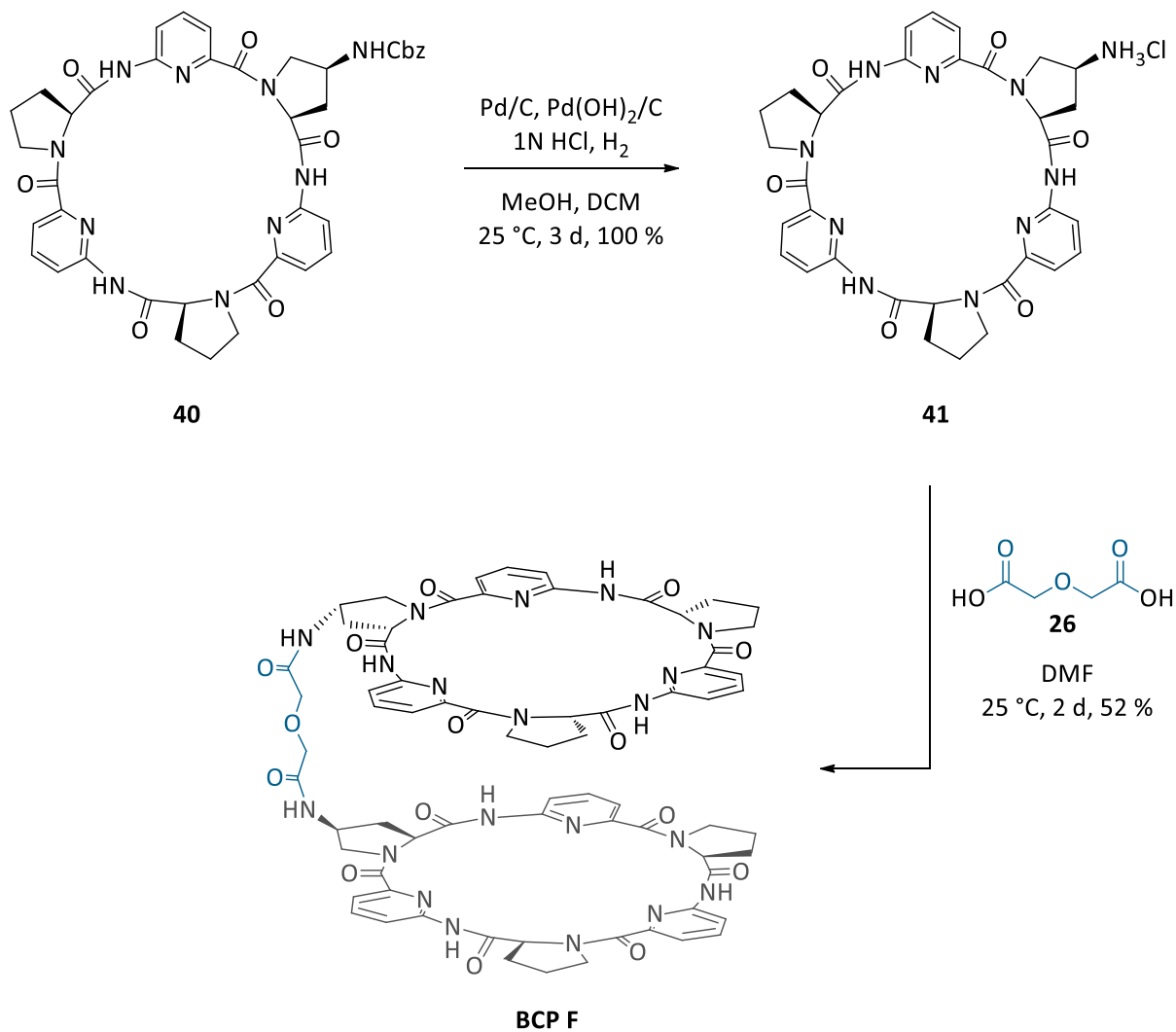


Schema 13: Darstellung des Hexapeptids **38**

Verbindung **38** wurde im Anschluss zuerst C-terminal und nachfolgend N-terminal entschützt und das so erhaltene vollständig entschützte Hexapeptid unter Pseudohochverdünnung bei 80 °C in Anwesenheit von TBTU cyclisiert, wobei das Cyclopeptid **40** nach chromatographischer Aufreinigung in 37 % Ausbeute erhalten wurde (Schema 14).

Schema 14: Darstellung des Cyclopeptids **40**

Die geschützte Aminogruppe in **40** wurde hydrogenolytisch abgespalten und das so erhaltene Produkt mit 0.5 Äquivalenten Diglycolsäure **26** unter dem Einfluss von TBTU umgesetzt. Das gewünschte Endprodukt **BCP F** fiel in einer Ausbeute von 52 % an (Schema 15).



Schema 15: Darstellung von **BCP F**

2.3.2.3 Diskussion der Synthese des einfach verbrückten BCPs F

Die Darstellung des einfach verbrückten Derivats **BCP F** gelang analog zu etablierten Verfahren. Mit 37 % war die Ausbeute im Cyclisierungsschritt zufriedenstellend und vergleichbar mit typischen Ausbeuten in analogen CP-Synthesen.

Die anschließende Kupplung des entschützten Cyclopeptids mit Diglycolsäure wurde in Analogie zu der von C. Reyheller etablierten Methode durchgeführt. Die Ausbeute dieser Reaktion lag mit 52 % in einem ähnlichen Bereich wie die anderer Kupplungen zur Darstellung von BCPs.^[30] Ausbeuteverluste sind höchstwahrscheinlich während der Aufarbeitung entstanden, da eine zweifache chromatographische Aufreinigung notwendig war, um alle Nebenprodukte und Reste der verwendeten Reagenzien vollständig abzutrennen. **BCP F** wurde somit erfolgreich dargestellt und in einer ausreichenden Menge analysenrein erhalten, um weitere Untersuchungen durchführen zu können.

2.3.3 Untersuchungen zu BCP E und BCP F

2.3.3.1 Qualitative Bindungsstudien

Qualitative NMR-Bindungsstudien zu BCP E und BCP F

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Wechselwirkung von Cyclopeptiden und Bis(cyclopeptiden) mit Anionen mittels ^1H -NMR-Spektroskopie in wässrigen Lösungsmittelgemischen, häufig in 50 Vol.-% Methanol/Wasser, untersucht.^[29,30,42,43] In diesem Gemisch war **BCP E** jedoch nicht ausreichend löslich. Darum wurden Bindungsstudien in 67 Vol.-% Acetonitril/Wasser durchgeführt, einem Lösungsmittelgemisch, in dem in der Vergangenheit ebenfalls schon die Anionenbindung von BCPs charakterisiert wurde, sodass ein Vergleich mit bekannten Systemen möglich war.^[30,46,53]

Für die qualitativen Bindungsstudien wurden ^1H -NMR-Spektren von Lösungen von **BCP E** in 67 Vol.-% MeCN- $\text{d}_3/\text{D}_2\text{O}$, die jeweils ein Äquivalent eines Natriumsalzes enthielten, vermessen und mit dem in Abwesenheit von Salzen erhaltenen ^1H -NMR-Spektrum des BCPs verglichen. Als Salze wurden Natriumchlorid, Natriumbromid, Natriumiodid, Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumnitrat, Natriumperrhenat, Natriumselenat und Natriumsulfat verwendet. Die jeweiligen Spektren sind in der nachfolgenden Abbildung 35 dargestellt. Die Spektren zeigen, dass fast alle Signale von **BCP E** durch die Gegenwart der Salze beeinflusst werden. Dabei ist das Ausmaß der Signalshifts signifikant von der Art des Anions abhängig, was insbesondere an der Verschiebung der Aminoprolin- C_α -Protonen (\blacktriangle) deutlich wird. Die entsprechenden Protonen weisen in die Kavität des BCPs, wodurch ihre chemische Verschiebung durch ein gebundenes Anion am stärksten beeinflusst wird. Die Lage dieser Signale variiert dabei zwischen 5.73 ppm für das freie **BCP E** und 7.16 ppm für den Sulfatkomplex und nimmt in der Reihe Hydrogenphosphat < Chlorid < Nitrat < Bromid < Perrhenat < Selenat \approx Iodid < Sulfat zu. Weiterhin auffällig ist, dass sich die Aufspaltung des Signals der Linkerprotonen (\bullet), ebenfalls mit der Art des Anions verändert.

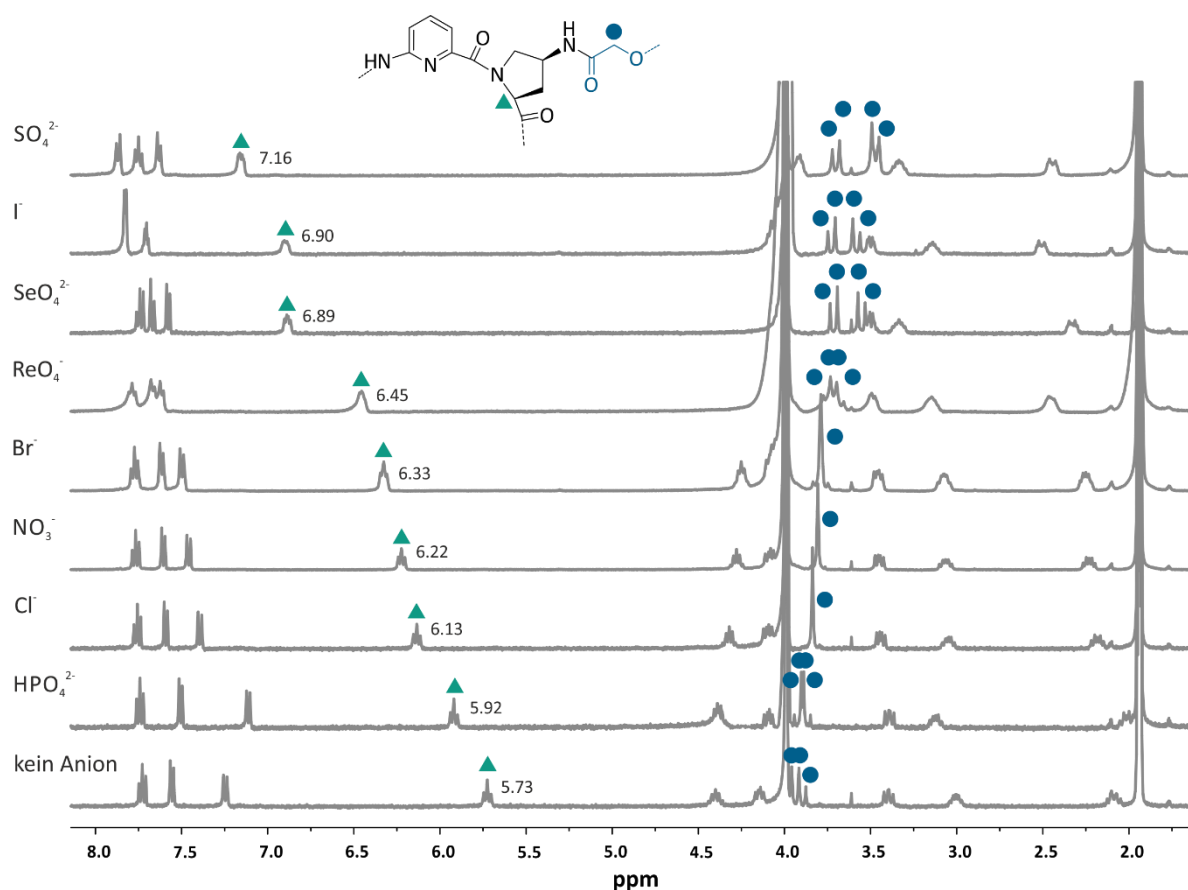


Abbildung 35: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **BCP E** (1 mM) ohne Anion und mit jeweils einem Äquivalent verschiedener Anionen als Natriumsalze (400 MHz, 25 °C, 67 Vol.-% MeCN- d_3 /D $_2$ O)

Ausgehend von **BCP E** · Na $_2$ SO $_4$ war es möglich, eine analoge Bindungsstudie in 50 Vol.-% MeOD- d_4 /D $_2$ O durchzuführen, da der Sulfatkomplex im Gegensatz zu dem freien **BCP E** in diesem Lösungsmittelgemisch löslich war. In diesem Fall wurde die Lösung des Sulfatkomplexes zunächst mit 1.1 Äquivalenten Bariumbistriflimid versetzt, um Sulfat als Bariumsulfat auszufällen. Nach einer Stunde wurden jeweils die Natriumsalze der zu untersuchenden Anionen zugegeben und die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aufgenommen (Abbildung 36). Die erhaltenen Spektren sind weitestgehend analog zu denen in Acetonitril/Wasser, wobei die chemische Verschiebung der Aminoprolin- C_α -Protonen (\blacktriangle) zwischen 6.18 ppm für das freie **BCP E** und 7.15 ppm für den Sulfatkomplex variiert und in der Reihenfolge Chlorid < Nitrat < Bromid < Perrhenat < Selenat < Iodid < Hydrogenphosphat \approx Sulfat zunimmt. Der einzige signifikante Unterschied zwischen dieser und der vorangegangenen Messreihe ist, dass die chemische Verschiebung des Aminoprolin- C_α -Protons im Spektrum, das nach Zugabe von Natriumhydrogenphosphat erhalten wurde, in diesem Fall praktisch identisch zu der

chemischen Verschiebung desselben Signals im Spektrum des Sulfatkomplexes ist. Der Einfluss der Anionen auf die Aufspaltung der Linkerprotonen (●) wird auch in diesen Spektren beobachtet.

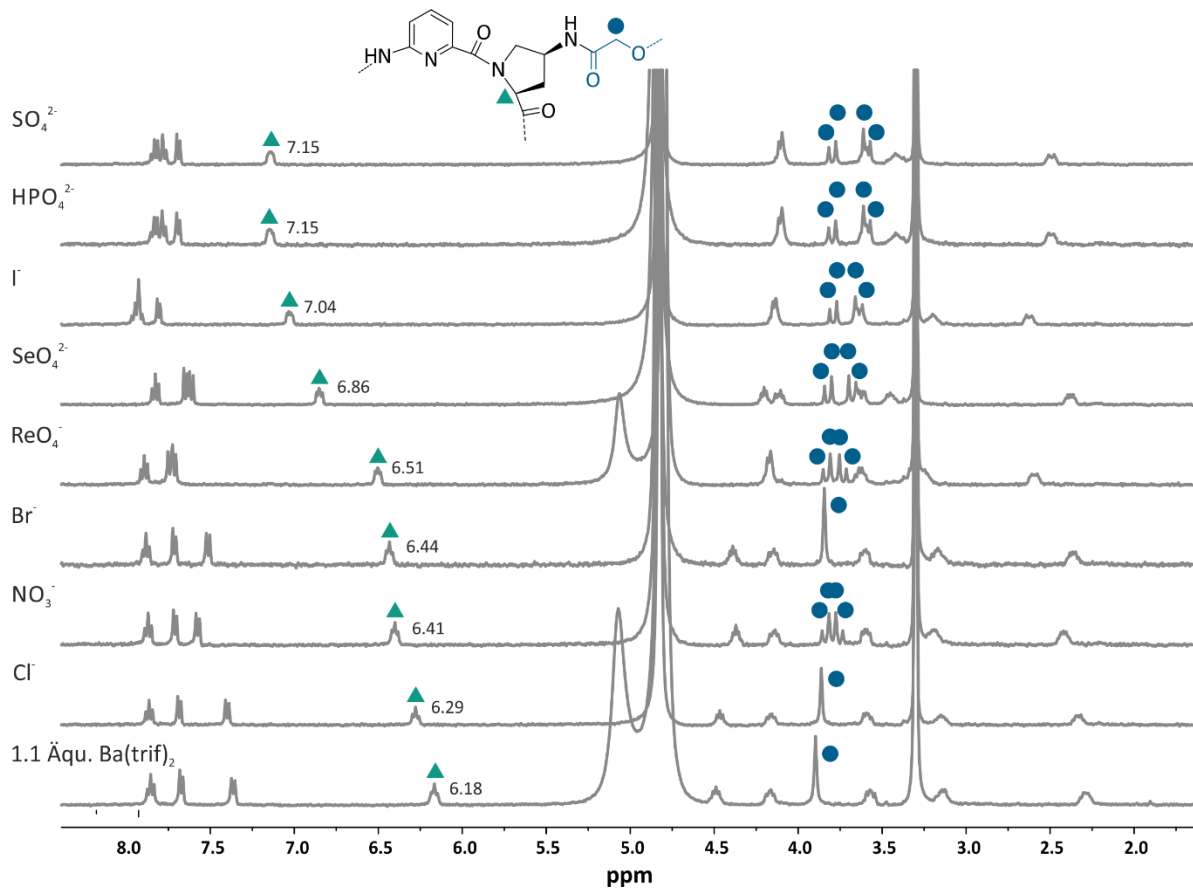


Abbildung 36: ¹H-NMR-Spektren des Sulfatkomplexes von **BCP E** (1 mM) nach Zugabe von 1.1 Äqu. Bariumbistriflimid und anschließender Zugabe verschiedener Anionen als Natriumsalze (400 MHz, 25 °C, 67 Vol.-%MeOD-d₄/D₂O)

Zusätzlich wurde eine Bindungsstudie mit dem einfach verbrückten **BCP F** durchgeführt. Hierfür wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit 67 Vol.-% MeCN-d₃/D₂O als Lösungsmittel gewählt. Aufgrund der geringeren Symmetrie von **BCP F** im Vergleich zu **BCP E** ist die Anzahl der Signale in diesen Spektren (Abbildung 37) höher als die in den vorigen, wobei dennoch eine Zuordnung möglich ist. Die Gegenwart der Anionen beeinflusst wiederum die Signale der Aminoprolin-C_α-Protonen (▲) am stärksten. Diese Signale liegen in den Spektren in einem ähnlichen Bereich (5.65 ppm – 6.73 ppm) wie in den Spektren von **BCP E** (5.73 ppm – 7.16 ppm), wobei durch Sulfat, Iodid und Selenat die stärksten Verschiebungen verursacht werden. Im Gegensatz zur Messreihe mit **BCP E** kommt es bei Hydrogenphosphat, Nitrat,

Chlorid und Perrhenat zu keiner beziehungsweise keiner nennenswerten Änderung der Resonanz dieser Protonen. Die Signallage der Linkerprotonen (●) verändert sich in Gegenwart der Salze leicht, wobei der Einfluss des Anions auf das Aufspaltungsmuster schwer zu beurteilen ist, da sich diese Signale mit anderen stark überlagern.

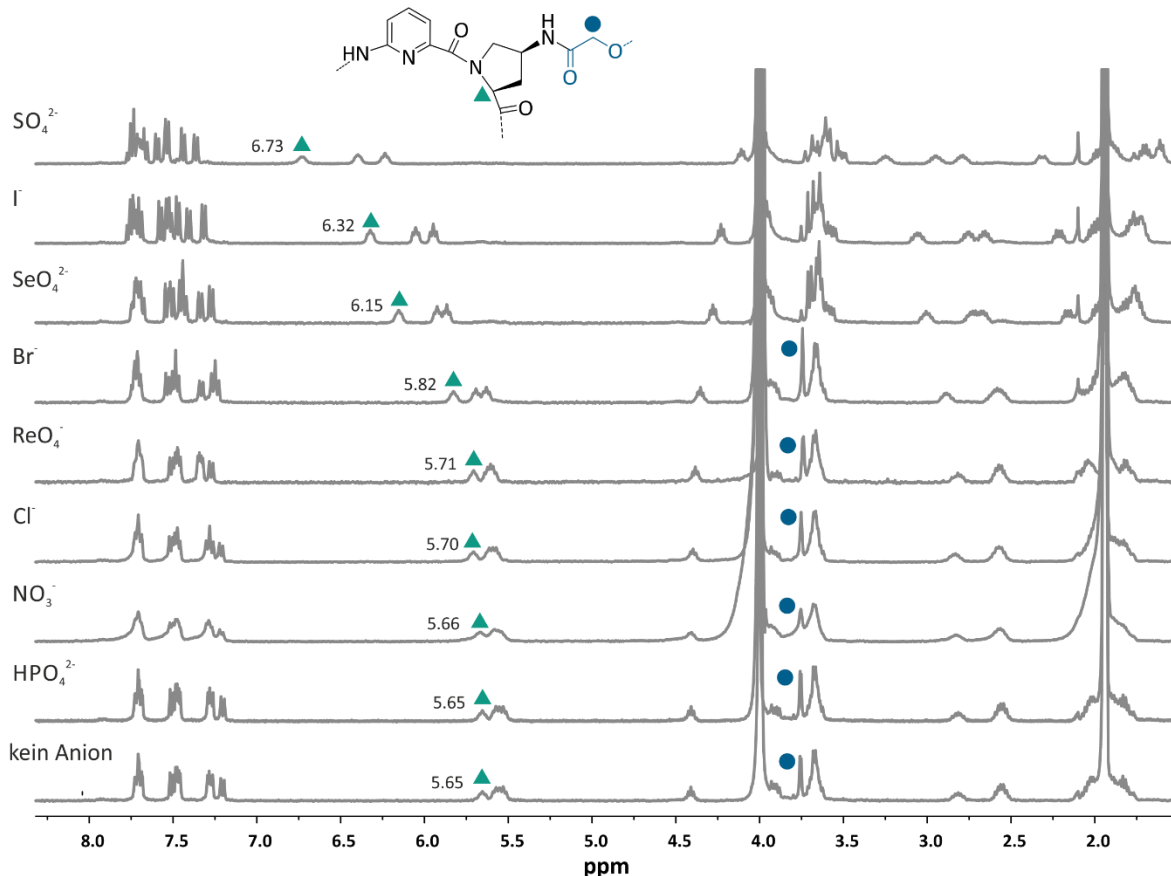


Abbildung 37: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **BCP F** (1 mM) ohne Anion und mit jeweils einem Äquivalent verschiedener Anionen als Natriumsalze (400 MHz, 25 °C, 67 Vol.-%MeCN- d_3 /D $_2$ O)

Diskussion der qualitativen Bindungsstudien

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Bindungsstudien gaben Hinweise auf die Wechselwirkung von **BCP E** und **BCP F** mit Anionen. So kam es in Gegenwart von Salzen in fast allen Fällen zu einer Entschirmung der Aminoprolin- C_α -Protonen beziehungsweise Prolin- C_α -Protonen, die typisch für die Bildung von Anionenkomplexen ist und die Einlagerung des Anions in die BCP-Kavität anzeigt. Für **BCP E** wurde für jeden der acht nach Anionenzugabe gebildeten Komplexe ein

charakteristisches ^1H -NMR-Spektrum erhalten (vgl. Abbildung 35). Die Änderung der chemischen Verschiebung der Aminoprolin- C_α -Protonen im Vergleich zu freiem **BCP E** nimmt in der Reihenfolge Hydrogenphosphat < Chlorid < Nitrat < Bromid < Perrhenat < Selenat \approx Iodid < Sulfat zu. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass das Ausmaß des Signalshifts in der Reihe der Halogenide typischerweise mit der Komplexstabilität korreliert und Chlorid somit am schwächsten und Iodid am stärksten gebunden wird.^[57] **BCP E** scheint eine analoge Selektivität zu besitzen. Obwohl also Chlorid aufgrund seiner höheren Ladungsdichte im Vergleich zu den größeren Halogeniden der bessere Wasserstoffbrückenakzeptor ist und die Desolvatisierung von Chlorid im Vergleich zu Iodid in dem verwendeten Lösungsmittelgemisch thermodynamisch günstiger ist,^[58] scheint die Größe der Halogenide der entscheidende Faktor zu sein, der die Komplexstabilität beeinflusst. Iodid füllt aufgrund seiner Größe (Anionenradius 220 pm^[59]) die Kavität am besten aus, kann entsprechend mit allen sechs NH-Gruppen gleichzeitig Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und wird vermutlich darum in der Reihe der Halogenide am effektivsten gebunden. Ebenso deuteten vorangegangene Untersuchungen^[60,61] an, dass Hydrogenphosphat nicht oder schwach mit BCPs wechselwirkt. Im Einklang damit ist der sehr geringe Effekt, den dieses Anion auf das ^1H -NMR-Spektrum von **BCP E** ausübt. Der Grund für die schwache Wechselwirkung lässt sich darauf zurückführen, dass es sich bei Hydrogenphosphat um ein teilweise protoniertes Anion handelt, wodurch es nach seiner Einlagerung in die BCP-Kavität, die ausschließlich Wasserstoffbrückendonoren enthält, zu destabilisierenden, repulsiven Wechselwirkungen kommt. Dass in Methanol/Wasser mit Hydrogenphosphat erhaltene Spektrum von **BCP E**, welches quasi deckungsgleich ist mit dem Spektrum des Sulfatkomplexes in diesem Lösungsmittelgemisch (vgl. Abbildung 36), widerspricht dieser Interpretation auf den ersten Blick. Die große Ähnlichkeit der beiden Spektren und die Tatsache, dass die Hydrogenphosphatzugabe kaum einen Einfluss auf das Spektrum von **BCP E** hat, wenn man von dem freien BCP ausgeht, deutet an, dass es sich bei dem in Methanol/Wasser in Gegenwart von Hydrogenphosphat erhaltenem Spektrum, tatsächlich um das Spektrum des Sulfatkomplexes handelt. Das zunächst in der Kavität gebundene Sulfat wurde zwar durch die Zugabe von $\text{Ba}(\text{trif})_2$ als Bariumsulfat ausgefällt, da die Löslichkeit von Bariumphosphat jedoch noch wesentlich geringer ist als die von Bariumsulfat ($\log K_L(\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2) = 3.4 \times 10^{-23} \text{ mol}^5/\text{L}^5$ gegenüber $\log K_L(\text{BaSO}_4) = 1.1 \times 10^{-10} \text{ mol}^2/\text{L}^2$ in Wasser bei 25 °C)^[62], führte das danach zugegebene

Dinatriumhydrogenphosphat dazu, dass Bariumsulfat gelöst wurde und das so freigesetzte Sulfatanion wieder von **BCP E** gebunden wurde.

Sulfat wird von BCPs in wässrigen Lösungsmittelgemischen in der Regel am stärksten gebunden und bewirkt normalerweise auch die ausgeprägteste Änderung der chemischen Verschiebung der Aminoprolin- C_{α} -Protonen.^[57] Analoges wird auch für **BCP E** beobachtet. Die starke Entschirmung der Prolin- C_{α} -Protonen, die auf eine effiziente Wechselwirkung mit diesem Anion hinweist, lässt sich auf ein Zusammenspiel diverser Faktoren zurückführen. Sulfat ist ähnlich groß wie Iodid (Anionenradius 230 pm^[59]) und füllt somit ebenfalls die Kavität sehr gut aus. Aufgrund der vier Sauerstoffatome und der doppelt negativen Ladung können jedoch stärkere und gerichtete Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, was zu einer effektiveren Bindung führt.

Auch wenn das Ausmaß der durch die Anionenbindung verursachten Entschirmung der Prolin- C_{α} -Protonen bei einigen Anionen wahrscheinlich mit der Komplexstabilität korreliert, sollte dieser Zusammenhang nicht auf alle Anionen übertragen werden, da strukturelle Parameter der Anionen (unterschiedliche Geometrien, Ladungsdichten, Ladungen, Zusammensetzungen, Wasserstoffbrückendonator- und -akzeptoreigenschaften) die Resonanz der Rezeptorprotonen in der Kavität ebenfalls beeinflussen.^[63] Die charakteristischen Effekte aller acht verwendeten Anionen auf das ^1H -NMR-Spektrum von **BCP E** sind aber ein starkes Indiz dafür, dass bis auf Hydrogenphosphat alle Anionen in mehr oder weniger großem Umfang mit dem BCP wechselwirken. Hierfür spricht auch der Einfluss der Anionen auf die Linkerprotonen. Das Aufspaltungsmuster dieses Signals liefert Informationen über die Flexibilität des Rezeptors. Beobachtet man ein Singulett, sind die diastereotopen Protonen im zeitlichen Mittel chemisch äquivalent, was für eine gewisse Flexibilität spricht, während das Ausmaß, mit dem das Signal zu einem AB-System aufgespalten sind, eine zunehmende Rigidität des Rezeptors andeutet. Eine besonders große Aufspaltung wird für solche Anionen beobachtet, die auch eine ausgeprägte Verschiebung des Aminoprolin- C_{α} -H-Signals verursachen, was dafür spricht, dass diese Anionen in der Tat stark gebunden werden. Die einzige Ausnahme bei diesem Trend ist das Nitrat anion.

Das verwendete Lösungsmittelgemisch scheint keinen ausgeprägten Einfluss auf die Anionenbindung auszuüben, da sich die in Acetonitril/Wasser und in Methanol/Wasser aufgenommenen Spektren sehr ähnlich sind.

Die zu Vergleichszwecken durchgeführte Bindungsstudie mit dem einfach verbrückten **BCP F** deutet an (vgl. Abbildung 37), dass dieser Rezeptor in 67 Vol.-% Acetonitril/Wasser ebenfalls effizient mit Sulfat, Iodid und Selenat wechselwirkt. Von allen weiteren untersuchten Anionen induziert lediglich Bromid eine geringe Verschiebung der Aminoprolin-C α - bzw. Prolin-C α -H-Signale. Bei den anderen Anionen sind die Effekte hingegen vernachlässigbar. Die Anionen-induzierte Veränderung der Signale der Linkerprotonen ist in diesem Fall schwierig zu verfolgen, da es zu einer Überlagerung mit anderen Signalen kommt.

Die Tatsache, dass einige Anionen bei **BCP E** Änderungen im ^1H -NMR-Spektrum bewirken, bei **BCP F** jedoch nicht, indiziert, dass aufgrund der höheren Linkeranzahl und der damit verbundenen besseren Vororganisation des Rezeptors, **BCP E** Anionen binden kann, die von **BCP F** nicht gebunden werden. Dies ist ein Hinweis auf einen Einfluss der Linkeranzahl auf die Anionenselektivität und somit indirekt auch ein Hinweis auf eine höhere Anionenaffinität des dreifach verbrückten BCPs für ausgewählte Anionen.

2.3.3.2 Quantitative Bindungsstudien

Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Hintergrund

Um quantitative Aussagen über die Bindungsaffinitäten von **BCP E** und **BCP F** treffen zu können, wurde deren Anionenaffinität mit Hilfe isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Bei der isothermen Titrationskalorimetrie handelt es sich um ein empfindliches Verfahren zur Charakterisierung der Komplexbildung, wobei in einer Messung die Bindungskonstante eines Komplexes, seine Stöchiometrie und die Enthalpie ΔH^0 der Komplexbildung ermittelt werden. Aus diesen Werten ergibt sich zusätzlich die freie Enthalpie ΔG^0 sowie die Entropie ΔS^0 der Komplexbildung.

Ein isothermes Titrationskalorimeter besteht aus einer Referenzzelle, die mit reinem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch befüllt wird, und einer Messzelle, in der typischerweise der im entsprechenden Lösungsmittel(gemisch) gelöste Rezeptor vorgelegt wird (Abbildung 38).

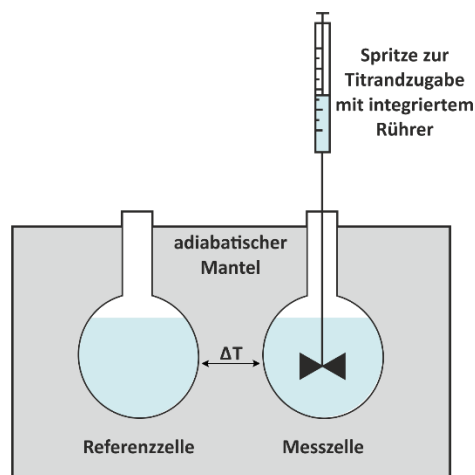


Abbildung 38: Schematischer Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters

Über eine Spritze, welche gleichzeitig auch als Rotor zur kontinuierlichen Durchmischung der Probe fungiert, wird in definierten Schritten die gewünschte Gastlösung zugegeben. Zu Beginn der Messung haben beide Zellen dieselbe Temperatur. Nach jeder Injektion wird dann der

Strom gemessen, der nötig ist, um die Messzelle auf die Temperatur der Referenzzelle zu bringen. Verläuft die Komplexbildung endotherm, so wird Wärme verbraucht und der Stromfluss erhöht, im Falle einer exothermen Reaktion wird Energie frei und der Stromfluss entsprechend verringert. Um die meist minimalen Temperaturunterschiede verlässlich quantifizieren zu können, werden die Messungen unter adiabatischen Bedingungen durchgeführt, um einen Wärmeaustausch mit der Umgebung und damit eine Verfälschung der Messergebnisse zu minimieren.

Als Rohdaten erhält man zunächst ein Thermogramm, bei dem die Leistung (in $\mu\text{cal/s}$), die nach jeder Injektion aufgewendet wird, um die beiden Zellen auf derselben Temperatur zu halten, gegen die Zeit aufgetragen wird (Abbildung 39a). Dabei entspricht jeder Ausschlag der Messkurve einer Gastinjektion, bei der es zu einer Kompensation der Wärmemengenänderung zwischen den beiden Zellen kommt, sodass das Signal wieder in seine Ausgangsposition zurückkehrt. Im Verlauf der Titration nimmt der Anteil des bereits gebildeten Wirt-Gast-Komplexes stetig zu, sodass bei den Injektionen immer weniger Komplexe neu gebildet werden, was mit einer Abnahme der Wärmemengenänderung einhergeht. Am Ende der Messung liegt der Gast im Überschuss vor und es wird eine Sättigung erreicht, sodass sich die Flächen der Ausschläge nicht mehr ändern, da sie lediglich die Verdünnungswärme widerspiegeln, die mit jeder Gastinjektion verbunden ist. Die Fläche der einzelnen Ausschläge kann mit der Enthalpie ΔH^0 korreliert werden.

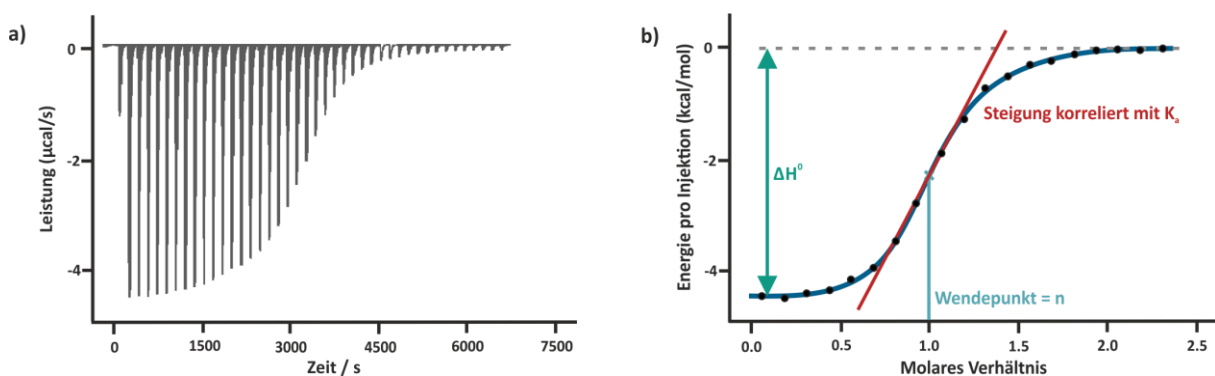


Abbildung 39: a) Thermogramm einer ITC-Messung und b) die sich daraus ergebende Bindungsisotherme aus der die angegebenen Größen abgeleitet werden können

Zur Auswertung der Messung werden die Flächen gegen den Molenbruch aus Rezeptor und Liganden aufgetragen (Abbildung 39b). Im Idealfall resultiert aus dieser Auftragung eine

sigmoidale Kurve, aus deren Verlauf durch nicht-lineare Regression die Komplexbildungsenthalpie ΔH^0 , die Bindungskonstante K_a sowie die Komplexstöchiometrie n bestimmt werden kann.

Mit den aus der Messung direkt ermittelten Parametern kann mit Hilfe der van't-Hoff-Gleichung (1) die freie Komplexbildungsenthalpie ΔG^0 berechnet werden.

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K_a \quad (1)$$

- ΔG^0 freie Komplexbildungsenthalpie
- R allgemeine Gaskonstante
- T Temperatur
- K_a Bindungskonstante.

Die Komplexbildungsentropie ΔS^0 ergibt sich aus der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (2).^[64,65]

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad (2)$$

- ΔH^0 Komplexbildungsenthalpie
- ΔS^0 Komplexbildungsentropie.

Ergebnisse der ITC-Messungen

Die ITC-Messungen mit dem dreifach verbrückten **BCP E** und dem einfach verbrückten Analogon **BCP F** wurden in 67 Vol.-% Acetonitril/Wasser durchgeführt und dienen zur Quantifizierung der Sulfat- und Iodidaffinität beider Rezeptoren. Diese Anionen wurden gewählt, da sie typischerweise am stärksten von BCPs gebunden werden und ein Vergleich der Ergebnisse mit denen aus vorangegangenen Arbeiten möglich war. Da es sich bei Iodid um ein schwach koordinierendes, sphärisches Anion handelt und bei Sulfat um ein stark koordinierendes, tetraedrisches Oxoanion, konnte zudem evaluiert werden, wie sich die Natur des Anions auf die thermodynamische Signatur des Bindungsvorgangs auswirkt.

Das Thermogramm und die resultierende Bindungsisotherme der Titration von **BCP E** mit Natriumiodid ist beispielhaft in Abbildung 40 gezeigt.

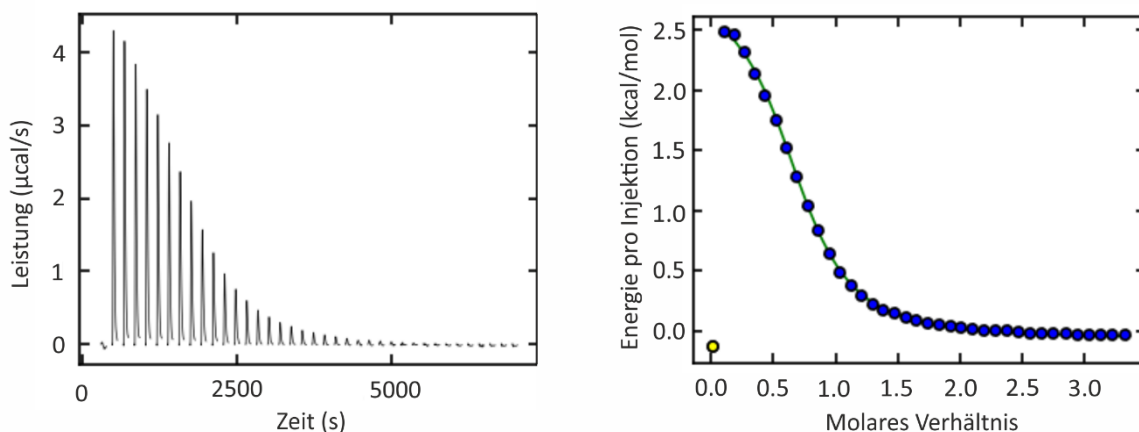


Abbildung 40: ITC-Thermogramm der Titration von **BCP E** (0.35 mM) mit Natriumiodid (7.0 mM) in 67 Vol.-% Acetonitril/Wasser bei 298 K (links) und daraus erhaltene Bindungsisotherme (rechts)

Die Ergebnisse der ITC-Titrations sind in Tabelle 7 zusammengefasst, wobei die angegebenen Werte stets Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen sind.

Tabelle 7: Mittels ITC bestimmte Stöchiometriefaktoren n , Bindungskonstanten $\log K_a$, sowie freie Komplexbildungsenthalpien ΔG^0 , Komplexbildungsenthalpien ΔH^0 und -entropien $T \cdot \Delta S^0$ für die Komplexbildung des **BCPs E** und **BCPs F** mit Iodid und Sulfat^a

Anion		BCP E	BCP F
I ⁻	n	0.79 ± 0.02	
	$\log K_a$	4.45 ± 0.02	
	ΔG^0	-25.4 ± 0.3	/ ^b
	ΔH^0	13.5 ± 0.2	
	$T \cdot \Delta S^0$	38.9 ± 0.4	
SO ₄ ²⁻	n	0.91 ± 0.04	1.08 ± 0.02
	$\log K_a$	6.72 ± 0.03	4.32 ± 0.03
	ΔG^0	-38.3 ± 0.2	-24.6 ± 0.1
	ΔH^0	22.2 ± 0.3	16.2 ± 0.6
	$T \cdot \Delta S^0$	60.5 ± 0.5	40.8 ± 0.5

^a $T = 298$ K, Iodid und Sulfat als Natriumsalze, 67 Vol.-% Acetonitril/Wasser, Energien in kJ/mol, die angegebenen Werte sind Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen mit Standardabweichung; ^b nicht bestimmbar aufgrund zu geringer Wärmetönung

Für das dreifach verbrückte **BCP E** konnte auf diese Weise die Komplexbildung mit Iodid und Sulfat charakterisiert werden. Für das einfach verbrückte Derivat **BCP F** hingegen war auf diesem Weg lediglich die Charakterisierung der Sulfatbindung möglich. Die Bindung von Iodid an **BCP F** war praktisch athermisch, sodass eine Auswertung der betreffenden ITC-Titration nicht möglich war. Daher wurde die Stabilität dieses Komplexes mit Hilfe einer NMR-Titration bestimmt.

NMR-Titration

Hintergrund

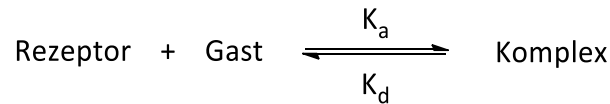
Bei einer NMR-Titration wird die Verschiebung eines oder mehrerer Signale im NMR-Spektrum des Rezeptors oder des Gastes verfolgt, die durch die Komplexbildung verursacht wird. Voraussetzung ist also, dass das Gleichgewicht der Komplexbildung schnell auf der NMR-Zeitskala ist.

Experimentell werden eine Reihe von NMR-Proben vorbereitet, bei denen beispielsweise die Rezeptorkonzentration konstant gehalten wird, während die Gastkonzentration variiert wird. Das Ausmaß der chemischen Verschiebung des beobachteten Signals ist proportional zur Konzentration des Komplexes, wobei der mathematische Zusammenhang in Gleichung (3) gilt, wenn ein Rezeptorsignal verfolgt wird.

$$\frac{\delta - \delta_0}{\delta_{max} - \delta_0} = \frac{[K]}{[R]_0} \quad (3)$$

δ	chemische Verschiebung des beobachteten Rezeptorsignals
δ_0	chemische Verschiebung des Rezeptorsignals vor der Titration
δ_{max}	chemische Verschiebung des entsprechenden Rezeptorsignals im Komplex
$[K]$	Konzentration des Komplexes
$[R]_0$	Ausgangskonzentration des Rezeptors

Berücksichtigt man für die Gleichgewichtsreaktion der Bildung eines 1:1-Komplexes den in Schema 16 dargestellten Zusammenhang und das dafür gültige Massenwirkungsgesetz in Gleichung (4), kann dieser Ausdruck nach der Konzentration des Komplexes $[K]$ aufgelöst werden, sodass Gleichung (5) erhalten wird.



Schema 16: Gleichgewichtsreaktion der Komplexbildung

$$K_a = \frac{[K]}{[R] \cdot [G]} = \frac{[K]}{([R]_0 - [K]) \cdot ([G]_0 - [K])} \quad (4)$$

- K_a Komplexbildungskonstante
- $[R]$ Konzentration des Rezeptors
- $[G]$ Konzentration des Gasts
- $[G]_0$ Ausgangskonzentration des Gasts

$$[K] = \frac{[R]_0 + [G]_0 + K_a^{-1}}{2} - \sqrt{\frac{([R]_0 + [G]_0 + K_a^{-1})^2}{4} - [R]_0 \cdot [G]_0} \quad (5)$$

Durch Einsetzen von Gleichung (5) in Gleichung (3) ergibt sich nach Umformung Gleichung (6).

$$\delta - \delta_0 = \frac{\delta_{max} - \delta_0}{[R]_0} \left(\frac{[R]_0 + [G]_0 + K_a^{-1}}{2} - \sqrt{\frac{([R]_0 + [G]_0 + K_a^{-1})^2}{4} - [R]_0 \cdot [G]_0} \right) \quad (6)$$

In dieser Gleichung sind δ_{max} und K_a unbekannte Größen, die mit Hilfe Computer-basierter Auswertprogramme durch nicht-lineare Regression, d.h. dem Anfitzen der berechneten an die experimentelle Bindungsisotherme, bestimmt werden können.^[65,66]

Ergebnisse der NMR-Titration

Die in der NMR-Titration von **BCP F** mit Natriumiodid erhaltene Serie von Spektren ist in Abbildung 41 gezeigt. Als Lösungsmittel wurde 67 Vol.-% MeCN- d_3 /D $_2$ O gewählt, um einen Vergleich des Ergebnisses mit den Ergebnissen der ITC-Titrationen zu ermöglichen.

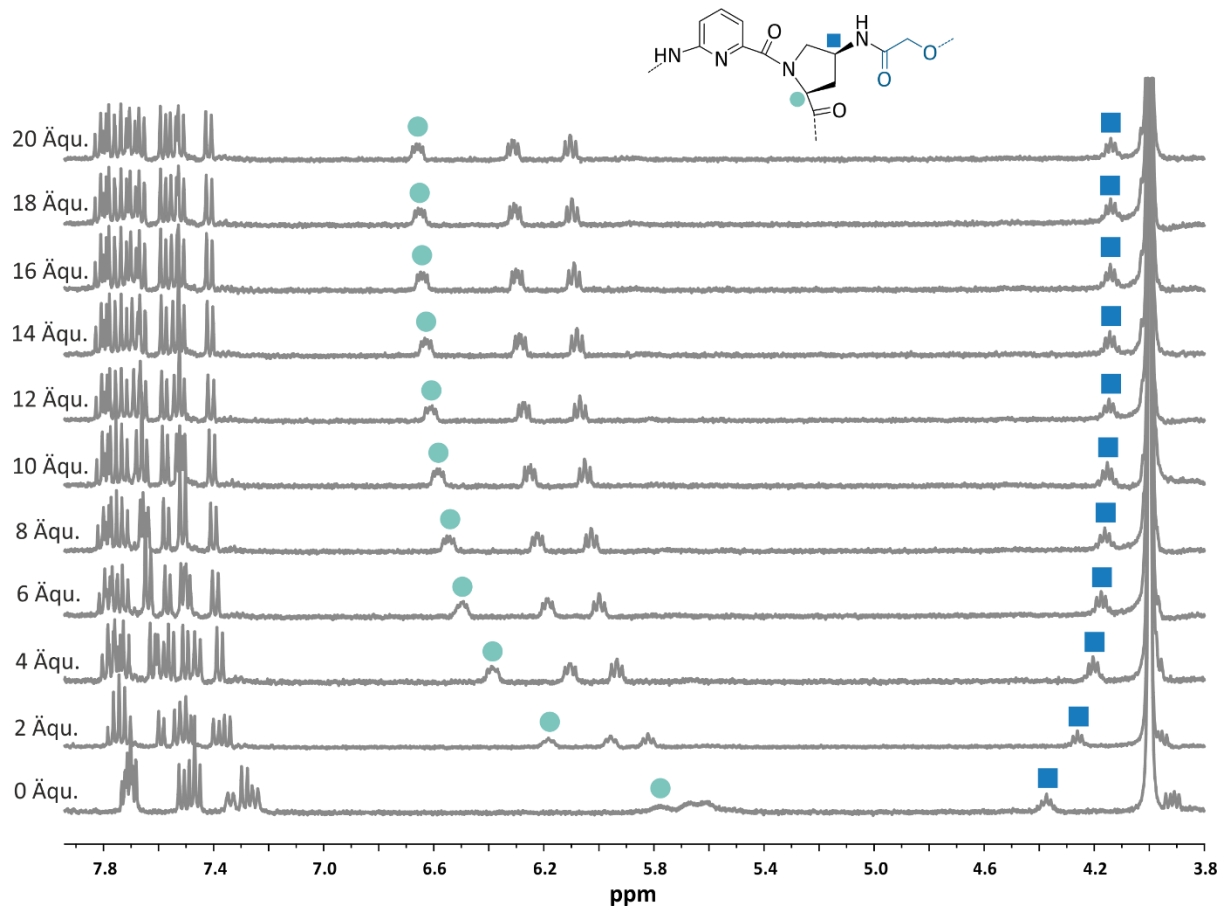


Abbildung 41: Ausschnitte der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der NMR-Titration von **BCP F** (0.5 mM) mit Natriumiodid (400 MHz, 25 °C, 67 Vol.-% MeCN- d_3 /D $_2$ O)

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurde die chemische Verschiebung der Aminoprolin- C_α -Protonen (●) und der Aminoprolin- C_γ -Protonen (■) verfolgt.

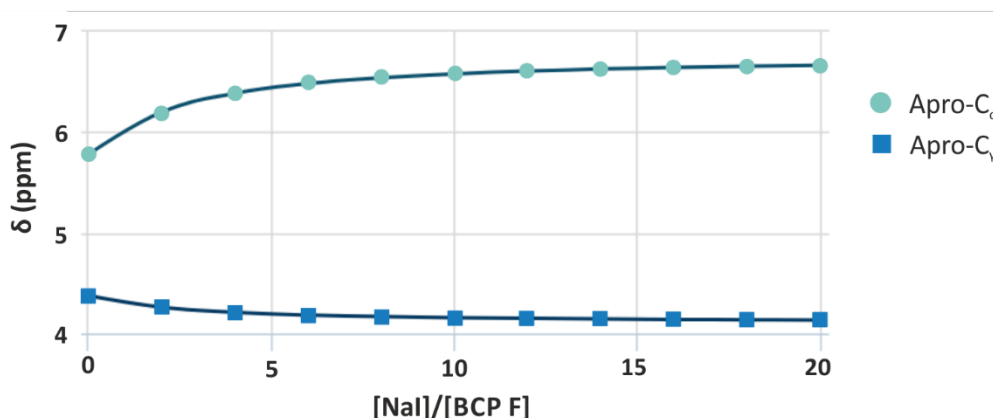


Abbildung 42: Bindungsisotherme, die die Veränderung der Signale der Aminoprolin C_{α} -Protonen und der Aminoprolin C_{γ} -Protonen während der Titration beschreiben. Die Punkte zeigen die experimentellen Werte und die Linie den Fit der Daten an das mathematische Modell eines 1:1 Komplexes

Die nicht lineare Regression der so erhaltenen Bindungsisothermen (Abbildung 42) ergab eine Bindungskonstante $\log K_a$ des Iodidkomplexes von **BCP F** von 2.98 ± 0.01 . Weitere thermodynamische Parameter der Komplexbildung können aus NMR-Titrationen nicht abgeleitet werden.

Diskussion der quantitativen Bindungsstudien

Die mittels ITC-Titrationen und einer NMR-Titration für die Iodid- und Sulfatkomplexe von **BCP E** und **BCP F** ermittelten thermodynamischen Daten sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Zum Vergleich enthält diese Tabelle auch Daten, die zuvor für Komplexe anderer BCPs (Abbildung 43) ermittelt wurden.

Tabelle 8: Bindungskonstanten $\log K_a$, sowie freie Komplexbildungsenthalpien ΔG^0 , Komplexbildungs-enthalpien ΔH^0 und -entropie $T \cdot \Delta S^0$ der Iodid- und Sulfatkomplexe verschiedener BCP-Rezeptoren^a. [29,30,46]

Rezeptor	Anion	$\log K_a$	ΔG^0	ΔH^0	$T \cdot \Delta S^0$
BCP E ^b	I ⁻	4.45	-25.4	13.5	38.9
	SO ₄ ²⁻	6.72	-38.3	22.2	60.5
BCP F	I ⁻	2.98	/	/	/ ^c
	SO ₄ ²⁻	4.32	-24.6	16.2	40.8 ^b

Rezeptor	Anion	log K_a	ΔG^0	ΔH^0	$T \cdot \Delta S^0$
R5 ^d	I ⁻	4.05	-23.1	-8.30	14.8
	SO ₄ ²⁻	5.75	-32.8	9.70	42.5
R6 ^e	I ⁻	4.89	-27.9	-18.7	9.20
	SO ₄ ²⁻	6.78	-38.6	2.80	41.4
R7 ^e	I ⁻	6.04	-34.4	-12.7	21.7
	SO ₄ ²⁻	8.67	-49.5	9.60	59.1
R9 ^f	I ⁻	3.45	-19.7	-16.0	3.70
	SO ₄ ²⁻	4.96	-28.4	-13.5	14.9
R10 ^f	I ⁻	3.85	-21.9	1.10	23.1
	SO ₄ ²⁻	5.70	-32.6	10.1	42.7

^a $T = 298\text{ K}$, Energien in kJ/mol: ^b Anionen als Natriumsalze, 67 Vol.-% Acetonitril/Wasser; ^c mittels NMR-Titration bestimmt, Anion als Natriumsalz, 67 Vol.-% MeCN-d₃/D₂O; ^d Anionen als Kaliumsalze, Acetonitril/Wasser = 2/1 (v/v); ^e Sulfat als Natriumsalz, Iodid als Kaliumsalz, 67 Vol.-% Acetonitril/Wasser; ^f Anion als Natriumsalz, 50 Vol.-% Methanol/Wasser).

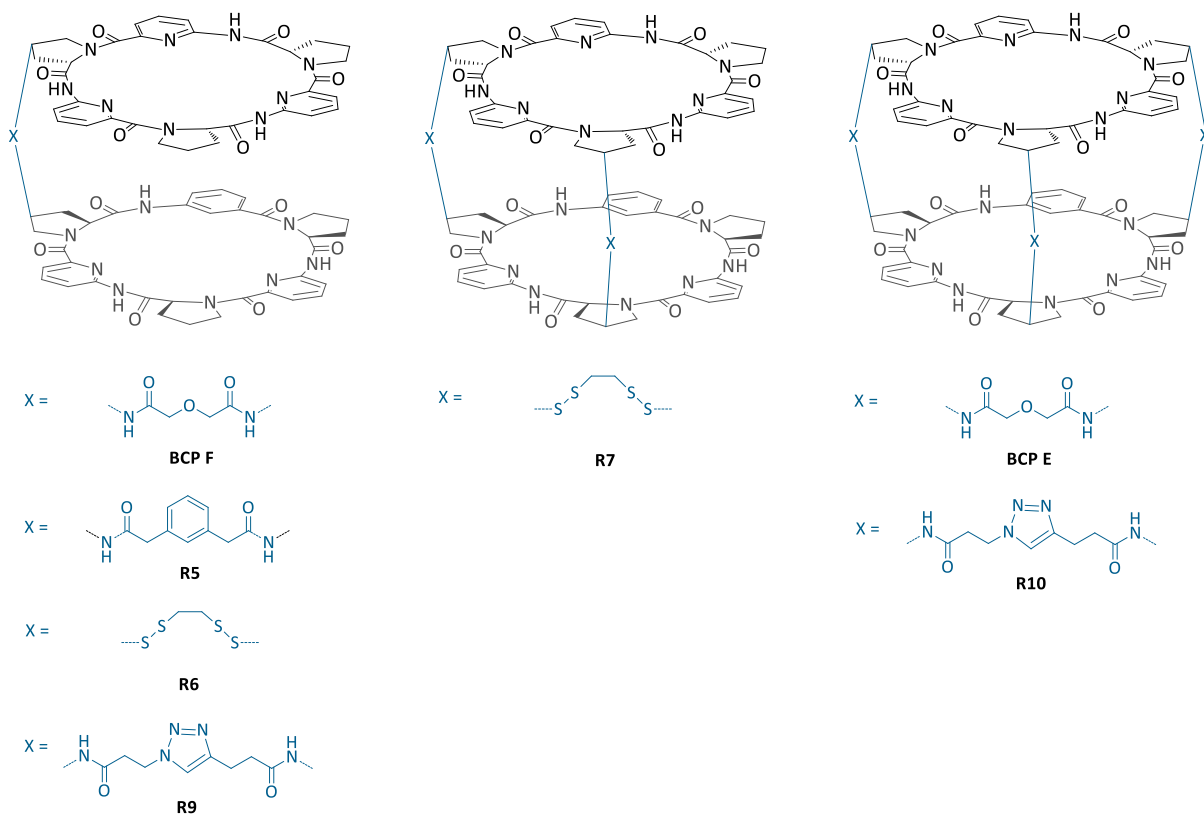


Abbildung 43: Übersicht der Strukturen der BCPs, deren thermodynamische Daten der Iodid- und Sulfatkomplexbildung verglichen werden

Die ermittelten Stöchiometriefaktoren der ITC-Titrations zeigen, dass sowohl **BCP E** als auch **BCP F** mit Iodid und Sulfat erwartungsgemäß 1:1 Komplexe bilden. Die Sulfatkomplexe sind im Einklang mit den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten um ein bis zwei Größenordnungen stabiler als die Iodidkomplexe, was vermutlich hauptsächlich auf die höhere Ladung des Sulfatanions zurückzuführen ist und die Tatsache, dass Sulfat das stärker koordinierende Anion ist. Das dreifach verbrückte **BCP E** bindet beide Anionen stärker als das einfach verbrückte Analogon **BCP F**. So wird Sulfat von **BCP E** mit einem $\log K_a$ von 6.72 und damit um circa 2.5 Größenordnungen stärker als von **BCP F** gebunden, dessen Sulfatkomplex einen $\log K_a$ von 4.32 besitzt. Für Iodid ist eine ähnliche Tendenz zu beobachten, allerdings beträgt der Unterschied der Bindungskonstanten in diesem Fall nur 1.5 Größenordnungen. Die drei Linker in **BCP E** wirken sich also sehr vorteilhaft auf die Anionenaffinität aus, was unter anderem auf die bessere Vororganisation des Rezeptors und die effektivere Abschirmung des Anions in der Kavität vom umgebenden Lösungsmittel zurückgeführt werden kann.

Auffällig ist, dass sowohl die Iodid- als auch die Sulfatbindung beider BCPs endotherm verläuft. Dieses Ergebnis ist zum Teil in Einklang mit dem Ergebnis vorangegangener Untersuchungen, ^[29,30,46] die zeigten, dass diese thermodynamische Signatur typisch für das verwendete Lösungsmittelgemisch ist und durch die bevorzugte Solvatisierung der Anionen durch Wassermoleküle in 67 Vol.-% Acetonitril/Wasser hervorgerufen wird.^[60,67] Die für die Komplexbildung nötige Desolvatisierung der Anionen ist darum enthalpisch aufwendig, was sich wiederum nachteilig auf die Komplexbildungsenthalpie auswirkt. Der bei **BCP E** und **BCP F** beobachtete besonders stark ausgeprägte endotherme Verlauf der Komplexbildung ist jedoch überraschend und könnte zusätzlich damit erklärt werden, dass die Linker in diesen BCPs ähnlich wie bei Derivaten mit Triazol-haltigen Linkern (**R9** und **R10**) energetisch ungünstige Konformationen annehmen müssen. Für diese Annahme spricht, dass die Sulfatbindung in **BCP E** mit drei Linkern, deutlich endothermer verläuft als bei **BCP F** mit nur einem Linker.

Der ungünstige enthalpische Beitrag wird in allen Fällen durch einen sehr günstigen entropischen Beitrag überkompensiert, sodass letztendlich hohe Bindungskonstanten resultieren. Diese günstigen Entropiebeiträge zur Komplexbildung sind zumeist auf die Freisetzung von Lösungsmittelmolekülen, beispielsweise aus der Solvathülle des unkomplexierten Rezeptors oder aus der des Anions, während des Komplexierungsvorgangs zurückzuführen. Die daraus resultierenden günstigen Beiträge zur Entropie sind wesentlich

größer als die ungünstigen, die aus der Verringerung der konformativen Flexibilität des Rezeptors resultieren. Aus dem direkten Vergleich der Entropiewerte der Sulfatbindung von **BCP E** und **BCP F** wird deutlich, dass sich die Erhöhung der Linkeranzahl signifikant im Entropiebeitrag niederschlägt, welcher im Falle des dreifach verbrückten Derivats um circa 20 kJ/mol günstiger ist. Hierfür könnte die bessere Vororganisation von **BCP E** verantwortlich sein. So sind die beiden CP-Ringe bereits vor der Anionenkomplexierung in einer sandwichartigen Anordnung zueinander fixiert, wodurch bei Komplexbildung weniger Freiheitsgrade aufgegeben werden müssen.

Das einfach verbrückte BCP **R5** mit 1,3-Phenylendiessigsäure als Linker bindet Iodid und Sulfat ($\log K_a$ 4.05 bzw 5.75)^[30] jeweils um eine Größenordnung besser als das einfach verbrückte **BCP F** ($\log K_a$ 2.98 bzw 4.32). Zudem verläuft bei **R5** die Iodidbindung exotherm und die Sulfatbindung schwächer endotherm als bei **BCP F** und ist somit enthalpisch günstiger. Dies deutet an, dass Diglycolsäure ein schlechterer Linker für einfach verbrückte BCPs darstellt als 1,3-Phenylendiessigsäure. Dennoch besitzt das dreifach verbrückte Derivat **BCP E** die höchste Sulfataffinität, die bislang für Amid-verbrückte BCPs beobachtet wurde. Die Bindungskonstante $\log K_a$ von 6.72 ist aber niedriger als die der einfach und zweifach-Disulfid-verbrückten BCPs **R6** ($\log K_a$ 6.78) und **R7** ($\log K_a$ 8.67), deren Affinitäten zum jetzigen Zeitpunkt unerreicht bleiben.^[46]

Ein Vergleich der Eigenschaften von **BCP E** und **BCP F** mit denen der vormals beschriebenen BCPs **R9** und **R10** mit Triazol-haltigen Linkern, wird dadurch erschwert, dass die ITC-Messungen in Methanol/Wasser durchgeführt wurden. Ein qualitativer Vergleich ist dennoch möglich. Die nur geringfügig höhere Anionenaffinität des dreifach verbrückten BCPs **R10** gegenüber dem einfach verbrückten Analogon **R9** wurde im Wesentlichen darauf zurückgeführt, dass die recht langen Linker in **R10** energetisch ungünstige Konformationen im Komplex annehmen müssen. Im Vergleich dazu sind die von Diglycolsäure abgeleiteten Linker in **BCP E** und **BCP F** wesentlich kürzer und somit besser dazu in der Lage, die beiden CP-Ringe vorzuorganisieren. Auch wenn mit Diglycolsäure noch nicht die ideale Linkerstruktur gefunden ist, führt diese Vororganisation dazu, dass die Sulfataffinität beim Übergang von dem einfach zu dem dreifach verbrückten **BCP E** um mehr als zwei Größenordnungen steigt und nicht nur um eine wie im Fall von **R10**.

Das dreifach verbrückte **BCP E** zeigt also in einem Acetonitril/Wasser Gemisch eine ausgeprägte Affinität für Iodid und Sulfat, wobei die Sulfataffinität höher ist als die anderer bekannter Amid-verbrückter BCPs. Dieser Befund ist unter anderem auf die Anwesenheit der drei Linker zurückzuführen. Allerdings zeigt der Vergleich der Bindungseigenschaften von **BCP F** mit denen von **R5**, dass Diglycolsäure als Linker nicht ideal ist. Eine weitere strukturelle Variation der Linker könnte Abhilfe schaffen, wobei in diesem Zusammenhang auch Linker berücksichtigt werden sollten, die die Wasserlöslichkeit der BCPs erhöhen.

2.3.3.3 Kinetik der Komplexbildung

Um qualitative Informationen über die Dynamik des Anionenaustausches von **BCP E** zu erhalten, wurde eine Lösung des Rezeptors in 67 Vol.-% MeCN- d_3 /D $_2$ O mit 0.5 Äquivalenten NaCl, NaBr, NaI und Na $_2$ SO $_4$ versetzt und die jeweiligen 1 H-NMR-Spektren aufgenommen (Abbildung 44).

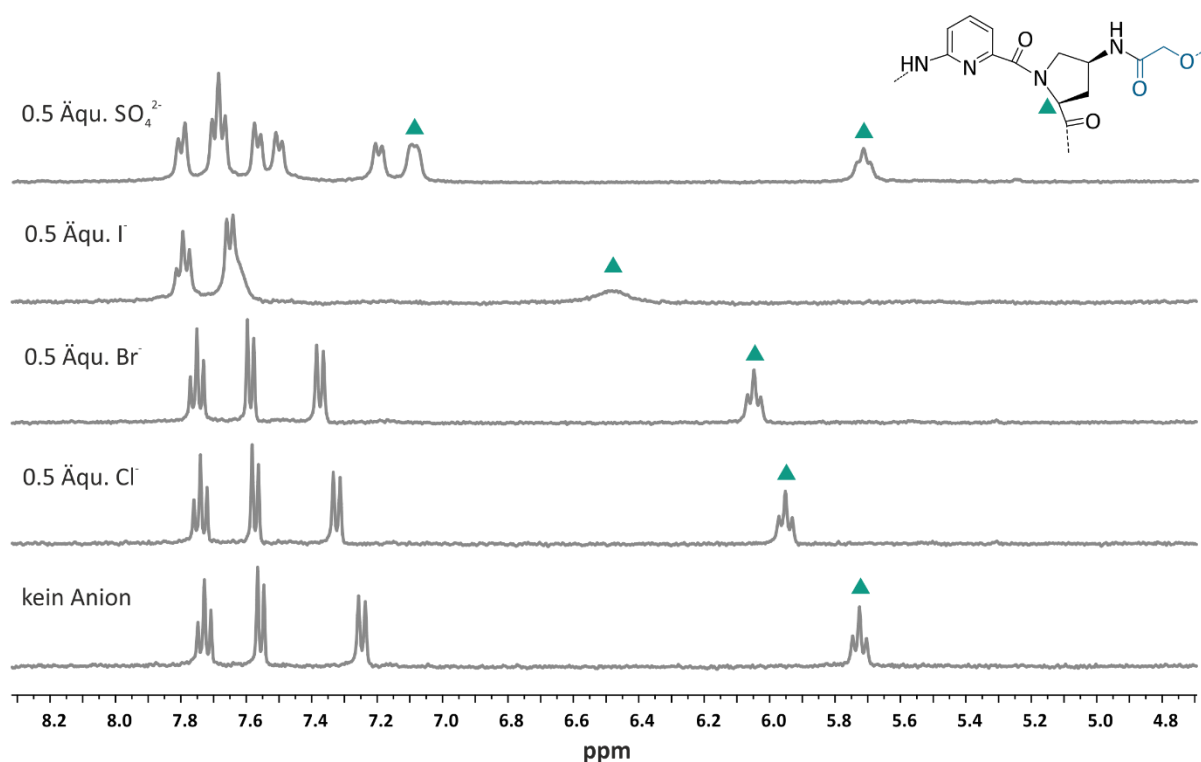


Abbildung 44: Ausschnitte der 1 H-NMR-Spektren von **BCP E** (1 mM) ohne Anion und mit jeweils einem halben Äquivalent der Halogenide und Sulfat als Natriumsalze (400 MHz, 25 °C, 67 Vol.-% MeCN- d_3 /D $_2$ O)

Die Spektren zeigen, dass es bei Zugabe des Chlorid- und des Bromidsalzes zu einer Tieffeldverschiebung der Signale der Aminoprolin-C $_{\alpha}$ -Protonen (\blacktriangle) kommt, die Signale dabei aber scharf bleiben. Die Iodidzugabe hingegen führt zu einem Spektrum mit stark verbreiterten Signalen und schließlich wird nach Sulfatzugabe ein doppelter Signalsatz beobachtet, wobei einer dem Spektrum des freien **BCPs E** zugeordnet werden kann und der andere dem Spektrum des Sulfatkomplexes.

Im Falle von Sulfat ist die Dynamik des Anionenaustausches also, wie bereits in den Untersuchungen zur Überführung von **BCP E** · Na $_2$ SO $_4$ in die salzfreie Form beobachtet wurde,

langsam auf der NMR-Zeitskala. Dies wurde durch Aufnahme weiterer NMR-Spektren von Proben, die 0.25 Äquivalente und 1.0 Äquivalent Natriumsulfat enthielten, bestätigt (Abbildung 45).

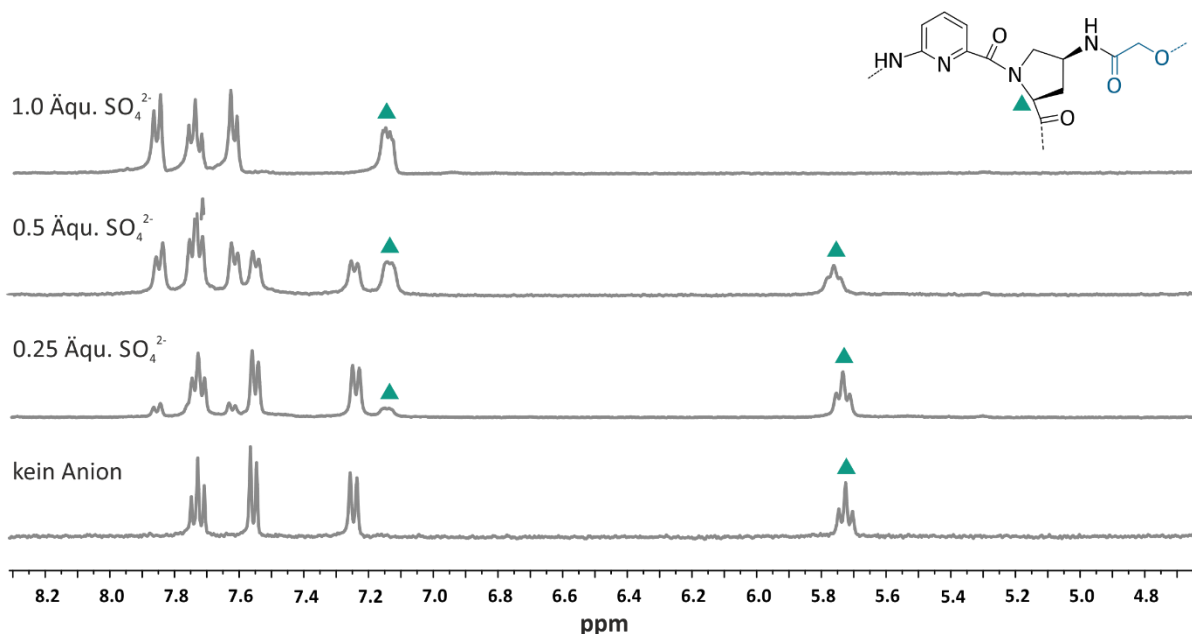


Abbildung 45: Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren von **BCP E** (1 mM) ohne Anion und mit unterschiedlichen Äquivalenten Natriumsulfat (400 MHz, 25 °C, 67 Vol.-% $\text{MeCN-d}_3/\text{D}_2\text{O}$)

Bereits die Zugabe 0.25 Äquivalenten Natriumsulfat führt zum Auftreten eines zweiten Signalsatzes, dessen Signale mit Erhöhung der Sulfatmenge kontinuierlich an Intensität gewinnen, bis in Gegenwart von 1.0 Äquivalenten Natriumsulfat der alleinige Signalsatz des Sulfatkomplexes vorliegt.

EXSY-NMR

Hintergrund

Die langsame Gleichgewichtseinstellung im Falle der Sulfatkomplexierung eröffnete die Möglichkeit, die Geschwindigkeitskonstante der Dekomplexierung mittels 2D- ^1H - ^1H -EXSY-NMR-Spektroskopie (**EX**change **S**pectroscop**Y**) zu ermitteln.

Für die Aufnahme von 2D-EXSY-Spektren wird dieselbe Pulsfolge verwendet wie für die Aufnahme von 2D-NOESY-Spektren (**N**uclear **O**verhauser-**E**nhancement **S**pectroscop**Y**). Im Gegensatz zur NOESY-Messung wird während der Mischzeit bei der EXSY-Messung kein Magnetisierungstransfer zwischen zwei sich räumlichen nahen Dipolen verfolgt, sondern ein Magnetisierungstransfer, der auf dem chemischen Austausch zweier Protonen beruht. Damit diese Methode angewendet werden kann, muss der zu untersuchende Austauschprozess langsam auf der NMR-Zeitskala sein (jedoch nicht zu langsam, da ansonsten störende Relaxationsprozesse eintreten), sodass zwei getrennte Signale der austauschenden, wechselwirkenden Spezies beobachtet werden können. Der Magnetisierungstransfer zwischen diesen beiden Spezies/Signalen äußert sich in den 2D-Spektren im Auftreten von Kreuzsignalen der beobachteten Protonen. Zur quantitativen Auswertung der EXSY-Messungen müssen Spektren bei verschiedenen Mischzeiten τ_m aufgenommen werden. Die erste Messung erfolgt bei einer Mischzeit mit $\tau_m = 0$, sodass während der Messung kein Austausch stattfinden kann. Diese Messung dient als Referenzmessung zur Normalisierung der weiteren Messungen. Nachfolgende Messungen werden bei unterschiedlichen Mischzeiten τ_m (typischerweise zwischen 10 und 1000 ms) durchgeführt, um die optimale Mischzeit zu bestimmen, bei der das Volumen der Kreuzsignale maximal ist. Die Wahl der optimalen Mischzeit τ_m ist zwar zeitintensiv, aber wichtig, da bei einer zu kurzen Mischzeit der magnetische Transfer nicht intensiv genug ist und bei einer zu langen Mischzeit durch Relaxation eine starke Intensitätsabnahme verzeichnet wird. Beide Fälle würden bei der nachfolgenden Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten zu signifikanten Fehlern führen. Ist die optimale Mischzeit τ_m gefunden, können die Peakvolumina der Diagonal- und Kreuzsignale aus dem erhaltenen zweidimensionalen Spektrum bestimmt werden. Über Gleichung (7) sind die Peakvolumina mathematisch mit den Magnetisierungs-

geschwindigkeitskonstanten k^* , den Magnetisierungsgeschwindigkeiten und der Mischzeit τ_m verknüpft.

$$A = \exp(-R\tau_m) \quad (7)$$

- A Matrix, welche die Volumina der Diagonal- und Kreuzpeaks der Messung bei der optimalen Mischzeit enthält, normalisiert durch die Diagonalvolumina der Referenzmessung bei einer Mischzeit von 0 ms
- R Austauschmatrix, welche die zu bestimmenden Magnetisierungsgeschwindigkeitskonstanten enthält
- τ_m Mischzeit

Mit Hilfe von Gleichung (8) wird durch ein Matrix-Eigenwert/-vektor-Verfahren die Austauschmatrix R bestimmt.

$$R = \frac{-X(\ln D)X^{-1}}{\tau_m} \quad (8)$$

- X Matrix der Eigenvektoren von A
- D Matrix der Eigenwerte von A

Für die Auswertung der Spektren wurde im Rahmen dieser Arbeit das Auswerteprogramm EXSYCalc^[68] verwendet, welches die Lösung der Austauschmatrix in Form der Matrix (9) liefert, die die Magnetisierungsgeschwindigkeitskonstanten als Außerdiagonalelemente enthält.

$$R = \begin{vmatrix} -R_1 - k_{in}^* & k_{out}^* \\ k_{in}^* & -R_2 - k_{out}^* \end{vmatrix} \quad (9)$$

- k_{in}^* Magnetisierungsgeschwindigkeitskonstante der Komplexierung
- k_{out}^* Magnetisierungsgeschwindigkeitskonstante der Dekomplexierung

Die Werte für die Magnetisierungsgeschwindigkeitskonstanten korrelieren mit den Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion, wobei aber berücksichtigt werden muss, dass die durch das Auswerteprogramm bestimmten Magnetisierungsgeschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung sind. Dies hat zur Folge, dass nur der Wert für die Geschwindigkeitskonstante der Dekomplexierung k_{out} direkt übernommen werden kann, da es sich nur hierbei um einen unimolekularen Prozess handelt, wohingegen die Komplexierung bimolekular ist.^[69]

Ergebnisse der EXSY-NMR-Messungen

Für die 2D- ^1H - ^1H -EXSY-NMR-Messungen wurde eine Lösung von **BCP E** in 67 Vol.-% MeCN- d_3 /D $_2$ O verwendet, die 0.5 Äquivalente Natriumsulfat enthielt. Für die Auswertung wurden die Kreuzsignale der Aminoprolin- C_α -H-Signale verwendet, da diese Signale am stärksten durch die Anionenkomplexierung beeinflusst werden. Zudem sind sie im Spektrum gut isoliert, sodass die Peakvolumina zuverlässig bestimmt werden können. Die erste Messung wurde bei einer Mischzeit von $\tau_m = 0$ ms ohne Austausch durchgeführt, um das Referenzspektrum mit den Diagonalsignalen A_0 und B_0 zu erhalten (Abbildung 46).

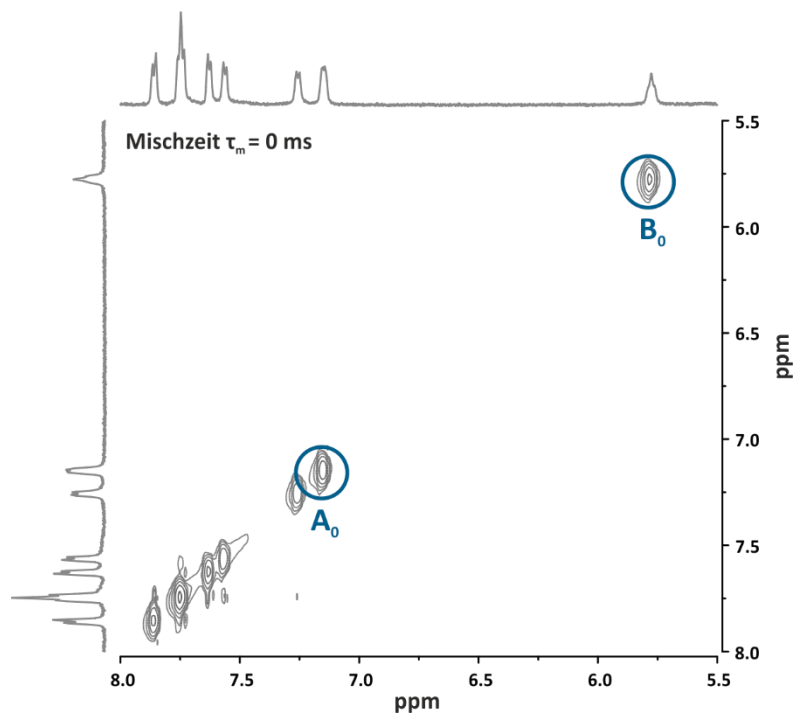


Abbildung 46: Ausschnitt des 2D- ^1H - ^1H -EXSY-NMR-Spektrum von **BCP E** mit 0.5 Äqu. Na_2SO_4 bei einer Mischzeit von $\tau_m = 0$ ms (600 MHz, 25 °C, 67 Vol.-% MeCN- d_3 /D $_2$ O)

Anschließend wurden weitere Messungen bei verschiedenen Mischzeiten τ_m (30 ms, 60 ms, 90 ms, 150 ms, 250 ms, 500 ms) durchgeführt. In Abbildung 47 ist exemplarisch das Spektrum bei einer Mischzeit von $\tau_m = 250$ ms abgebildet, wobei die Diagonal- und Kreuzpeaks, die zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten herangezogen wurden, markiert sind.

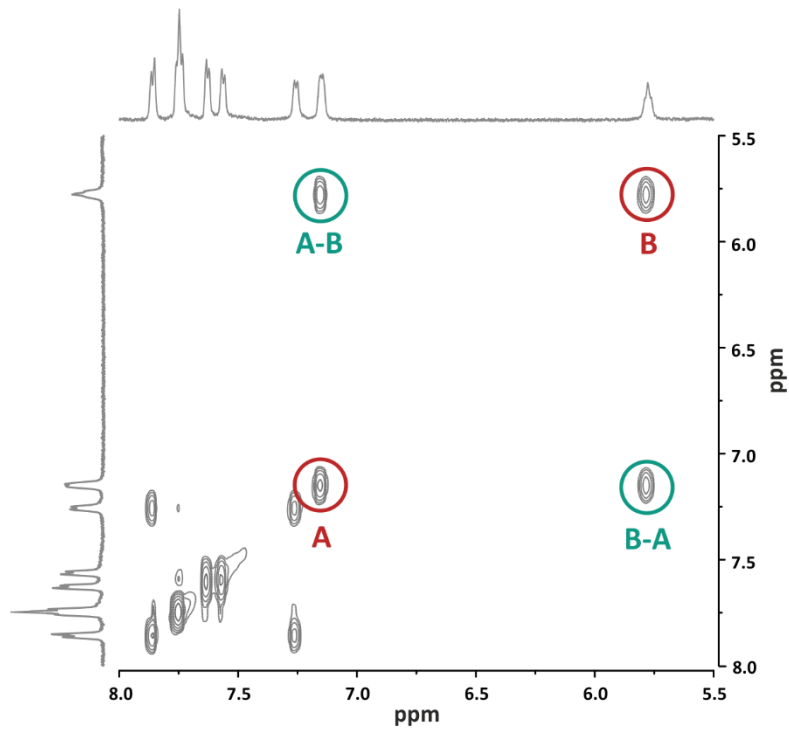


Abbildung 47: Ausschnitt des 2D- ^1H - ^1H -EXSY-NMR-Spektrum von **BCP E** mit 0.5 Äqu. Na_2SO_4 bei einer Mischzeit von $\tau_m = 250 \text{ ms}$ (600 MHz, 25 °C, 67 Vol.-% MeCN- d_3 / D_2O)

Zur Bestimmung der optimalen Mischzeit wurden die Peakvolumina der Kreuzsignale A-B bzw. B-A durch die in der Referenzmessung bestimmten Peakvolumina der Diagonalsignale A_0 und B_0 geteilt und die Ergebnisse gegen die dazugehörigen Mischzeiten aufgetragen.

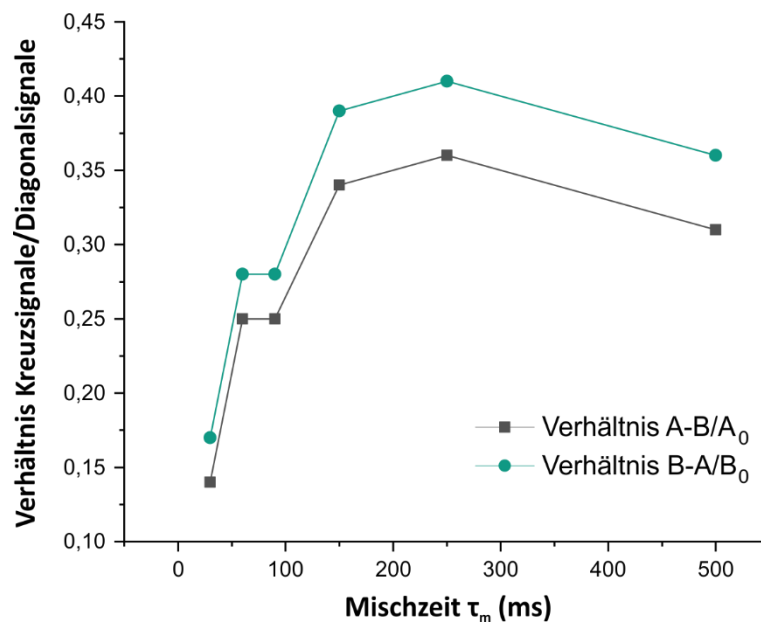


Abbildung 48: Auftragung der Volumenverhältnisse von Kreuz- zu Diagonalsignalen gegen die Mischzeit τ_m

Diese Auftragung ergab ein Maximum der Verhältnisse bei einer Mischzeit von 250 ms. Bei dieser Mischzeit wurde mittels EXSYCalc, die in (10) gezeigte Lösung der Matrix R erhalten.

$$R = \begin{vmatrix} -4.814 & 5.126 \\ 4.188 & 5.832 \end{vmatrix} \quad (10)$$

Somit ergab sich die Magnetisierungsgeschwindigkeitskonstante und damit die gesuchte Geschwindigkeitskonstante der Dekomplexierung zu $k_{out} = 5.1 \text{ s}^{-1}$.

Mit Hilfe der Eyring-Gleichung (11) wurde die entsprechende freie Aktivierungsenthalpie ΔG_{out}^\ddagger zu 68.9 kJ/mol berechnet.

$$\Delta G_{out}^\ddagger = -RT \cdot \ln \frac{hk_{out}}{k_B T} \quad (11)$$

ΔG_{out}^\ddagger freie Aktivierungsenergie der Dekomplexierung

R allgemeine Gaskonstante

T Temperatur

h Planck'sches Wirkungsquantum

k_{out} Geschwindigkeitskonstanten der Dekomplexierung

k_B Boltzmann Konstante

Diskussion der kinetischen Untersuchungen

Die qualitativen ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen zur Kinetik der Komplexbildung zeigten, dass die Dynamik der Anionenkomplexierung von **BCP E** deutlich von der Natur des Anions abhängt. Die Komplexierung der wahrscheinlich schwächer gebundenen, kleineren Halogenide Chlorid und Bromid ist schnell auf der NMR-Zeitskala, da bei Zusatz einer substöchiometrischen Menge des jeweiligen Natriumsalzes zu einer Lösung von **BCP E** ein gemittelttes Spektrum aus dem des freien **BCPs E** und seines jeweiligen Anionenkomplexes mit

scharfen Signalen resultiert. Das Auftreten eines gemittelten Signalsatzes wird auch nach Iodidzugabe beobachtet, wobei in diesem Fall jedoch verbreiterte Signale auftreten, was auf eine verlangsamte Kinetik des Anionenaustausches hinweist. Bei Zugabe von Natriumsulfat zu **BCP E** werden hingegen zwei getrennte Signalsätze beobachtet, woraus geschlossen werden kann, dass die Dynamik der Komplexierung dieses stark gebundenen Anions langsam auf der NMR-Zeitskala ist (vgl. Abbildung 44).

Diese langsame Dynamik ermöglichte die Bestimmung der Dekomplexierungsgeschwindigkeit des Sulfatanions mittels 2D- ^1H - ^1H -EXSY-NMR-Spektroskopie. Die Geschwindigkeitskonstante der Dekomplexierung ergab sich zu $k_{\text{out}} = 5.1 \text{ s}^{-1}$, was gemäß der Eyring-Gleichung mit einer freien Aktivierungsenergie der Dekomplexierung von 69.7 kJ/mol korrelierte. Ein ähnliches k_{out} von 3.8 s^{-1} wurde in vorangegangenen Arbeiten für den Sulfatkomplex des Rezeptors **R10** mit Triazol-haltigen Linkern beobachtet.^[29] Die im Vergleich zu **R10** kürzeren Linker in **BCP E** beeinflussen die Geschwindigkeit der Freisetzung des Sulfations also nur wenig. Ähnlich hohe Geschwindigkeitskonstanten wurden für andere Käfig-artige Rezeptoren beobachtet, wie zum Beispiel hexamere Resorcinaren-basierte Kapseln^[70] oder auch für einen Cavitand-abgeleiteten Komplex^[71].

Die freie Aktivierungsenthalpie der Dekomplexierung $\Delta G_{\text{out}}^\ddagger$ deutet an, dass die Freisetzung des Sulfatanions aus dem Inneren der Kavität mit einem substantiellen Energiebetrag verbunden ist. Dieser ergibt sich wahrscheinlich aus gespannten, energiereichen Konformationen, die **BCP E** während der Dekomplexierung annehmen muss, um das Sulfatanion aus dem Inneren freizusetzen. Das Konzept, dass die Freisetzung des Gastes mit der Überwindung sterischer Barrieren verbunden ist, wurde ausgehend von seinen Untersuchungen zu den Eigenschaften von Carceranden von D. Cram mit dem Begriff *constrictive binding* verbunden.^[72] Angewendet auf **BCP E** ist die *constrictive binding energy* die Energie, die aufgebracht werden muss, um ausgehend vom Sulfatkomplex den Übergangszustand zu erreichen, der bei der Komplexdissoziation durchlaufen wird, abzüglich der freien Komplexbildungsenthalpie (Abbildung 49).^[73]

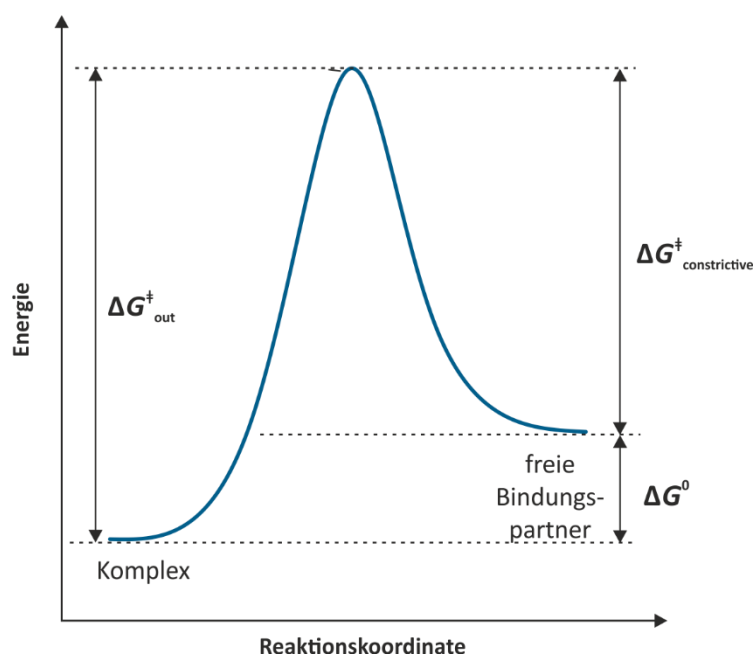


Abbildung 49: Energieprofil zur Veranschaulichung der „constrictive binding energy“

Die *constrictive binding energy* ergibt sich im Fall der Sulfat(de)komplexierung von **BCP E** aus der zuvor ermittelten freien Aktivierungsenthalpie der Dekomplexierung ($\Delta G_{\text{out}}^{\ddagger} = 68.9 \text{ kJ/mol}$) und der mittels ITC bestimmten freien Komplexbildungsenthalpie ($\Delta G^0 = -38.3 \text{ kJ/mol}$) zu 30.6 kJ/mol . Daraus lässt sich abschließend folgern, dass der Sulfatkomplexes von **BCP E** sowohl thermodynamisch stabil als auch kinetisch verhältnismäßig inert ist und zwar zu annähernd gleichen Anteilen.

Ein weiterer qualitativer Vergleich bezüglich der Kinetik der Sulfatbindung kann zwischen **BCP E** und dem dreifach Disulfid-verbrückten Bis(cyclopeptid) **R8** gezogen werden. NMR-spektroskopische Studien zeigten für den Sulfatkomplex von **R8** einen sehr langsamen H/D-Austausch an den NH-Gruppen der CP-Ringe. Dieser Befund deutet auf eine sehr effiziente Abschirmung des Anions im Hohlraum von **R8** hin, was wahrscheinlich in einer hohen Komplexstabilität resultiert.^[47,48] Vergleichbare Beobachtungen konnten in den NMR-Spektren von **BCP E** mit Natriumsulfat nicht gemacht werden, was nahe legt, dass der Gastaustausch in diesem Fall schneller erfolgt und somit die Anionenbindung vermutlich weniger effizient ist.

2.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieses Projekts wurde erfolgreich ein dreifach verbrücktes Bis(cyclopeptid) dargestellt und hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften charakterisiert. Dabei lag ein Augenmerk darauf, durch die geeignete Wahl einer Linkerstruktur die Anionenaffinität eines zuvor untersuchten dreifach verbrückten BCPs zu steigern.

Zu Vergleichszwecken wurde auch das einfach verbrückte Analogon **BCP F** dargestellt und untersucht. Entsprechend war es möglich, den Einfluss der Anzahl der Linker auf die Bindungseigenschaften zu evaluieren (Abbildung 50).

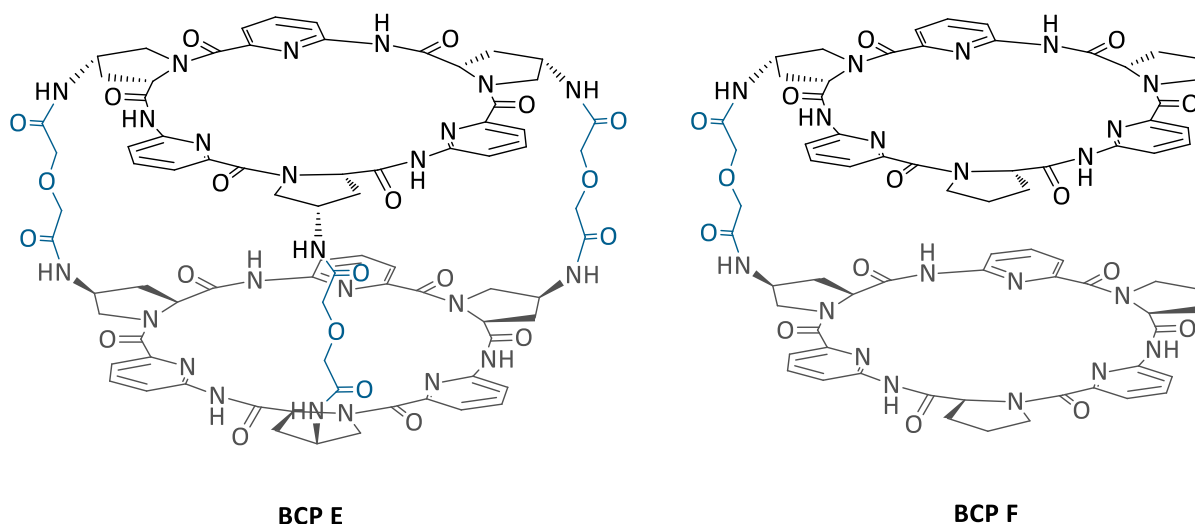


Abbildung 50: Im Rahmen der Promotion erstmals dargestellte Bis(cyclopeptide) **BCP E** und **BCP F**

Für die dreifache Verbrückung der beiden Cyclopeptidringe in **BCP E** wurde eine modulare Synthesestrategie entwickelt, die auf der Verwendung eines Sulfatsalzes als Templat beruhte. **BCP E** wurde zunächst als Sulfatkomplex isoliert, welcher anschließend durch die Verwendung von Bariumbistriflimid als Fällungsreagenz in die Anionen-freie Form überführt werden konnte.

Mit den analysenrein isolierten **BCPs E** und **F** wurden qualitative und quantitative Bindungsstudien durchgeführt, die Einblicke in das Bindungsverhalten dieser Verbindungen lieferten. ITC-Messungen mit **BCP E** ergaben, dass Sulfat mit einer Bindungskonstante von $\log K_a = 6.72$ in 67 Vol.-% Acetonitril/Wasser am stärksten gebunden wird, gefolgt von Iodid

mit $\log K_a = 4.45$. Die entsprechenden Komplexe von **BCP F** sind um bis zu zwei Größenordnungen weniger stabil, was zeigte, dass die Käfig-artige Struktur von **BCP E** zu einer effizienteren Anionenbindung führt. Mittels EXSY-NMR-Spektroskopie wurde belegt, dass der Sulfatkomplex von **BCP E** auch kinetisch verhältnismäßig inert ist, auch wenn der Anionenaustausch durch die drei Linker nicht vollständig unterbunden wird.

Durch einen Vergleich der Bindungseigenschaften von **BCP E** und **BCP F** mit denen anderer BCP-Derivate konnten zudem grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden, wie sich insbesondere Struktur und Anzahl der Linker auf die Anionenaffinität dieser Rezeptorklasse auswirken. So konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Linkeranzahl in diesem Fall zu einer signifikanten Verbesserung der Anionenaffinität geführt hat. Weiterhin wurde deutlich, dass die Verwendung kürzerer Linker in dreifach verbrückten BCPs in höheren Bindungskonstanten resultierte als bei der Verwendung längerer Triazol-haltiger Linker. Dabei weist **BCP E** sogar die bisher höchste gemessene Sulfataffinität Amid-verbrückter BCPs auf. Gleichzeitig zeigte ein Vergleich der Bindungseigenschaften von **BCP F** mit anderen einfach verbrückten BCPs jedoch, dass mit Digycolsäure offensichtlich noch nicht der ideale Linker gefunden wurde, da die Anionenaffinität von **BCP F** hinter der vergleichbarer Derivate zurückblieb. Zudem erreichten beide Derivate nicht die Größenordnung der Bindungskonstanten, die für Disulfid-verbrückte BCPs beobachtet wurden.

Daher sollte in zukünftigen Arbeiten die strukturelle Optimierung der Linker noch einmal adressiert werden. Dabei kann die Synthese dieser BCPs auf der im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etablierten Strategie beruhen, da diese eine einfache Variation der Linker ermöglicht. Besonders attraktiv wäre zudem die Darstellung wasserlöslicher BCPs, um die Sulfataffinität dieser Verbindungen mit der des natürlich vorkommenden Sulfat-bindenden Proteins vergleichen zu können. Beide Aspekte könnten womöglich gleichzeitig durch die Verwendung des in Abbildung 51 dargestellten 1,3-Phenylendiessigsäurederivats als Linker adressiert werden, das eine solubilisierende Triethylenglycoleinheit aufweist.^[60,74]

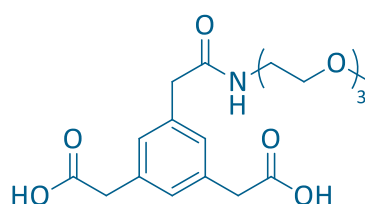


Abbildung 51: Alternative Linkerstruktur zum Einsatz in dreifach verbrückten BCPs

3 Projekt B

Cyclopeptid-funktionalisierte Goldnanopartikel als Sonden für Anionen

3.1 Stand der Forschung

3.1.1 Goldnanopartikel

Das zweite Projekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Anwendung von Oberflächenmodifizierten Goldnanopartikeln für den Nachweis von Anionen in Wasser. Goldnanopartikel sind Cluster von Goldatomen mit Durchmessern zwischen 1 und 150 nm und einer zumeist näherungsweise sphärischen Form. Solche Nanopartikel besitzen aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaften eine Vielzahl potenzieller Einsatzmöglichkeiten,^[75,76,77] von denen die Anwendung für analytische Zwecke im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurde.

Ein charakteristisches Merkmal kolloidaler Lösungen von Goldnanopartikeln ist deren tiefrote Färbung, sofern der Nanopartikeldurchmesser etwa zwischen 8 und 80 nm beträgt. Diese Farbe lässt sich auf das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) zurückführen, das auf der kollektiven Schwingung der freien Elektronen in den Goldclustern beruht, die durch die elektromagnetische Strahlung angeregt wird. Die Leitungsbandelektronen oszillieren dabei mit einer charakteristischen Frequenz, die von der Dielektrizitätskonstante des Metalls und des umgebenden Mediums sowie von der Partikelgröße und -form abhängt. Die Anregung erfolgt durch Absorption von Licht im sichtbaren Spektralbereich und führt zu der von Goldnanopartikeln typischen SPR-Bande im UV/VIS-Spektrum. Das Maximum dieser Bande liegt bei sphärischen Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser um 10 nm bei circa 520 nm, sodass die kolloidale Goldnanopartikellösung entsprechend rot erscheint (Abbildung 52). Die Lage und Intensität der SPR-Bande korreliert mit der Größe, Form und Monodispersität der Goldnanopartikel, sodass diese beiden Parameter zur Charakterisierung von Nanopartikeln herangezogen werden können.^[75,77,78]

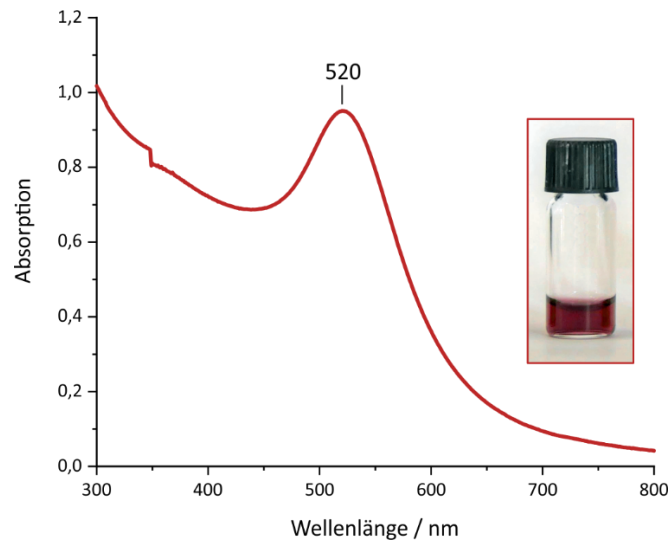


Abbildung 52: UV/VIS-Spektrum einer Lösung Citrat-stabilisierter Goldnanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von circa 8 nm (SPR-Bande bei 520 nm) sowie das Bild der dazugehörigen Lösung in Wasser

Goldnanopartikel sind darüber hinaus synthetisch einfach zugänglich, wobei die gewünschte Form und Größe durch die Wahl spezifischer Reaktionsbedingungen realisiert werden kann. Damit die gebildeten Goldnanopartikel in Lösung stabil sind, müssen sie stets durch geeignete Liganden stabilisiert werden.^[79] Dabei können sowohl inerte als auch funktionelle Liganden eingesetzt werden, wobei das Eigenschaftsprofil von Goldnanopartikeln durch die Verwendung funktioneller Liganden in weiten Grenzen variiert werden kann.

3.1.2 Synthese und Funktionalisierung von Goldnanopartikeln

Die erste dokumentierte Herstellung von Goldnanopartikeln geht auf Michael Faraday im Jahr 1857 zurück. Dieser berichtete, dass man bei Versetzen einer wässrigen, gelblichen Lösung von Natriumtetrachloraurat mit Phosphor in Kohlenstoffdisulfid eine rote Lösung erhält, was er auf die Bildung von fein dispergiertem Gold zurückführte.^[80] Diese Vermutung wurde fast ein Jahrhundert später durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt, die bewiesen, dass bei dieser Reaktion Nanopartikel mit einem Durchmesser zwischen 3 und 30 nm entstanden sind.^[81] Heutzutage sind zwei Methoden zur Herstellung von Goldnanopartikeln definierter Größe gebräuchlich, die analog zu Faraday auf der Reduktion von Goldsalzen basieren. Eine davon wurde 1951 von Turkevich beschrieben. Hierbei wird eine siedende Lösung von Tetrachlorgoldsäure mit Natriumcitrat versetzt, wobei Natriumcitrat zugleich als Reduktionsmittel und zur Stabilisierung der gebildeten Nanopartikel dient (Abbildung 53). Die gebildeten Nanopartikel sind reproduzierbar sphärisch und haben einen mittleren Durchmesser von etwa 20 nm.^[81]

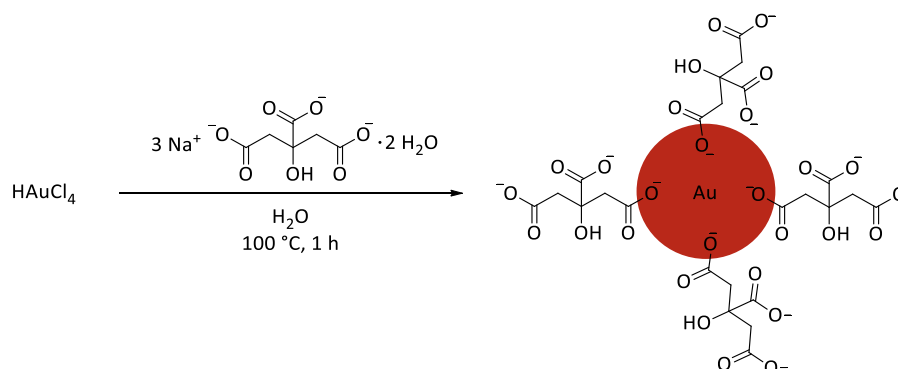


Abbildung 53: Goldnanopartikelsynthese nach Turkevich

Ergänzende Untersuchungen von Frens zeigten, dass durch Variation des Verhältnisses von Natriumcitrat und Goldsäure Goldnanopartikel mit Durchmessern zwischen 16 und 150 nm dargestellt werden können.^[82] Weitere Abwandlungen der Methode beruhen auf der Variation des pH-Wertes, der Reaktionstemperatur oder basieren auf der Verwendung von Licht als Anregungsquelle oder Ultraschall.^[83] Eine Verbesserung bezüglich der Reproduzierbarkeit der Synthese wurde durch Arbeiten von Puntès *et al.* erreicht, die zeigten,

dass die Zugabe der Tetrachlorgoldsäure zu einer siedenden Citratlösung zu einer verbesserten Größenverteilung, Monodispersität und Form der Nanopartikel führt. Zudem sind mit Hilfe dieser inversen Turkevich-Methode Nanopartikel mit Durchmessern bis hinunter zu 8 nm zugänglich.^[84]

Ein alternatives Verfahren zur Darstellung von Goldnanopartikel wurde von Brust und Schiffrin entwickelt. In diesem Fall erfolgt die Synthese in einem Zwei-Phasen-System, wobei Tetrachlorgoldsäure in Wasser vorgelegt und mit Hilfe eines Phasentransferkatalysators (Tetraoctylammoniumbromid) in Toluol überführt wird. Als Reduktionsmittel dient Natriumborhydrid und zur Stabilisierung der Nanopartikel enthält das Gemisch außerdem ein Alkylthiol, beispielsweise Dodecanthiol. Die so gebildeten Goldnanopartikel weisen kleinere Durchmesser als die nach Turkevich synthetisierten auf. So werden mit der Originalvorschrift beispielsweise Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 2 nm erhalten (Abbildung 54).^[85]

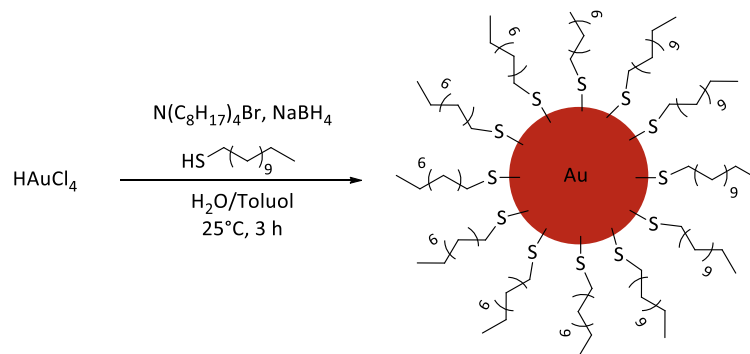


Abbildung 54: Goldnanopartikel-Synthese nach Brust-Schiffrin

Auch bei dieser Methode kann durch Variation der Reaktionsbedingungen und der Reaktandenverhältnisse Einfluss auf die Größe der Nanopartikel genommen werden, sodass Goldnanopartikel mit Durchmessern zwischen 1.5 und 5.5 nm zugänglich werden.^[86] Die Durchführung der Reaktion in einem einphasigen System^[87] und die Verwendung funktionalisierter Thiole^[88], Phosphine^[89] oder Amine^[90] zur Stabilisierung der Nanopartikel ist ebenfalls möglich.^[75,83]

Durch Substitution der stabilisierenden Liganden auf der Oberfläche von Goldnanopartikeln durch funktionelle Liganden können die Eigenschaften der Goldnanopartikel gezielt verändert werden. Ausgehend von Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln ist diese Funktionalisierung vergleichsweise einfach. So können die schwach gebundenen Citratliganden durch Behandlung der Nanopartikel mit Verbindungen, die Thiol- oder Disulfidgruppen enthalten, leicht verdrängt werden, da diese durch die Bildung stabiler Gold-Schwefelbindungen an die Nanopartikel binden.^[91] Bei Goldnanopartikeln, die mittels Brust-Schiffirin-Methode dargestellt wurden, sind zwei Wege der Funktionalisierung möglich. Zum einen können während der Nanopartikelsynthese Thiole mit den gewünschten funktionellen Gruppen eingesetzt werden. Dies setzt jedoch voraus, dass die betreffenden funktionellen Gruppen in Gegenwart von Natriumborhydrid stabil sind.^[88,92] Alternativ kann ebenfalls eine Ligandenaustauschreaktion durchgeführt werden. Dabei werden beispielsweise zunächst Goldnanopartikel mit Oberflächen-gebundenem 12-Dodecanthiol hergestellt. Diese werden anschließend mit einem Überschuss der funktionellen Thiole weiter umgesetzt, wodurch es zu einem Austausch der Liganden auf der Oberfläche kommt. Auf diese Weise können auch Thiole immobilisiert werden, die unter den reduktiven Bedingungen der Nanopartikelsynthese nicht stabil sind.^[93,94]

Weiterhin können unabhängig von der Herstellungsmethode Oberflächen-gebundene Liganden weiter modifiziert werden. So können beispielsweise Amidkupplungen^[95] oder auch Click-Reaktionen^[94] auf entsprechend funktionalisierten Nanopartikeln mit geeigneten Reaktionspartnern durchgeführt werden.

3.1.3 Goldnanopartikel als Sonden

Aufgrund der einfachen Synthese, der Vielzahl an Funktionalisierungsmöglichkeiten und den intrinsischen optoelektronischen Eigenschaften von Goldnanopartikeln sind sie hervorragend für die Entwicklung chemischer Sonden geeignet. Bei solchen Sonden führt die Wechselwirkung mit einem Analyten zu einem detektierbaren Signal (Abbildung 55), wobei der Erkennungsvorgang zumeist auf der Wechselwirkung des Analyten mit funktionellen Gruppen der auf den Nanopartikel befindlichen Liganden beruht. In der Folge kommt es zu einer Veränderung der physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel, welche die Detektion mittels verschiedener Verfahren erlaubt.^[77,96–98]

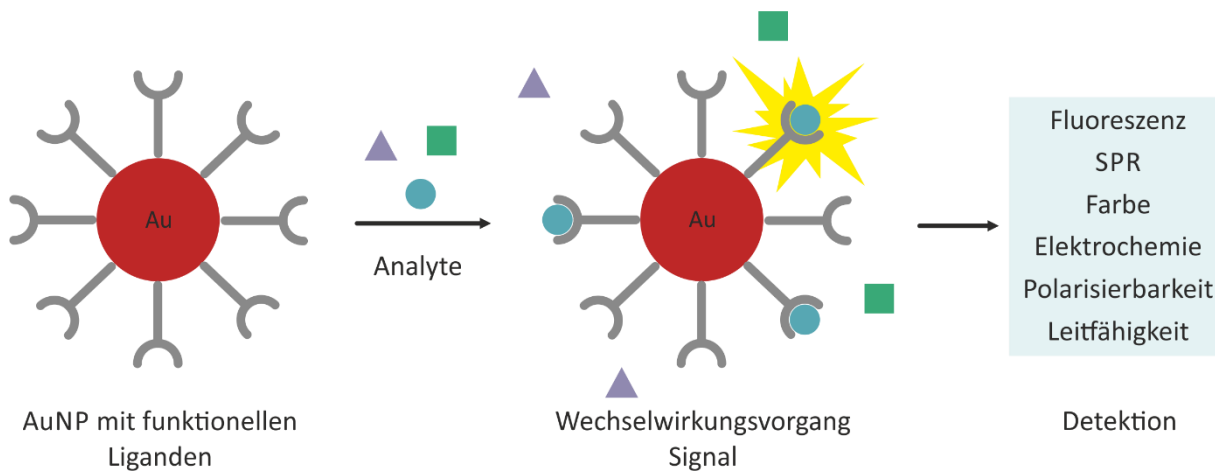


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Wirkungsweise einer Goldnanopartikel-basierten Sonde

So kann man ausnutzen, dass Goldnanopartikel Fluoreszenz-quenchende Eigenschaften besitzen. Durch den sogenannten Förster-Resonanzenergie-Transfer (FRET) wird strahlungsfrei Energie eines angeregten Chromophors auf einen Goldnanopartikel übertragen, sofern sich diese in räumlicher Nähe zueinander befinden und so die Fluoreszenz des Farbstoffs gequenchet. Ein Chromophor, der mit funktionellen Gruppen auf der Oberfläche eines Goldnanopartikels wechselwirkt, fluoresziert also nicht. Wird der Chromophor durch einen stärker bindenden Analyten verdrängt, ist dieser Bindungsvorgang durch die wiederhergestellte Fluoreszenz des Chromophors messbar. Dieses Prinzip wurde unter anderem bei Goldnanopartikeln angewendet, die zwischen DNA-Strängen unterschiedlicher

Sequenz unterscheiden können. Dazu wurden Nanopartikel (2.5 nm) synthetisiert und mit Oligonukleotid-haltigen Liganden funktionalisiert, welche peripher einen Fluorophor enthalten. In Abwesenheit komplementärer DNA-Stränge in Lösung falten sich die Oberflächen-gebundenen Liganden so, dass sich der Fluorophor in der Nähe der Goldnanopartikeloberfläche befindet. Ist jedoch ein komplementärer DNA-Strang anwesend, bildet dieser mit dem Liganden auf der Oberfläche des Nanopartikels einen Doppelstrang aus. Die damit verbundene Konformationsänderung des Liganden vergrößert den Abstand des Fluorophors zur Nanopartikeloberfläche, sodass seine Fluoreszenz wiederhergestellt wird (Abbildung 56).

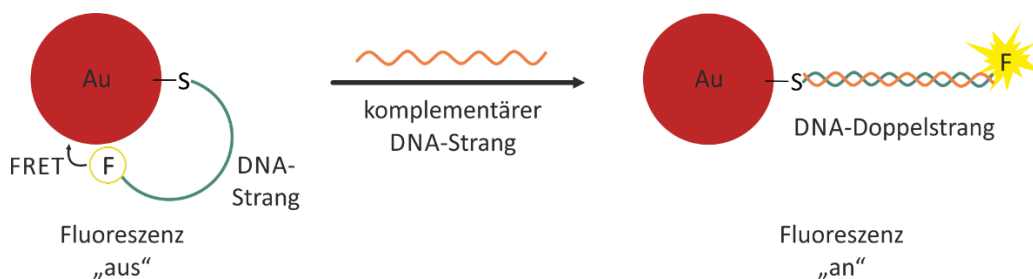


Abbildung 56: Schematische Darstellung der DNA-Detektion mit einer Fluoreszenz-basierten Goldnanopartikelsonde

Nicht-komplementäre DNA-Stränge werden nicht erkannt und haben somit keinen Einfluss auf die Fluoreszenz. Punktmutationen führen zu einer teilweise wiederhergestellten Fluoreszenz und können somit ebenfalls detektiert werden.^[99]

Ein weiteres Detektionsverfahren basiert auf der Analyt-induzierten Veränderung des Redoxverhaltens von Goldnanopartikeln, wodurch elektrochemische Sonden zugänglich werden. So wurden in der Gruppe um Astruc *et al.* Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 2 nm synthetisiert und mittels einer Ligandenaustauschreaktion in gemischt-funktionalisierte Goldnanopartikel mit 1-Amido-1'-acetylferrocenyleinheiten überführt. Die Wechselwirkung der Amidgruppen auf der Oberfläche der Goldnanopartikel mit Oxoanionen führte zu einer Änderung des Redoxverhaltens der Ferroceneinheit in den Liganden, was mittels Cyclovoltammetrie verfolgt werden konnte. Auf diese Weise konnten insbesondere Dihydrogenphosphatanionen detektiert werden (Abbildung 57).

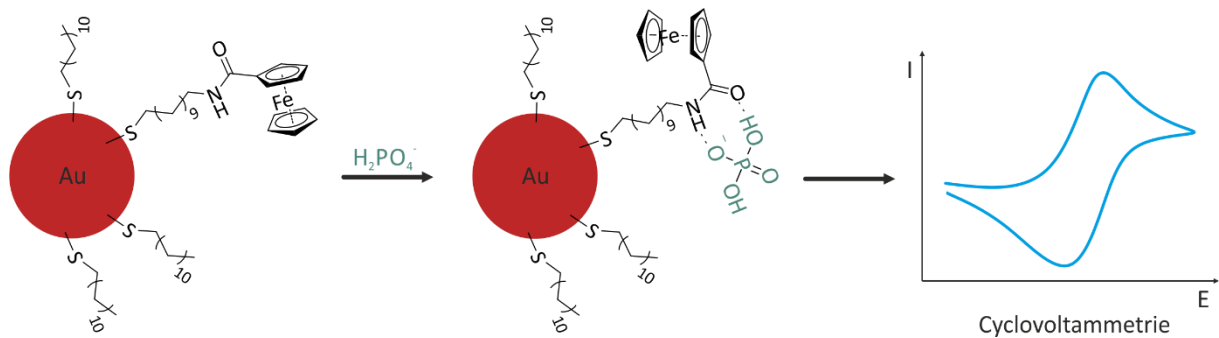


Abbildung 57: Schematische Darstellung der elektrochemischen Dihydrogenphosphatdetektion mit Hilfe funktionalisierter Goldnanopartikel

Es sollte erwähnt werden, dass die Goldnanopartikel in dieser Sonde lediglich als Trägermaterial dienen und diese somit an der Erkennung und Detektion des anionischen Analyten nicht unmittelbar beteiligt waren.^[100]

Andere auf Goldnanopartikeln basierende Sonden nutzen den Effekt der oberflächenverstärkten Raman Streuung (SERS, *surface enhanced Raman scattering*). Bei klassischen Raman-spektroskopischen Untersuchungen wird die inelastische Streuung von Licht an Molekülen detektiert, wobei die zu untersuchenden Moleküle normalerweise einen recht kleinen Streuquerschnitt aufweisen, sodass wahlweise eine hohe Laserintensität oder eine hohe Konzentration an Molekülen benötigt wird, um ein detektierbares Signal zu erhalten. Bei der oberflächenverstärkten Raman-Streuung wird ausgenutzt, dass Raman-Signale von Molekülen, die sich an metallischen Oberflächen befinden, um ein Vielfaches verstärkt werden, sodass sogar einzelne Moleküle untersucht werden können. Konkret wird durch die Oberflächenplasmonenresonanz von Goldnanopartikeln lokal ein starkes elektrisches Feld erzeugt, wodurch die Streuwahrscheinlichkeit erhöht wird, was zu einer Erhöhung der Intensität der Raman-Signale des Analyten um bis zu 14 Größenordnungen führt.^[101] So eignet sich beispielsweise eine SERS-basierte Sonde mit Cystein-funktionalisierten Goldnanopartikeln (30 nm) zur Detektion des Sprengstoffs TNT. TNT bildet mit den Cysteinliganden einen Meisenheimer-Komplex, welcher über Wasserstoffbrückenbindungen mit weiteren Goldnanopartikeln aggregiert, wodurch sogenannte *hot spots* gebildet werden (Abbildung 58).

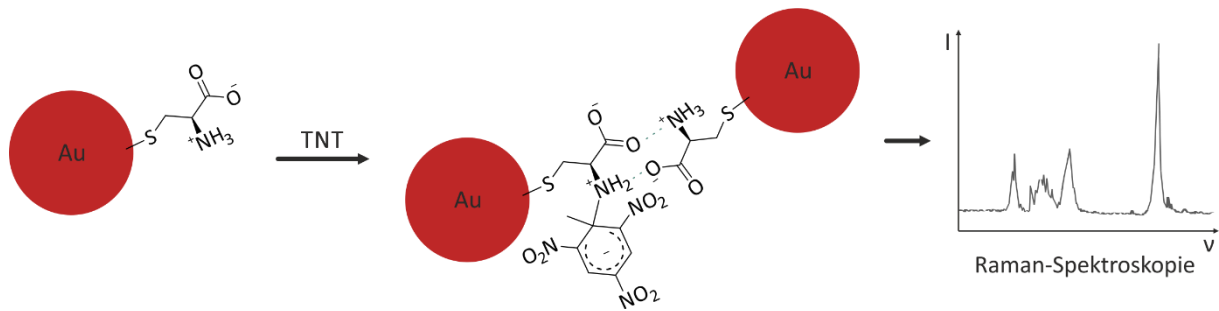


Abbildung 58: Schematische Darstellung der TNT-Detektion mit einer SERS-basierten Goldnanopartikelsonde

Die Raman-spektroskopischen Untersuchung dieser *hot spots* ergab, dass die Goldnanopartikel eine Zunahme der Intensität des Raman-Signals von TNT (genauer der N-O-Schwingung) um neun Größenordnungen bewirken. TNT konnte auf diese Weise mit einer Nachweisgrenze von 2 pM sehr selektiv gegenüber anderen aromatischen Nitroverbindungen nachgewiesen werden.^[102]

Der wohl am häufigsten verwendete Detektionsmechanismus von Goldnanopartikel-basierten Sonden beruht jedoch auf der unterschiedlichen optischen Absorption von Goldnanopartikeln beziehungsweise Goldnanopartikelaggregaten in Abhängigkeit ihrer Größe. Führt die Wechselwirkung mit dem Analyten zu einer Aggregation von Goldnanopartikeln resultiert oft eine Farbveränderung der Lösung von rot nach violett/blau, die mittels UV/VIS-Spektroskopie und oft sogar mit dem bloßen Auge nachverfolgt werden kann. Werden Goldnanopartikel gezielt mit chelatisierenden Liganden funktionalisiert, können durch Zugabe des Analyten multidentate, interpartikuläre Komplexe gebildet werden. Die Ausbildung dieser Aggregate führt zur Kopplung der Plasmonenresonanzfrequenzen der zusammengelagerten Goldnanopartikel, sodass die kolloidale Lösung blau erscheint. Ein Beispiel für eine Sonde, die auf diesem Prinzip beruht, eignet sich für die Detektion von Bleikationen. Die entsprechenden Goldnanopartikel hatten einen mittleren Durchmesser von 14 nm und enthielten Oberflächen-gebundene 11-Mercaptoundecansäureliganden. Bei Zugabe von Bleisalzen zu einer wässrigen Lösung dieser Goldnanopartikel kam es zu einem Farbumschlag von rot nach blau, der auf der Komplexbildung der Metallionen durch die Carboxylatgruppen der Liganden beruhte. Die Aggregation wurde sowohl mittels UV/VIS-Spektroskopie als auch durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestätigt (Abbildung 59).

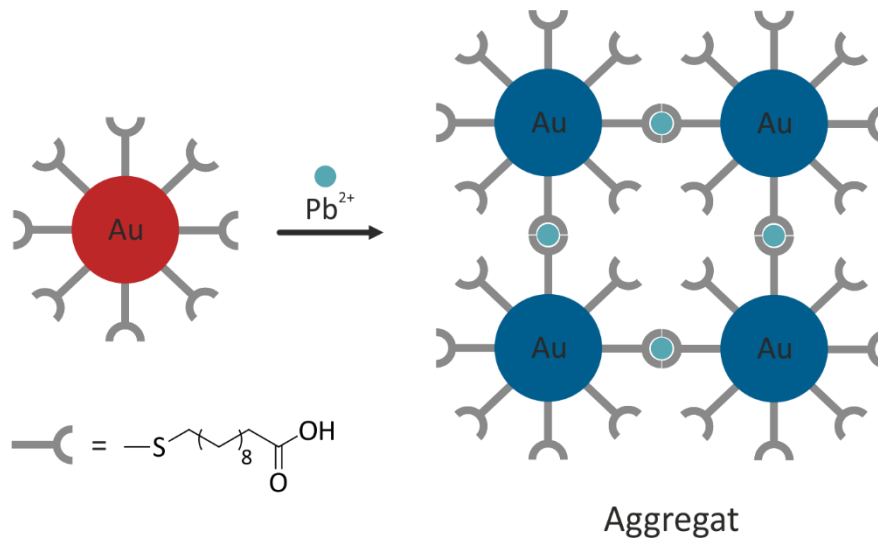


Abbildung 59: Schematische Darstellung der Blei-Kationen-Detektion mit einer kolorimetrischen Goldnanopartikel-Sonde

Ein ähnlicher Farbumschlag wurde in Gegenwart von Quecksilber- oder Cadmiumsalzen beobachtet, nicht jedoch mit Zinksalzen.^[103] Die Möglichkeit der Detektion des Analyten mit dem bloßen Auge ist ein großer Vorteil solcher optischer Sonden.

3.1.4 Goldnanopartikel-basierte Sonden zur Detektion von Anionen

Für Goldnanopartikel-basierte Sonden, die anorganische Anionen detektieren können, existiert bislang nur eine begrenzte Anzahl von Beispielen.^[96,97]

Ein solches System wurde beispielsweise von Sessler *et al.* entwickelt und besteht aus Goldnanopartikeln mit einem mittleren Durchmesser von 5 nm, die auf ihrer Oberfläche Calix[4]pyrrol-abgeleitete Derivate als Liganden tragen (Abbildung 60).

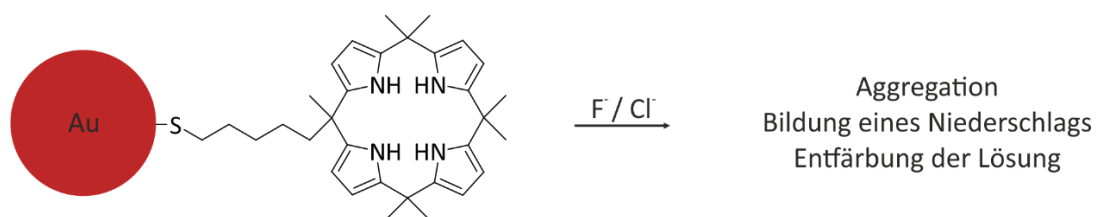


Abbildung 60: Schematische Darstellung der Detektion von Fluorid- bzw. Chloridanionen mit Hilfe der von Sessler *et al.* beschriebenen Goldnanopartikel

Calix[4]pyrrole binden bekanntermaßen bevorzugt an die kleineren Halogenide Fluorid und Chlorid durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den NH-Gruppen und den Anionen.^[104] Entsprechend wurde die Wechselwirkung der mit diesem Rezeptor funktionalisierten Goldnanopartikel mit den Tetrabutylammoniumsalzen der Halogenide untersucht. Es zeigte sich, dass die Fluorid- und Chloridionen die Bildung von Goldnanopartikelaggregaten induzierten, welche aus der Lösung ausfielen und diese entfärbt zurückließen, während eine Zugabe von Bromid- und Iodidionen zu keiner Farbveränderung führte. Das Ausfallen der Goldnanopartikel wurde damit erklärt, dass die Bindung von Fluorid bzw. Chlorid zur Bildung einer ionischen Hülle um den Nanopartikel führt, mit der die Tetrabutylammoniumkationen wechselwirken können, was eine inter-partikuläre Aggregation der Nanopartikel zur Folge hat. Bromid und Iodid wurden hingegen nicht effizient genug gebunden, sodass sie keine Aggregation bewirken. Der Aggregationsvorgang konnte durch die Abnahme der SPR-Bande im UV/VIS-Spektrum und die Rasterelektronenmikroskopie nachverfolgt werden.^[105]

Im Hinblick auf Anwendungen und das natürliche Vorkommen von Anionen, sind jedoch vor allem Sonden interessant, die in Wasser funktionieren. So beschrieben Han *et al.* einen

kolorimetrischen Nachweis von Cyanidanionen in wässriger Lösung auf Basis von ATP-stabilisierten Goldnanopartikeln. Hierfür verwendeten sie einen nicht-immobilisierten Kupfer-Phenanthrolinkomplex, aus dem bei Zugabe von Cyanidionen durch Dekomplexierung Phenanthrolin freigesetzt wird, welches die Aggregation der Nanopartikel auslöst. Entsprechend wurde ein Farbumschlag der Lösung zu blau beobachtet (Abbildung 61).

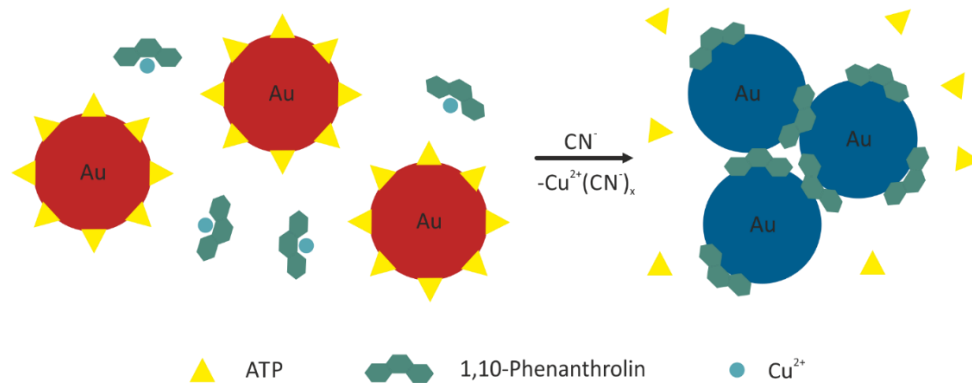


Abbildung 61: Schematische Darstellung der Detektion der Cyanidanionen durch die Goldnanopartikelsonde nach Han et al.

Dieser Farbumschlag war selektiv für Cyanid und wurde weder mit Halogeniden noch Phosphaten, Nitrat, Hydrogencarbonat, Sulfat oder Perchlorat beobachtet. Die Nachweisgrenze für Cyanid lag bei einer Konzentration von 10^{-5} M. In einem Konkurrenzexperiment, bei dem alle Anionen gleichzeitig zur Goldnanopartikelsonde gegeben wurden, konnte Cyanid selektiv nachgewiesen werden.^[106]

Eine weitere kolorimetrische Sonde auf Basis von Goldnanopartikeln, die in Wasser wirksam ist, wurde in der Gruppe um Mirkin beschrieben und erlaubte den Nachweis von Nitrit. Dieses System bestand aus zwei unterschiedlich funktionalisierten Goldnanopartikeln (13 nm), deren Oberflächen-gebundene Anilin- und Naphthalengruppen mit Nitrit in einer Griess-Reaktion reagieren und die Nanopartikel so kovalent vernetzen. Beide Nanopartikel enthielten zusätzlich quaternäre Ammoniumgruppen, um die Wasserlöslichkeit der Goldnanopartikel zu gewährleisten (Abbildung 62).

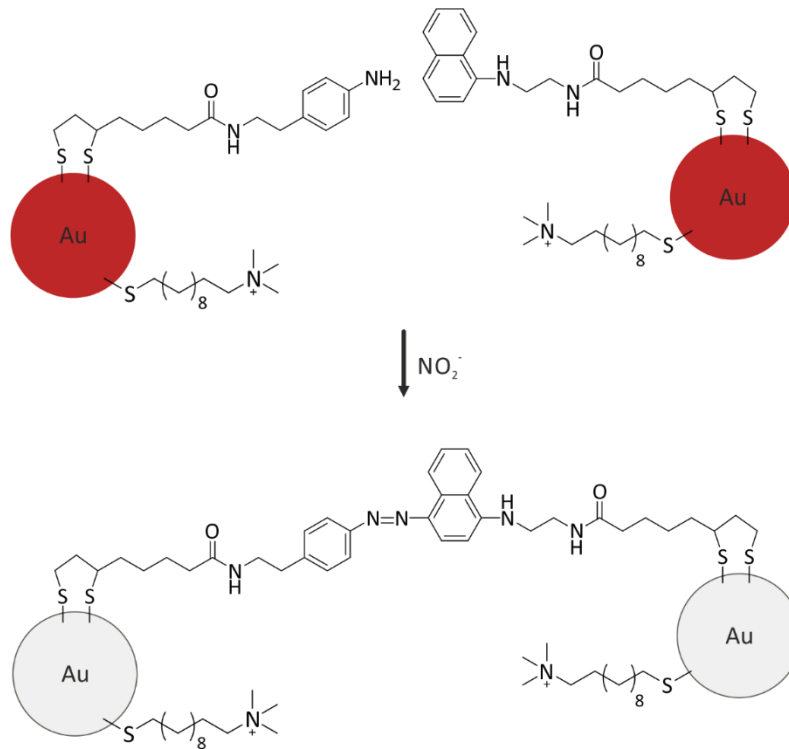


Abbildung 62: Schematische Darstellung der Detektion von Nitritanionen mit Hilfe der von Mirkin et al. beschriebenen Goldnanopartikel

Die kovalente Bindungsknüpfung führte zur Ausbildung von Goldnanopartikelnetzwerken, welche aus der Lösung ausfielen, sodass eine Entfärbung der Lösung beobachtet wurde. Andere biologisch und ökologisch relevante Anionen, wie Nitrat, Fluorid, Sulfat oder Hydrogencarbonat waren unreaktiv und verursachten dementsprechend keine Farbveränderung der Probe. Diese Methode wurde durch Zugabe eines Enzyms für den Nachweis von Nitraten ausgeweitet, das Nitraten zunächst zu Nitriten reduziert.^[107]

Daneben existieren Goldnanopartikel-basierte optische Sonden zum Nachweis von Phosphaten,^[108] Fluorid^[105,109] oder Oxoanionen.^[110] Der Nachweis von Anionen mit Hilfe von geeignet funktionalisierten Goldnanopartikeln ist somit prinzipiell möglich. Die begrenzte Anzahl an Beispielen verdeutlicht aber, dass Potenzial für weitere Untersuchungen in diesem Forschungsgebiet besteht, denn gerade die einfache, optische Detektion anorganischer Anionen wäre beispielsweise in der Wasseranalytik von Interesse. So könnte bei der Bewertung der Trinkwasserqualität oder auch der Qualität von kontaminierten Gewässern, ein einfacher Nachweis spezifischer Anionen, der ohne apparativen Aufwand auskommt, hilfreich sein.

3.2 Aufgabenstellung

Im Rahmen von Projekt B sollte untersucht werden, ob durch Immobilisierung von Cyclopeptiden auf Goldnanopartikeln optische Sonden für Anionen erhalten werden, die aufgrund der Anionenaffinität der Cyclopeptide in Wasser wirksam sind.

Dabei liegt der Anionendetektion die Eigenschaft der Cyclopeptide zu Grunde, mit einigen anorganischen Anionen 2:1 Komplexe zu bilden. Wenn also an der Komplexbildung Cyclopeptideinheiten beteiligt sind, die sich auf unterschiedlichen Nanopartikeln befinden, sollte die Komplexbildung wie in Abbildung 63 gezeigt zu einer Vernetzung der Partikel führen.

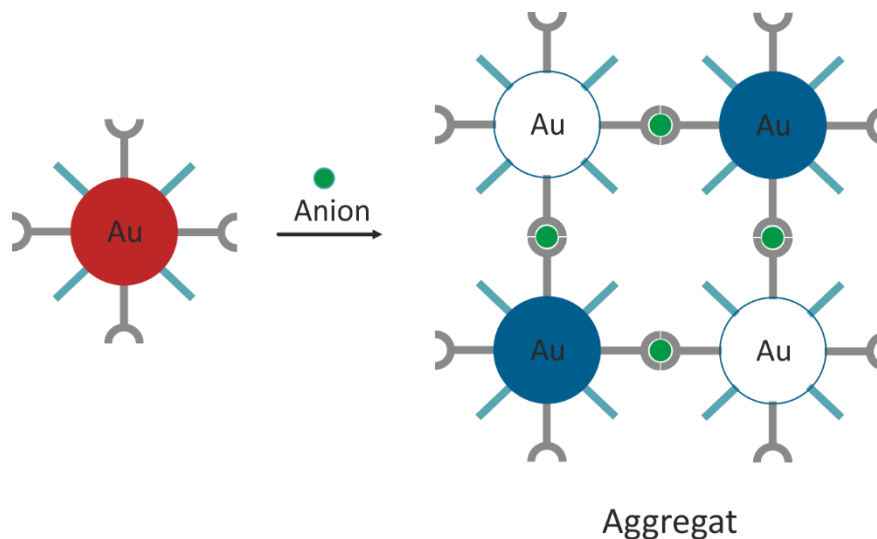


Abbildung 63: Schematische Darstellung der Anionen-induzierten Aggregatbildung von Cyclopeptid-funktionalisierten Goldnanopartikeln

Das Ergebnis wäre entsprechend eine leicht detektierbare Verfärbung oder Entfärbung der Lösung, je nachdem, ob die Vernetzung zu löslichen Aggregaten führt, in denen es zu einer Kopplung der Oberflächenplasmonenresonanz der einzelnen Nanopartikel kommt, oder zur Bildung unlöslicher Aggregate, die aus der Lösung ausfallen.

Um die Wasserlöslichkeit der Nanopartikel sowie die Vereinzelung der Rezeptoren auf der Oberfläche, die verhindert, dass zwei auf demselben Nanopartikel befindliche Cyclopeptide mit einem Anion wechselwirken können, zu gewährleisten, sollen die Nanopartikel neben den Cyclopeptiden zusätzliche Liganden enthalten (Abbildung 64). Dabei sind neutrale Liganden

auf Basis von Oligoethylenglycolen besonders günstig, da sie Wasserlöslichkeit vermitteln ohne dass Ladungen auf der Oberfläche entstehen, die die Anionenbindung beeinflussen.

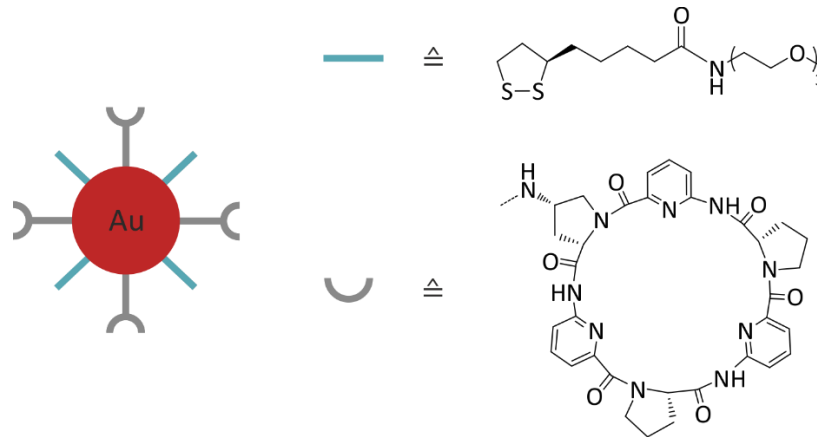


Abbildung 64: Schematische Darstellung der Goldnanopartikelbelegung sowie Strukturen der Liganden

Im ersten Teil des Projekts sollten entsprechend Methoden zur Synthese der inerten und CP-haltigen Liganden sowie zur Darstellung der Goldnanopartikel erarbeitet werden. Ausgehend von diesen Ausgangsverbindungen sollten funktionalisierte Goldnanopartikel synthetisiert werden und ihre anschließende Charakterisierung Informationen über ihre Größe und Oberflächenzusammensetzung liefern. Abschließend sollte mit Hilfe von Bindungsstudien evaluiert werden, ob diese Goldnanopartikel tatsächlich eine optische Detektion anorganischer Anionen in Wasser ermöglichen.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Darstellung gemischt-funktionalisierter Goldnanopartikel mittels Ligandenaustauschreaktion

3.3.1.1 Synthetische Vorüberlegungen zur Darstellung der Goldnanopartikel

Die Darstellung der funktionalisierten Goldnanopartikel sollte durch Ligandenaustauschreaktionen erfolgen. Dabei sollten Citrat-geschützte Nanopartikel als Ausgangsmaterial verwendet werden, da diese einfach und reproduzierbar mit dem gewünschten Partikeldurchmesser von circa 10 nm erhalten werden können und die Verdrängung der Citratliganden durch Thiole oder Disulfide leicht gelingt.^[84]

Bei den benötigten organischen Liganden sollte es sich um funktionalisierte (*R*)-Liponsäurederivate handeln (Abbildung 65), da (*R*)-Liponsäure aufgrund der Disulfideinheit einfach und effizient auf Goldoberflächen immobilisiert werden kann.

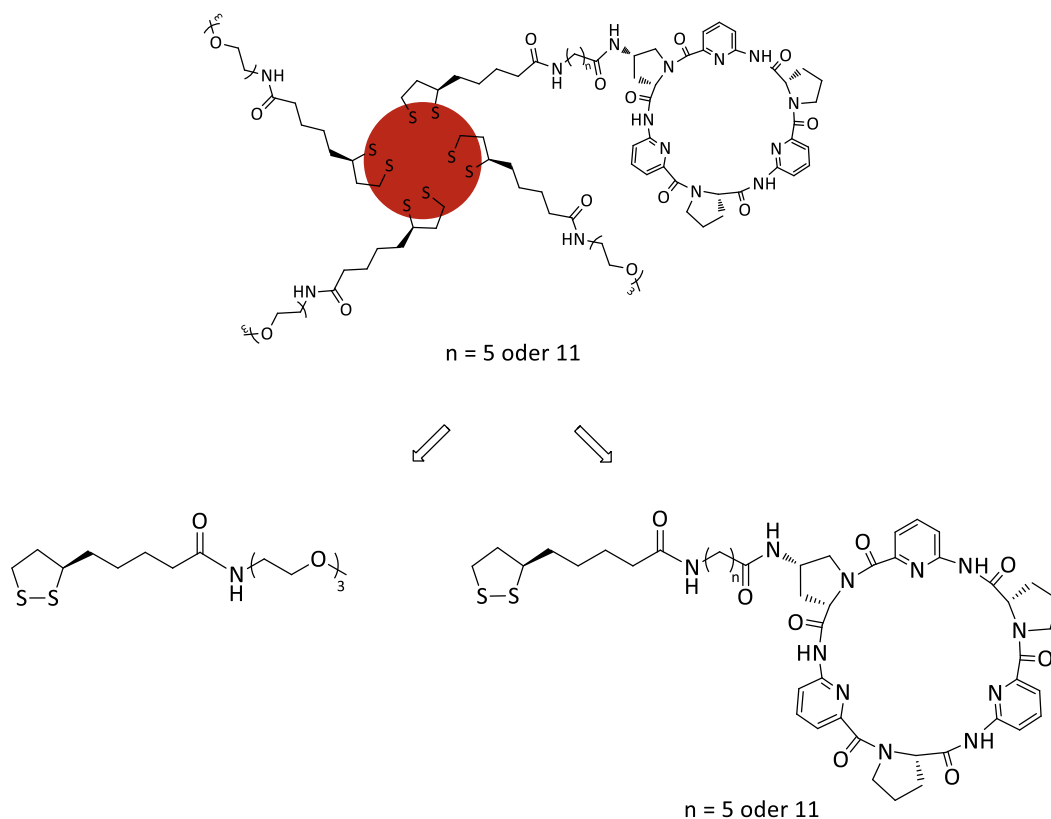


Abbildung 65: Strukturen der funktionalisierten Goldnanopartikel sowie der dazu benötigten Liganden

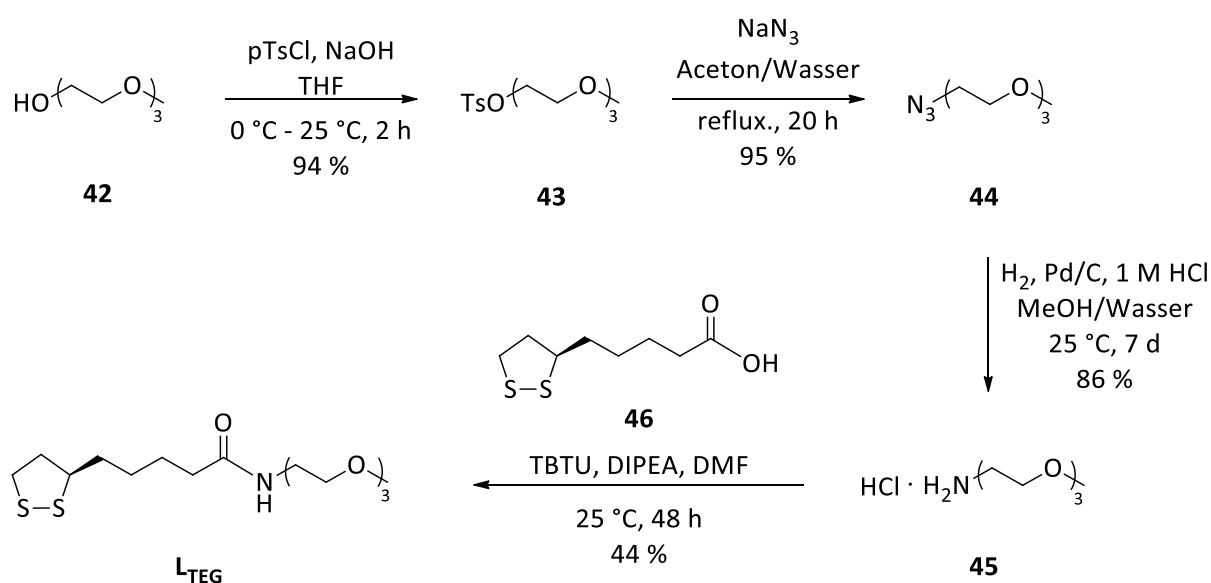
Bei Verwendung von Thiolen müsste dagegen deren SH-Gruppe im Zuge der Synthese mit einer Schutzgruppe versehen werden, die wiederum in einem zusätzlichen Syntheseschritt vor der Immobilisierung abgespalten werden müsste. Zudem führt die Anbindung von Liponsäurederivaten an die Goldoberfläche zur Bildung von zwei Au-S-Bindungen – im Vergleich zu einer bei Thiolen – und darum meist zu stabileren Goldnanopartikeln.^[111]

Die Synthesen der zum Aufbau der Liganden benötigten Triethylenglycol- und Cyclopeptidbausteine können weitestgehend bekannten Vorschriften folgen.

3.3.1.2 Darstellung der Liganden

Darstellung des solubilisierenden Liganden L_{TEG}

Ausgehend von kommerziell erhältlichem Triethylenglycolmonomethylether **42** wurde in einer vierstufigen Synthese der solubilisierende Ligand L_{TEG} dargestellt (Schema 17). Dazu wurde **42** zunächst tosyliert und anschließend in das Azid **44** überführt, wobei auf beiden Stufen eine nahezu quantitative Ausbeute erzielt wurde.^[34]

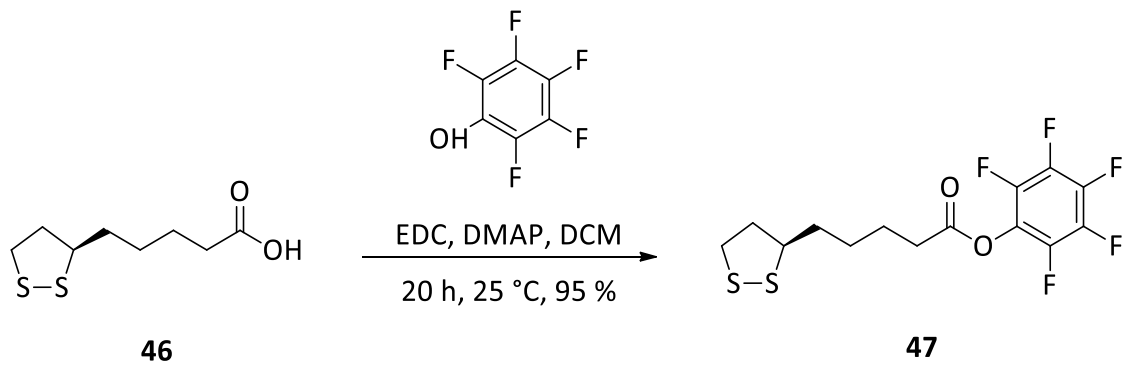


Schema 17: Darstellung des Liganden L_{TEG}

Das Azid **44** wurde anschließend unter einer Wasserstoffatmosphäre und der Verwendung von Palladium auf Aktivkohle als Katalysator zum Hydrochlorid desamins **45** reduziert. Dieses Amin wurde abschließend mit (*R*)-Liponsäure **46** zur gewünschten Zielverbindung L_{TEG} gekuppelt. Nach der recht aufwändigen Aufarbeitung wurde L_{TEG} in einer Ausbeute von 44 % isoliert. Die Darstellung von L_{TEG} wurde gemeinsam mit Dipl.-Chem. Lena Reinke erarbeitet.

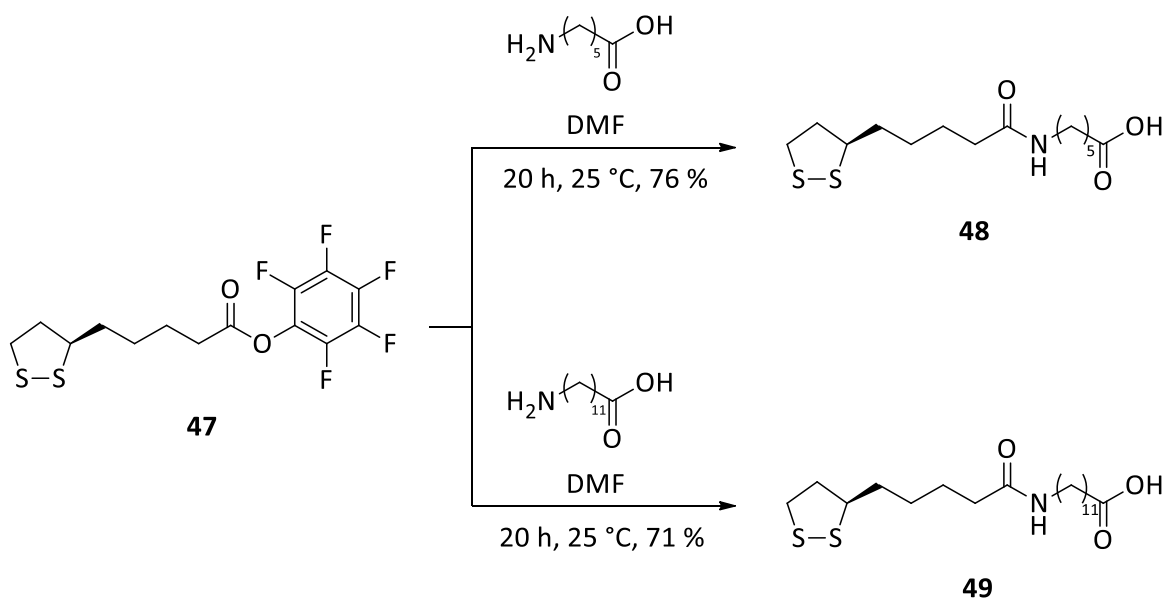
Darstellung der funktionellen Liganden L_{CPC6} und L_{CPC12}

Für die Synthesen der Cyclopeptid-haltigen Liganden L_{CPC6} und L_{CPC12} wurde zunächst (*R*)-Liponsäure mit Pentafluorphenol und EDC als Kupplungsreagenz in den entsprechenden Aktivester **47** überführt (Schema 18).



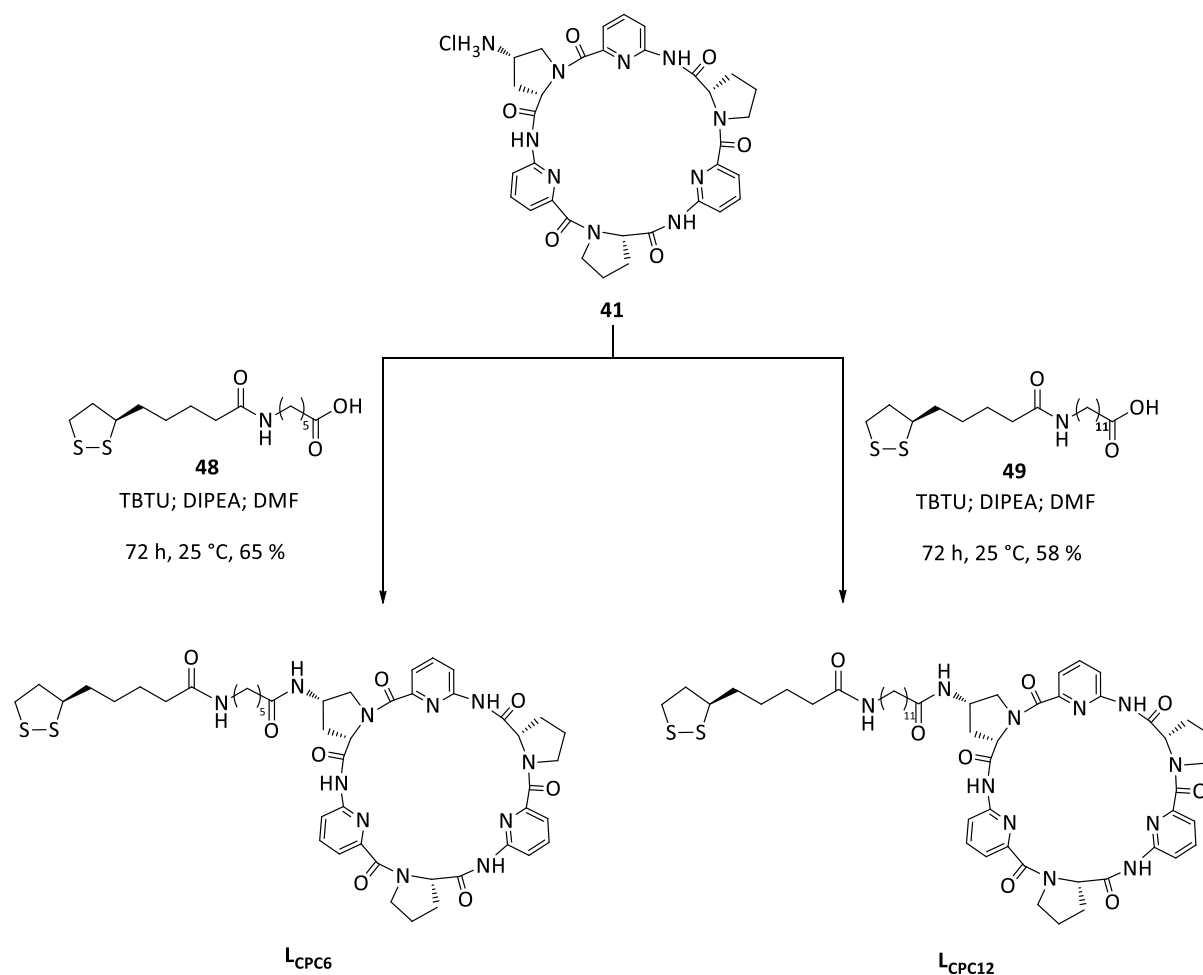
Schema 18: Darstellung des Aktivesters **47**

Verbindung **47** wurde anschließend mit 6-Aminohexansäure oder 12-Aminododecansäure umgesetzt, wobei die Verbindungen **48** und **49** in 76 % beziehungsweise 71 % Ausbeute erhalten wurden (Schema 19).



Schema 19: Darstellung der Verbindungen **48** und **49**

Diese Säuren wurden mit dem bereits in Projekt A beschriebenen Cyclopeptidmonoamin **41** unter Verwendung von TBTU als Kupplungsreagenz umgesetzt (Schema 20). Die Liganden **L_{CPC6}** und **L_{CPC12}** wurden so in 65 % und 58 % Ausbeute erhalten.



Schema 20: Darstellung der Liganden **L_{CPC6}** und **L_{CPC12}**

Diskussion der Ligandsynthesen

Die Darstellung des solubilisierenden Liganden **L_{TE6}** wurde in einer kurzen Reaktionssequenz erfolgreich realisiert, wobei insbesondere in den ersten drei Schritten der Synthese sehr hohe Ausbeuten erzielt werden konnten. Lediglich bei der finalen Amidkupplung wurde eine moderate Ausbeute von 44 % verzeichnet. Laut DC und HPLC wurden die Edukte in diesem Schritt vollständig umgesetzt, sodass die Ausbeuteverluste auf die Aufarbeitung

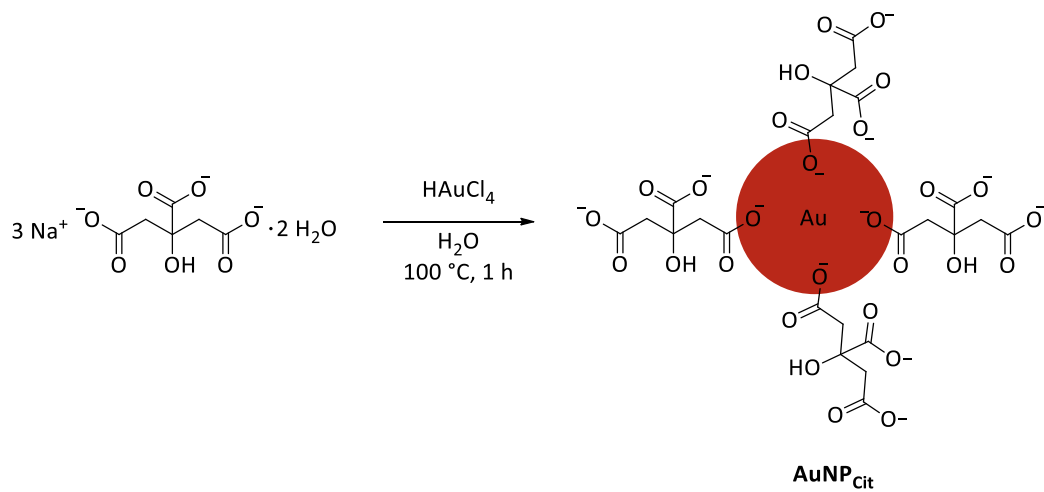
zurückzuführen sind. Die Aufreinigung führte lediglich bei Verwendung einer Kombination aus Kieselgel-Säulenchromatographie und einem anschließenden semi-präparativen HPLC-Schritt zu analysenreinem Produkt. Dabei kam es vermutlich bei der semi-präparativen HPLC-Trennung zu signifikanten Verlusten, da aufgrund der limitierten Kapazität der Säule, die Aufreinigung mehrere Durchgänge erforderte.

Die beiden Carbonsäurederivate **48** und **49** wurden in guten Ausbeuten um 70 % erhalten und konnten anschließend unter Standardbedingungen mit dem Cyclopeptidmonoamin **41** umgesetzt werden. Auf diese Weise wurden die gewünschten Liganden **L_{CPC6}** und **L_{CPC12}** analysenrein mit Ausbeuten um 60 % isoliert. Die Ausbeuten in diesem Schritt sind zufriedenstellend, sodass keine weitere Optimierung vorgenommen wurde.

3.3.1.3 Darstellung funktionalisierter Goldnanopartikel

Synthese Citrat-stabilsierter Goldnanopartikel

Die Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel wurden nach der von Puntès modifizierten inversen Turkevich-Methode dargestellt, bei der zu einer siedenden Citratlösung Tetrachlorgoldsäure gegeben wird (Schema 21).^[84]



Schema 21: Darstellung Citrat-stabilsierter Goldnanopartikel

Die so gebildeten Goldnanopartikel **AuNP_{Cit}** sollten Durchmesser von circa 9 - 10 nm haben.

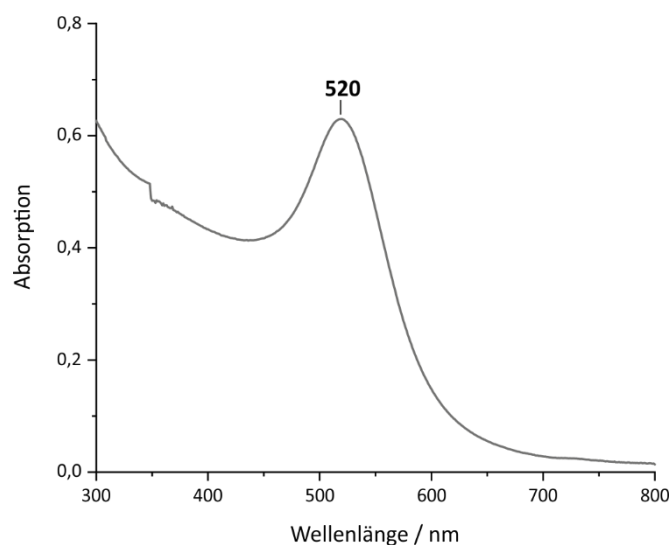


Abbildung 66: UV/VIS-Spektrum der Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel **AuNP_{Cit}** in Wasser

Um dies zu überprüfen, wurde ein UV/VIS-Spektrum der erhaltenen intensiv rot gefärbten Lösung vermessen (Abbildung 66). Das Maximum der SPR-Bande liegt in diesem Spektrum bei 520 nm.

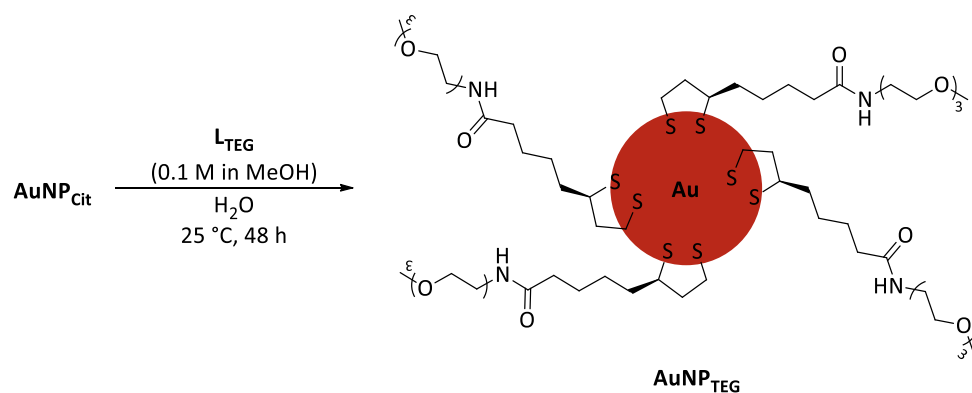
Diskussion zur Synthese Citrat-stabilsierter Goldnanopartikel

Die Synthese Citrat-stabilsierter Goldnanopartikel **AuNP_{Cit}** verlief wie in der Literatur beschrieben. Die UV/VIS-spektroskopische Charakterisierung der kolloidalen Lösung lieferte ein Spektrum mit einer intensiven SPR-Bande, deren Maximum bei 520 nm auftritt, was in gutem Einklang mit dem von Puntès beschriebenen Maximum der SPR-Bande von 519 nm steht. Da das Absorptionsmaximum der SPR-Bande mit der Größe der Nanopartikel korreliert, kann geschlossen werden, dass die gebildeten Goldnanopartikel einen mittleren Durchmesser von circa 9 nm besitzen.^[84] Spätere Untersuchungen der nach den Ligandenaustauschreaktionen erhaltenen Goldnanopartikel mittels TEM bestätigten diesen Befund.

Funktionalisierung der Goldnanopartikel

Darstellung und Untersuchung von AuNP_{TEG}

Die Funktionalisierung der Nanopartikel mittels Ligandenaustauschreaktion wurde anhand der Synthese von Goldnanopartikeln, die ausschließlich den solubilisierenden Liganden L_{TEG} enthielten, getestet. Dazu wurde eine wässrige Lösung AuNP_{Cit} zunächst dialysiert, um überschüssiges Citrat zu entfernen, und dann mit einer Lösung von L_{TEG} in Methanol versetzt und 48 h austauschen gelassen (Schema 22).



Schema 22: Darstellung von AuNP_{TEG}

Die nach Aufarbeitung erhaltenen Goldnanopartikel AuNP_{TEG} waren wie gewünscht vollständig wasserlöslich und wurden anschließend mit verschiedenen Verfahren genauer charakterisiert. Das ^1H -NMR-Spektrum einer Lösung von AuNP_{TEG} in D_2O enthält bei den erwarteten chemischen Verschiebungen die Signale von L_{TEG} . Sie sind jedoch im Vergleich zu den Signalen im Spektrum des freien Liganden sehr stark verbreitert (Abbildung 67).

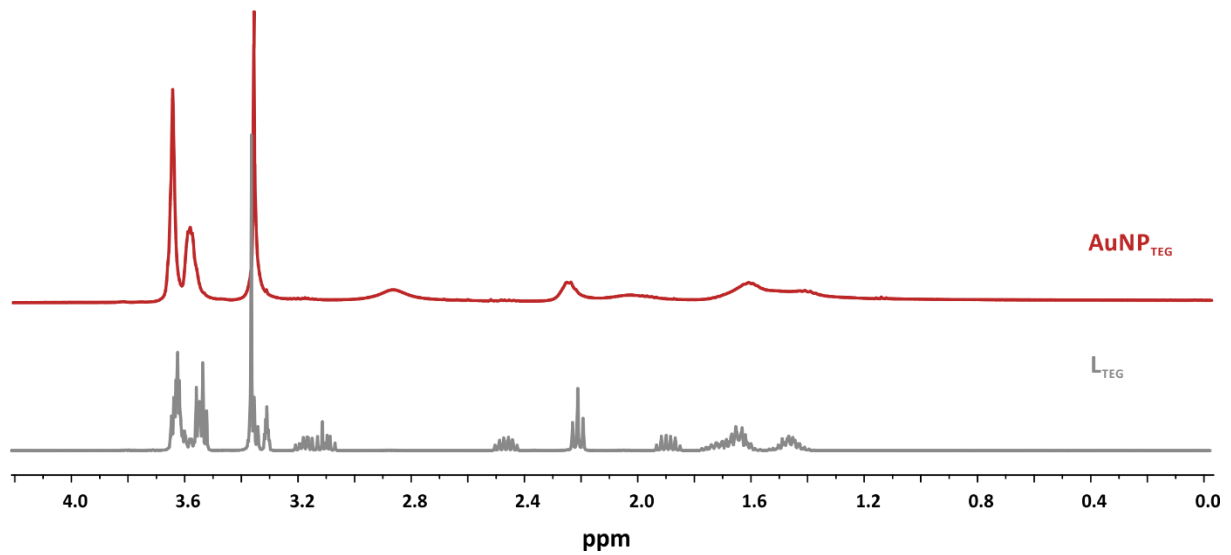


Abbildung 67: ¹H-NMR-Spektren des freien Liganden **L_{TEG}** (400 MHz, 25 °C, MeOD-d₄) und von **AuNP_{TEG}** (400 MHz, 25 °C, D₂O)

Das Maximum der SPR-Bande im UV/VIS-Spektrum der Nanopartikel liegt bei 523 nm (Abbildung 68).

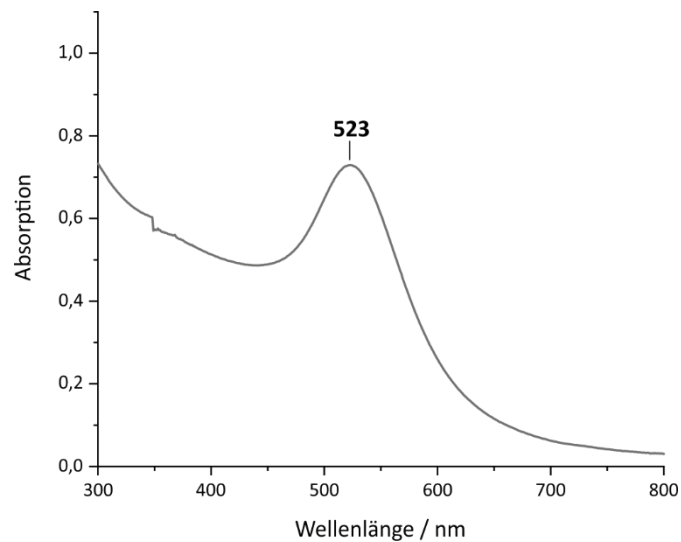


Abbildung 68: UV/VIS-Spektrum von **AuNP_{TEG}** in Wasser

TEM-Aufnahmen von **AuNP_{TEG}** zeigen, dass die Nanopartikel eine sphärische Geometrie und einen mittleren Durchmesser von 10.2 nm ± 1.8 nm besitzen (Abbildung 69).

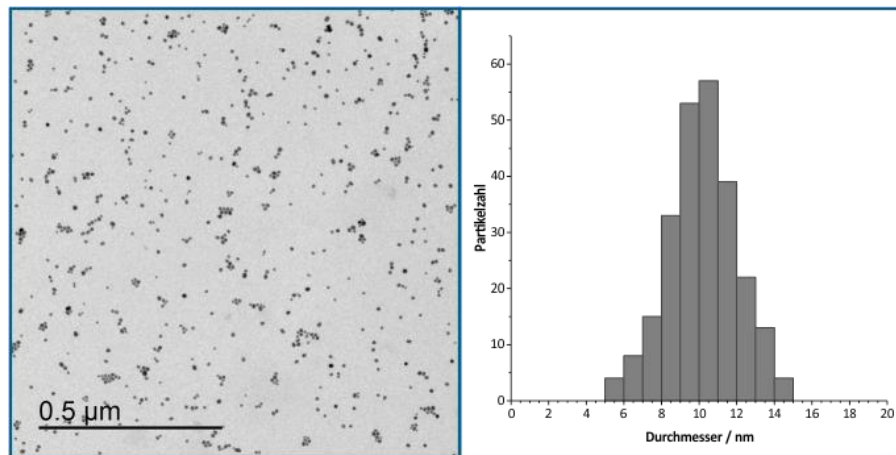


Abbildung 69: TEM-Aufnahme von AuNP_{TEG} und Histogramm in dem die Anzahl der Nanopartikel in der TEM-Aufnahme mit einem bestimmten Durchmesser gezeigt ist

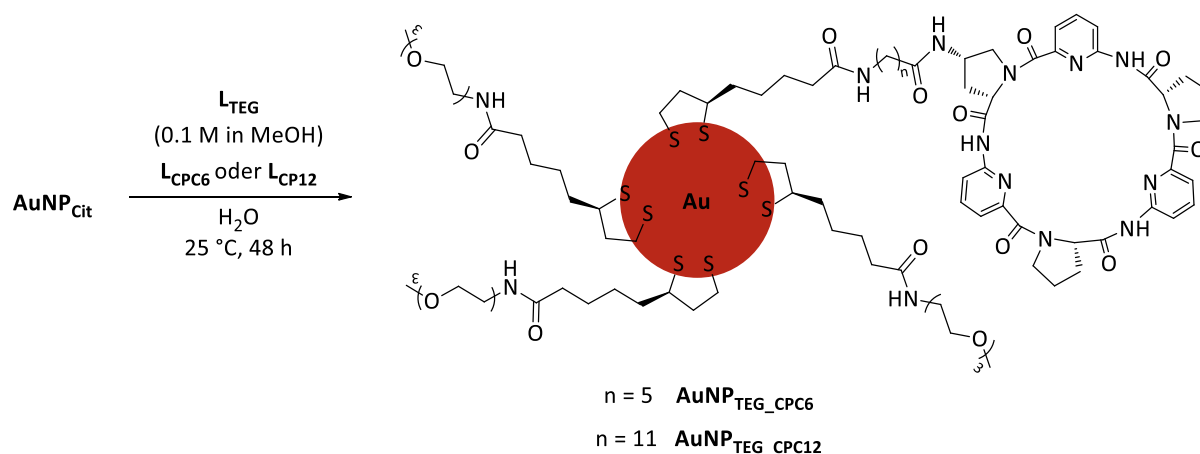
Diskussion der Darstellung und Untersuchung von AuNP_{TEG}

Die Ligandenaustauschreaktion führte wie gewünscht zu wasserlöslichen Goldnanopartikeln. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von AuNP_{TEG} (vgl. Abbildung 67) belegte, dass nach der Aufarbeitung Nanopartikel erhalten wurden, die kein Citrat oder Rückstände des freien Liganden L_{TEG} enthielten. Die Verbreiterung der L_{TEG} -Signale zeigt weiterhin, dass der Ligand auf der Nanopartikeloberfläche immobilisiert wurde.^[112]

Das Maximum der SPR-Bande im UV/VIS-Spektrum von AuNP_{TEG} bei 523 nm (vgl. Abbildung 68) steht im Einklang mit dem aus den TEM Aufnahmen (vgl. Abbildung 69) ermittelten Durchmesser von $10.2 \text{ nm} \pm 1.8 \text{ nm}$. Die TEM Bilder belegten außerdem indirekt, dass die im ersten Schritt erhaltenen Goldnanopartikel AuNP_{Cit} eine sphärische Form, Durchmesser im gewünschten Größenbereich sowie eine enge Größenverteilung aufwiesen.

Versuche zur Darstellung und Untersuchung von $\text{AuNP}_{\text{TEG_CPC6}}$ und $\text{AuNP}_{\text{TEG_CPC12}}$

Die Darstellung der gemischt-funktionalisierten Goldnanopartikel wurde unter analogen Bedingungen durchgeführt wie die Synthese von AuNP_{TEG} . Für die Austauschreaktionen wurde lediglich ein Gemisch des Liganden L_{TEG} mit dem Ligand L_{CPC6} beziehungsweise L_{CPC12} verwendet (Schema 23).



Schema 23: Versuch zur Darstellung von $\text{AuNP}_{\text{TEG_CPC6}}$ und $\text{AuNP}_{\text{TEG_CPC12}}$

In diesem Fall kam es bei der Zugabe der Lösung der Liganden in Methanol zu der wässrigen Goldnanopartikellösung sofort zu einer Trübung, welche wahrscheinlich durch die Unlöslichkeit der Liganden L_{CPC6} beziehungsweise L_{CPC12} in dem hauptsächlich wässrigen Lösungsmittelgemisch hervorgerufen wurde.

Aus diesem Grund wurden die Reaktionsbedingungen variiert. So wurde in nachfolgenden Versuchen die wässrige AuNP_{Cit} Lösung zunächst mit Methanol versetzt und erst anschließend die Ligandenlösung zugegeben. Durch diese Erhöhung des organischen Anteils im Lösungsmittelgemisch konnte das Ausfallen von L_{CPC6} verhindert werden, bei L_{CPC12} trat jedoch stets eine leichte Trübung des Reaktionsgemischs auf, sodass aufgrund der Unlöslichkeit von L_{CPC12} in wässrigen Gemischen die weiteren Untersuchungen ausschließlich mit L_{CPC6} durchgeführt wurden. Die Erhöhung des Methanolanteils im Lösungsmittelgemisch führte zwar zu einer Verbesserung der Löslichkeit von L_{CPC6} , nach Aufarbeitung der Nanopartikel wurde aber auf der Oberfläche kein Cyclopeptid nachgewiesen, sondern lediglich L_{TEG} . Daher

wurden neben der Lösungsmittelzusammensetzung und der Art des organischen Kosolvens (MeOH oder DMF) auch andere Parameter der Ligandenaustauschreaktion variiert. So wurde beispielsweise untersucht, ob ein zeitlicher Versatz zwischen der Zugabe von L_{CPC6} und L_{TEG} (zwischen 1 min bis hin zu 3 d) oder auch die Erhöhung der L_{CPC6} Menge relativ zur L_{TEG} Menge zur gewünschten Immobilisierung des Cyclopeptids führt. Eine Auswahl der getesteten Reaktionsbedingungen ist in Tabelle 9 zusammengefasst, wobei die zu jedem Eintrag gehörenden Experimente mindestens dreimal wiederholt wurden.

Tabelle 9: Verschiedene Ansätze zur Darstellung von $AuNP_{TEG_CPC6}$

Eintrag	MeOH / DMF	L_{CPC6} / L_{TEG}	Zeit zw. L_{CPC} und		Ergebnis
			L_{TEG} Zugabe		
1	5 mL MeOH	1/9	/		kein CP auf AuNP
2	20 mL MeOH	1/9	/		kein CP auf AuNP
3	40 mL MeOH	1/9	/		kein CP auf AuNP
4	40 mL MeOH	1/9	1 min		0 – 6 % CP auf AuNP
5	40 mL MeOH	1/9	1 h		0 – 4 % CP auf AuNP
6	40 mL MeOH	1/9	3 d		0 – 3 % CP auf AuNP
7	40 mL MeOH	2/8	1 min		kein CP auf AuNP
8	20 mL DMF	1/9	1 min		kein CP auf AuNP

Die Charakterisierung der so dargestellten Goldnanopartikel mittels 1H -NMR-Spektroskopie ergab, dass ausschließlich bei den Ansätzen in 67 Vol.-% Methanol/Wasser, bei denen L_{TEG} erst nach L_{CPC6} zugegeben wurde, ein geringer Anteil an Cyclopeptid auf dem Goldnanopartikel immobilisiert wurde. Exemplarisch sind in Abbildung 70 die NMR-Spektren der Liganden L_{TEG}

und L_{CPC6} und das Spektrum der Nanopartikel abgebildet, die unter den in Eintrag 5 angegebenen Bedingungen erhalten wurden.

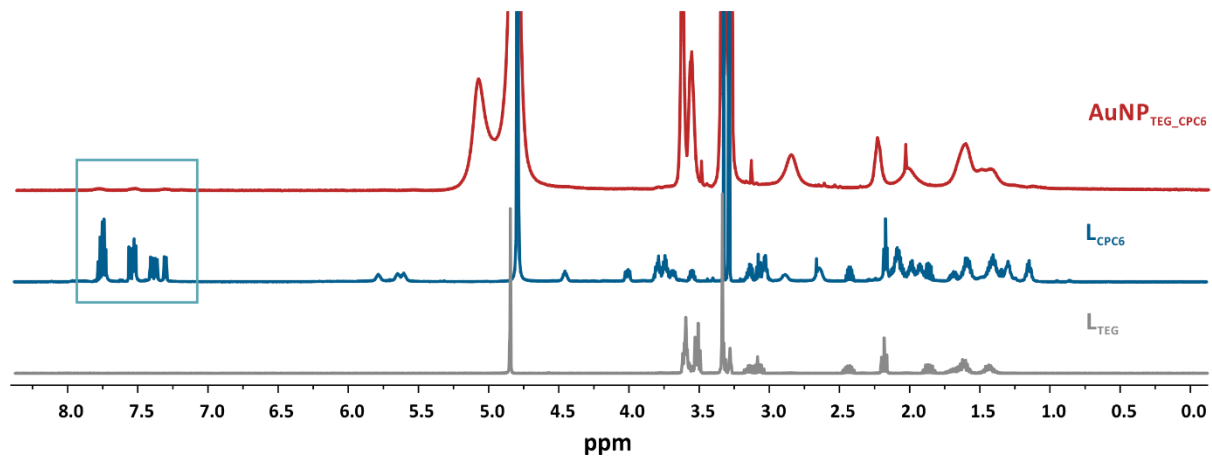


Abbildung 70: ^1H -NMR-Spektren der freien Liganden L_{TEG} und L_{CPC6} (400 MHz, 25 °C, MeOD-d_4) und von dem Goldnanopartikel AuNP_{TEG_CPC6} , der unter den in Eintrag 5 in Tabelle 9 angegebenen Bedingungen erhalten wurde (400 MHz, 25 °C, 50 Vol.-% $\text{MeOD-d}_4/\text{D}_2\text{O}$)

Im Spektrum des Nanopartikels sind zwischen 0 und 4 ppm die Signale von L_{TEG} enthalten. Die Signale der aromatischen Protonen des Cyclopeptids um 7.5 ppm sind hingegen sehr schwach. Aus dem Verhältnis der Integrale dieser Signale zu den Signalen von L_{TEG} ließ sich berechnen, dass der Anteil der Oberflächen-gebundenen Cyclopeptide mit circa 3 % wesentlich geringer war als der Anteil von L_{CPC6} während der Ligandenaustauschreaktion.

Letztlich konnte in keiner der durchgeführten Austauschreaktionen (vgl. Experimentaltteil Tabelle 10) reproduzierbar die substanzielle Immobilisierung von L_{CPC6} auf der Nanopartikeloberfläche erreicht werden.

Diskussion zur Darstellung und Untersuchung von AuNP_{TEG_CPC6} und AuNP_{TEG_CPC12}

Die Darstellung gemischt-funktionalisierter Goldnanopartikel durch direkte Immobilisierung der Liganden L_{TEG} und L_{CPC6} bzw. L_{CPC12} gelang nicht. Bei L_{CPC12} war die geringe Löslichkeit dieses Liganden in wässrigen Lösungsmittelgemischen wohl der Hauptgrund dafür, dass dieser Ligand nicht mit den Citrat-geschützten Nanopartikeln reagierte. L_{CPC6} war etwas besser löslich

und bei Verwendung von Methanol/Wasser oder DMF/Wasser Gemischen mit ausreichend hohem organischem Anteil erschienen die Reaktionslösungen homogen. Nach Aufarbeitung waren mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie jedoch keine immobilisierten Cyclopeptide nachweisbar. Bei einer weiteren Erhöhung des organischen Anteils im Reaktionsgemisch auf über 67 Vol.-% wurde die Aggregation der Nanopartikel beobachtet, sodass der Variation der Lösungsmittelzusammensetzung dahingehend Grenzen gesetzt waren.

Da bei den meisten Versuchen zur Immobilisierung der Liganden ein Verhältnis von $\text{L}_{\text{TEG}}/\text{L}_{\text{CPC6}}$ von 9:1 eingesetzt wurde, um die Anzahl der Rezeptoreinheiten pro Nanopartikel gering zu halten, aber nicht annähernd 10 % an CP-haltigem Ligand auf der Nanopartikeloberfläche gebunden wurde, scheint es nun so, dass L_{TEG} entweder schneller oder effektiver immobilisiert wird als der funktionelle Ligand L_{CPC6} .

Im ersten Fall wäre die Ursache für die ausbleibende Immobilisierung kinetischer Natur. Aus der Literatur ist bekannt, dass Liganden in Abhängigkeit ihrer Struktur, Konformation und Sterik unterschiedliche Adsorptionsgeschwindigkeiten aufweisen können.^[113–115] Daher sollte überprüft werden, ob die sequenzielle Zugabe der Liganden, zu einer verstärkten Immobilisierung des zuerst angebotenen Liganden führt. Ansätze bei denen L_{CPC6} eine Minute, eine Stunde oder sogar drei Tage vor L_{TEG} zur Reaktionsmischung der Austauschreaktion hinzugegeben wurden, führten aber ebenfalls nicht zu einer nennenswerten Immobilisierung des Cyclopeptids. Nur in wenigen Ansätzen wurden eine geringe Mengen L_{CPC6} auf den Nanopartikeln nachgewiesen (vgl. Abbildung 70), wobei sich dieses Ergebnis als nicht reproduzierbar erwies. Zudem stieg die Menge an immobilisierten Cyclopeptid auch nicht an, wenn bei der zeitversetzten Zugabe der Liganden der Anteil an L_{CPC6} durch Veränderung des $\text{L}_{\text{TEG}}/\text{L}_{\text{CPC6}}$ Verhältnisses von 9:1 auf 8:2 verändert wurde. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass die beobachtete präferierte Immobilisierung von L_{TEG} gegenüber L_{CPC6} vermutlich keine kinetischen Gründe hatte.

Neben kinetischen Aspekten können weitere Faktoren den Ligandenaustausch beeinflussen,^[113,114,116] wobei in diesem Fall physikalische oder strukturelle Eigenschaften der Liganden wahrscheinlich sind. Zum einen wäre es vorstellbar, dass trotz augenscheinlich klarer Reaktionslösung L_{CPC6} nicht vollständig im wässrigen Reaktionsgemisch gelöst war und entsprechend nicht für die Immobilisierung zur Verfügung stand. Zum anderen könnte L_{CPC6} in

dem verwendeten Lösungsmittelgemisch womöglich eine für die Adsorption an die Goldoberfläche ungünstige Konformation besitzen und deswegen nicht immobilisiert werden.

3.3.2 Darstellung gemischt-funktionalisierter Goldnanopartikel durch Kombination von Ligandenaustausch- und Kupplungsreaktion

3.3.2.1 Synthetische Vorüberlegungen zur Darstellung der Goldnanopartikel

Da die gemischt-funktionalisierten Goldnanopartikel nicht durch simultane Immobilisierung der Liganden L_{TEG} und L_{CPC6} zugänglich waren, wurde eine alternative Synthese zum Erhalt der Zielverbindung getestet.

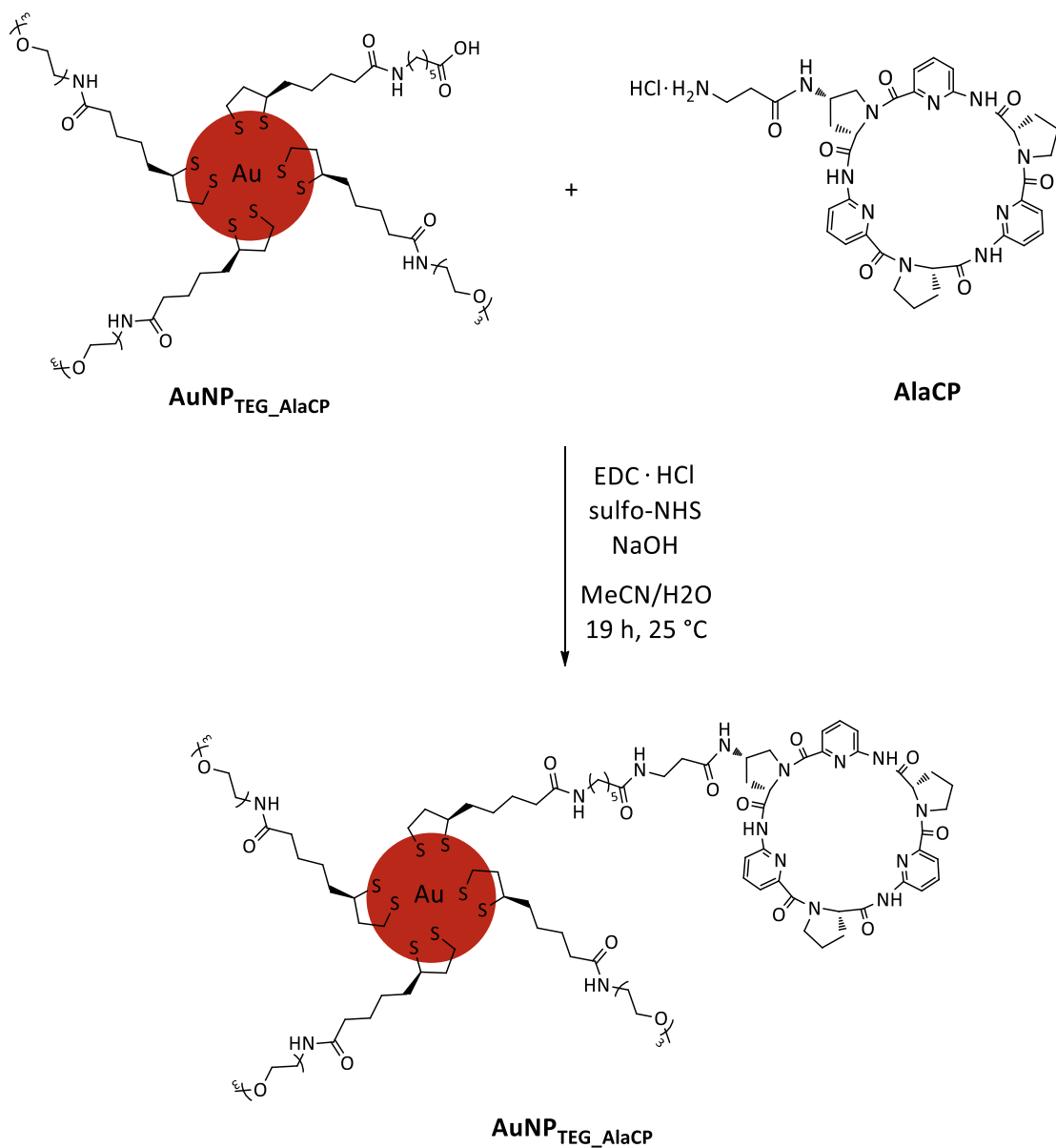


Abbildung 71: Alternative Synthesestrategie zur Darstellung der gewünschten Cyclopeptid-haltigen Goldnanopartikel

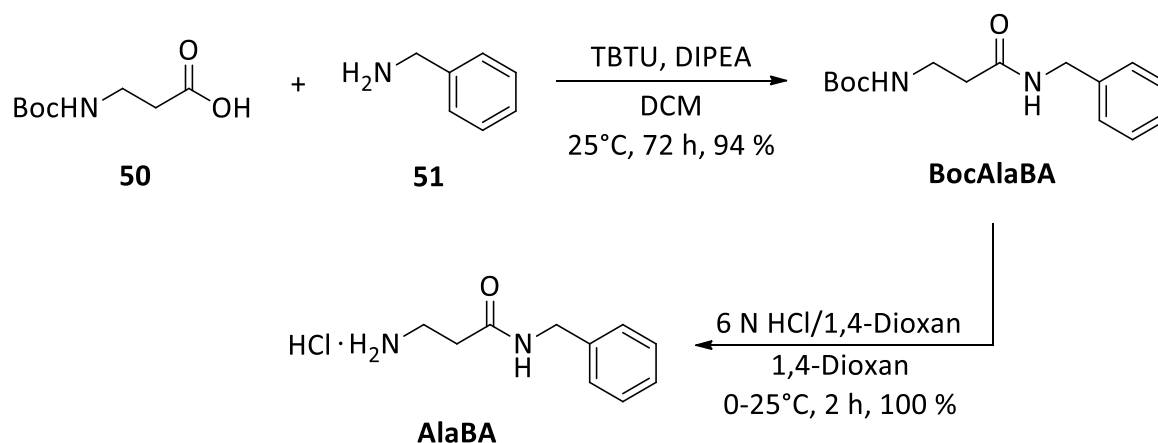
Diese Strategie basierte auf publizierten Arbeiten zur Funktionalisierung von Goldnanopartikeln, in denen gezeigt wurde, dass Nanopartikel mit Oberflächen-gebundenen Carbonsäurederivaten unter dem Einfluss von EDC als Kupplungsreagenz mit Aminen zur Reaktion gebracht werden können.^[95,117]

Für die Umsetzung dieses Konzepts sollte ausgehend von **AuNP_{Cit}** zunächst ein gemischt-funktionalisierter Nanopartikel dargestellt werden, der neben **L_{TEG}** das Carbonsäurederivat **48** als Ligand enthält. An dieses Carbonsäurederivat sollte in einem nachfolgenden Schritt ein geeignetes Cyclopeptid unter Bildung einer Amidbindung gekuppelt werden, um so die gewünschten Rezeptor-haltigen Goldnanopartikel zu erhalten (Abbildung 71). In dieser Kupplung könnte beispielsweise Cyclopeptidmonoamin **41** eingesetzt werden, jedoch erschien es sinnvoller **41** durch die Einführung eines β -Alaninsubstituenten in ein aufgrund der geringeren sterischen Hinderung der reagierenden Aminogruppe wahrscheinlich reaktiveres Derivat zu überführen.

3.3.2.2 Darstellung der Amine

Darstellung des Amins AlaBA

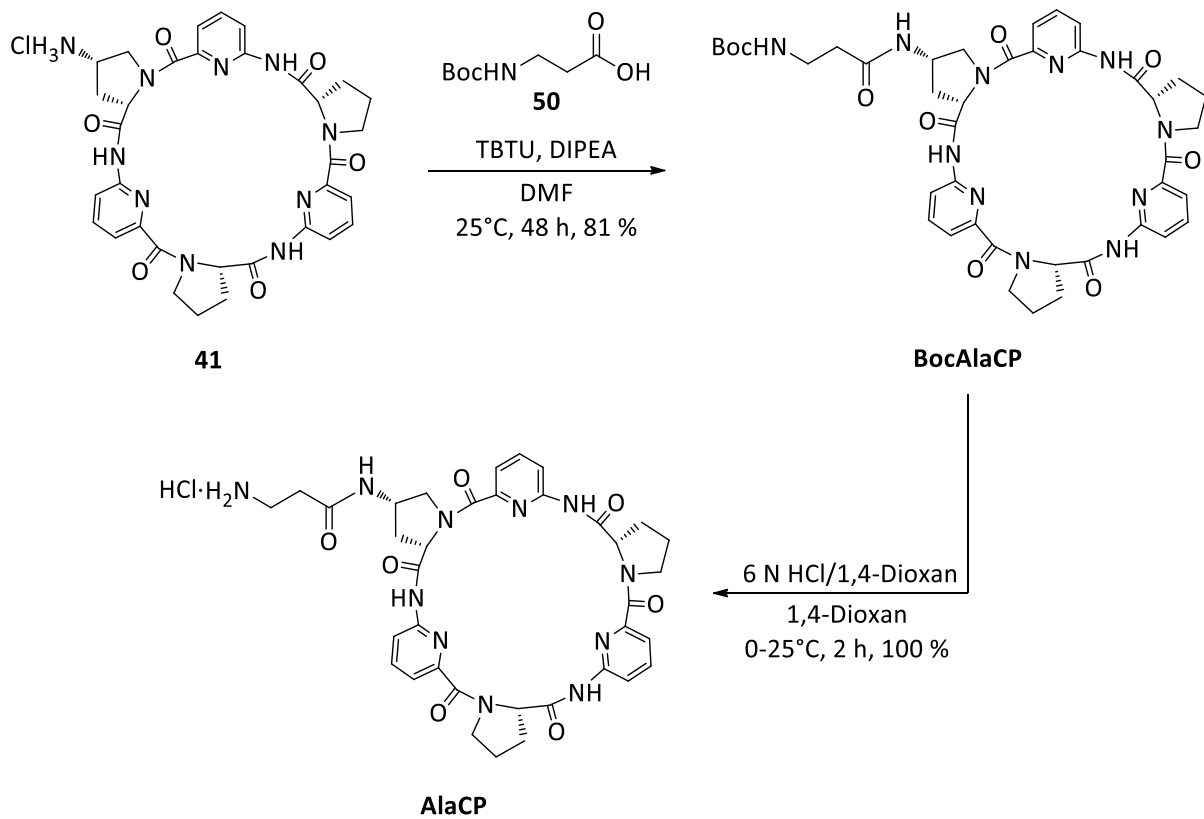
Da die Synthese und Derivatisierung des Cyclopeptids sehr zeitintensiv, in den letzten Schritten typischerweise mit niedrigeren Ausbeuten verbunden ist und die Kupplung auf Goldnanopartikeln bisher im Arbeitskreis nicht etabliert war, sollte die Funktionalisierung der Nanopartikel zunächst mit einer Modellverbindung durchgeführt werden. Die gewählte Modellverbindung **AlaBA** wurde durch Kupplung von Boc- β -Alanin **50** mit Benzylamin **51** und anschließender Entschützung des N-Terminus erhalten (Schema 24).



Schema 24: Darstellung von **AlaBA**

Darstellung des Amins AlaCP

In analoger Weise wurde das Cyclopeptidderivat **AlaCP** dargestellt. Dazu wurde Cyclopeptidmonoamin **41** mit Boc- β -Alanin **50** gekuppelt und anschließend die Boc-Schutzgruppe abgespalten (Schema 25).



Schema 25: Darstellung von AlaCP

Diskussion der Aminsynthesen

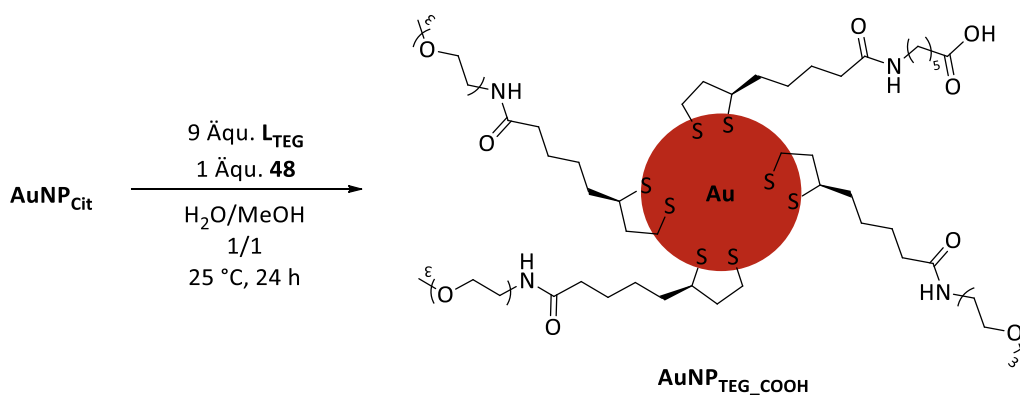
Beide für die Nanopartikelfunktionalisierung benötigten Amine wurden in kurzen Reaktionssequenzen dargestellt und in sehr guten Ausbeuten analysenrein isoliert.

3.3.2.3 Zweistufige Darstellung gemischt-funktionalisierter Goldnanopartikel

Zweistufige Funktionalisierung der Goldnanopartikel

Darstellung und Charakterisierung von $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaBA}}$

Der erste Schritt der Goldnanopartikelsynthese bestand in diesem Fall in der Umsetzung dialysierter AuNP_{Cit} mit einem Gemisch aus L_{TEG} und dem Carbonsäurederivat **48** im Verhältnis 9:1 (Schema 26).



Schema 26: Darstellung der Goldnanopartikelzwischenstufe $\text{AuNP}_{\text{TEG_COOH}}$

Das so erhaltene Produkt $\text{AuNP}_{\text{TEG_COOH}}$ wurde während der Aufarbeitung vollständig von überschüssigen Liganden befreit, was mit Hilfe eines ^1H -NMR-Spektrums belegt wurde (Abbildung 72). Dieses Spektrum lieferte aber keine Informationen, ob **48** neben L_{TEG} tatsächlich immobilisiert wurde und falls ja in welchem Umfang. Der Grund ist, dass sich die ^1H -NMR-Spektren von L_{TEG} und **48** hinsichtlich der Lage der Signale so ähnlich sind, dass die verbreiterten Signale beider Liganden im Spektrum des Nanopartikels nicht differenziert werden können. Das NMR-Spektrum von $\text{AuNP}_{\text{TEG_COOH}}$ ist dem des Spektrums des Nanopartikels AuNP_{TEG} , der ausschließlich L_{TEG} enthielt, entsprechend so ähnlich, dass zu diesem Zeitpunkt keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob auf dieser Stufe ein gemischt-funktionalisierter Nanopartikel erhalten wurde.

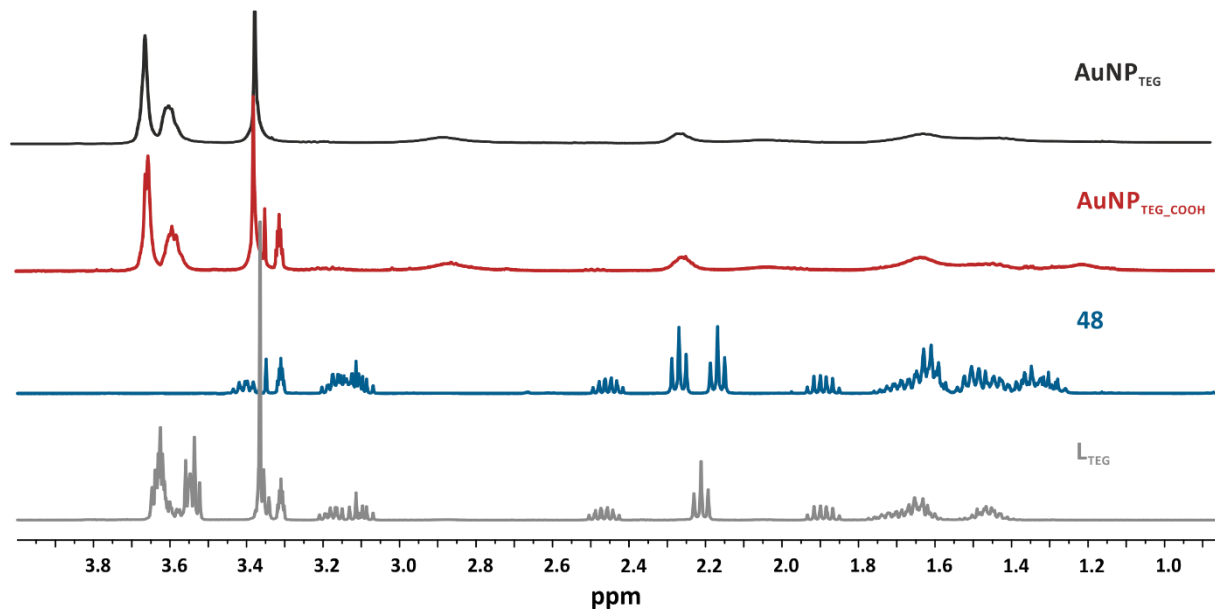
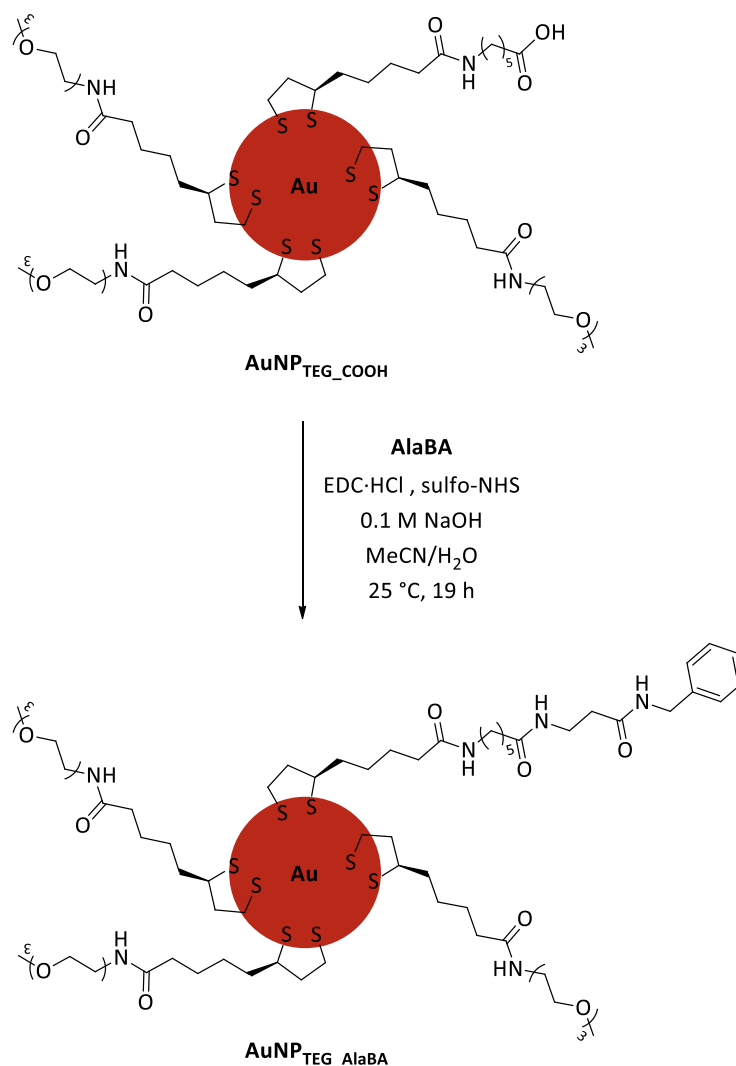


Abbildung 72: ¹H-NMR-Spektren der freien Liganden L_{TEG} und **48** (400 MHz, 25 °C, MeOD-d₄), von AuNP_{TEG_COOH} (400 MHz, 25 °C, 50 Vol.-% MeOD-d₄/D₂O) und von AuNP_{TEG} (400 MHz, 25 °C, D₂O)

Um zu überprüfen, ob das Carbonsäurederivat **48** tatsächlich auf der Oberfläche des Goldnanopartikels immobilisiert wurde und damit eine anschließende Derivatisierung über eine Amidkupplung möglich war, wurde AuNP_{TEG_COOH} in Anlehnung an Literatur-bekannte Vorschriften^[95,117] mit dem Amin **AlaBA** in Gegenwart von EDC · HCl und sulfo-NHS weiter umgesetzt (Schema 27).



Schema 27: Darstellung von **AuNP_{TEG_AlaBA}**

Das nach der Aufarbeitung erhaltene Produkt **AuNP_{TEG_AlaBA}** war vollständig in wasserlöslich. Die ¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung zeigte, dass das Produkt keine freien Liganden als Verunreinigung enthält. Der Vergleich der Spektren des Liganden **L_{TEG}** und des Boc-geschützten Amins **BocAlaBA** mit dem Spektrum des Nanopartikels **AuNP_{TEG_AlaBA}** zeigt weiterhin die charakteristischen Signale beider Verbindungen, welche entsprechend gleichzeitig auf dem Nanopartikel gebunden sind (Abbildung 73). Es soll erwähnt werden, dass das Signal der Boc-CH₃-Gruppe im Spektrum des Nanopartikels fehlt, da die Schutzgruppe vor der Kupplungsreaktion abgespalten wurde.

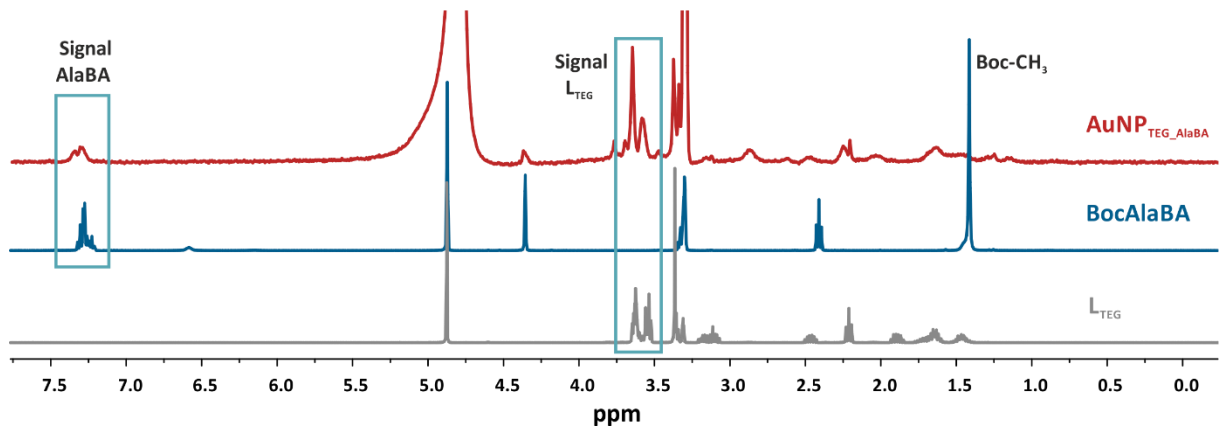


Abbildung 73: ^1H -NMR-Spektren des freien Liganden L_{TEG} , des Boc-geschützten Amins **BocAlaBA** (400 MHz, 25 °C, MeOD-d_4) und von $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaBA}}$ (400 MHz, 25 °C, 50 Vol.-% $\text{MeOD-d}_4/\text{D}_2\text{O}$)

Durch die Integration charakteristischer Signale im Goldnanopartikelspektrum konnte das relative Verhältnis der beiden immobilisierten Liganden bestimmt werden (Abbildung 74).

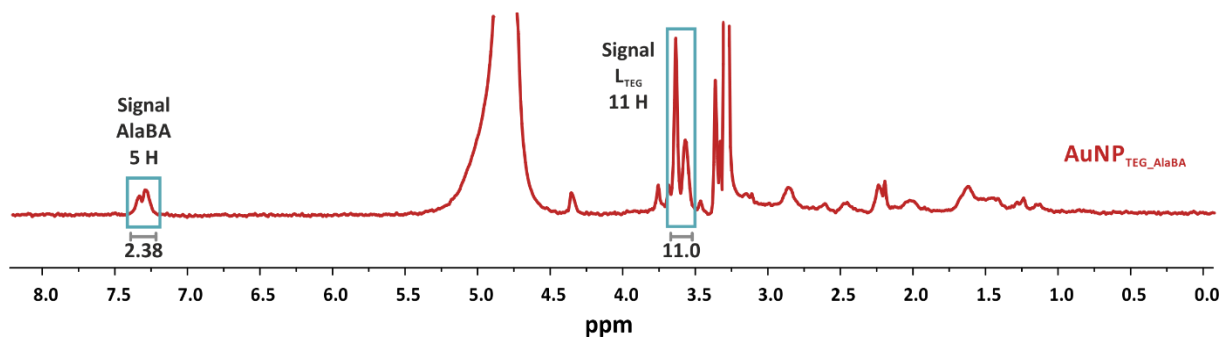


Abbildung 74: ^1H -NMR-Spektrum von $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaBA}}$ (400 MHz, 25 °C, 50 Vol.-% $\text{MeOD-d}_4/\text{D}_2\text{O}$) mit Integralen zur Bestimmung des Ligandenverhältnisses

Basierend auf den Integralen beträgt der Anteil des **AlaBA**-haltigen Liganden

$$\text{Anteil AlaBA} = \frac{\frac{2.38}{5}}{\left(\frac{2.38}{5} + \frac{11}{11}\right)} = 32 \%$$

Damit ergibt sich ein **AlaBA**/ L_{TEG} Verhältnis von etwa 1:2.

Die im UV/VIS-Spektrum von **AuNP**_{TEG_AlaBA} auftretende SPR-Bande hat ein Maximum bei 523 nm (Abbildung 75).

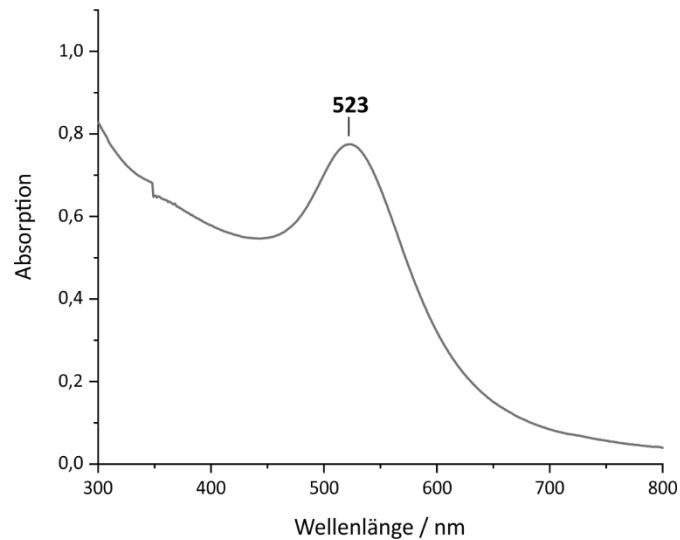


Abbildung 75 UV/VIS-Spektrum von **AuNP**_{TEG_AlaBA} in Wasser

TEM-Aufnahmen von **AuNP**_{TEG_AlaBA} zeigen, dass die Nanopartikel eine sphärische Gestalt und einen mittleren Durchmesser von $9.7 \text{ nm} \pm 1.7 \text{ nm}$ besitzen (Abbildung 76).

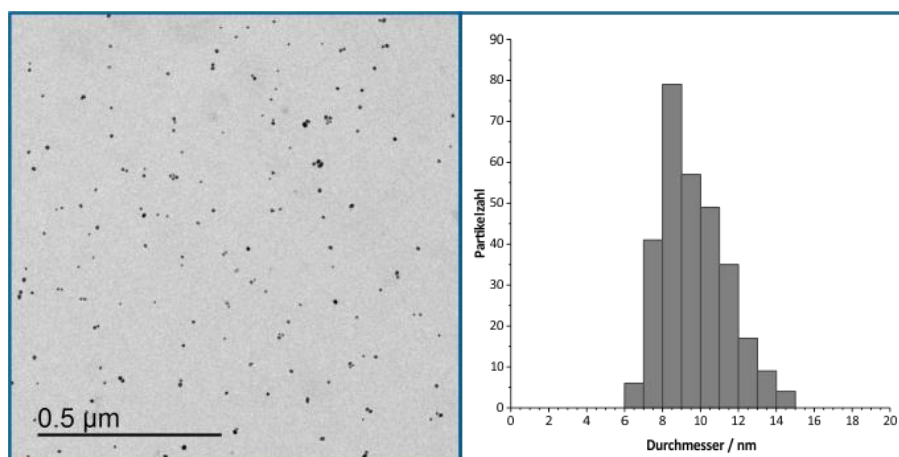


Abbildung 76: TEM-Aufnahme von **AuNP**_{TEG_BA} und Histogramm in dem die Anzahl der Nanopartikel in der TEM-Aufnahme mit einem bestimmten Durchmesser dargestellt ist

Diskussion zur Darstellung und Charakterisierung von $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaBA}}$

Die im ersten Schritt durch eine Ligandenaustauschreaktion eines Gemischs von L_{TEG} und **48** mit AuNP_{Cit} erhaltenen Nanopartikel $\text{AuNP}_{\text{TEG_COOH}}$ wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie charakterisiert. Damit konnte eindeutig belegt werden, dass überschüssige Liganden erfolgreich abgetrennt wurden. Da die beiden Liganden aber sehr ähnliche NMR-Spektren ohne deutlich unterscheidbare Signale besitzen, war es nicht möglich aus dem Spektrum des Nanopartikels abzuleiten, ob das Carbonsäurederivat **48** immobilisiert wurde und wenn ja, in welchem Ausmaß (vgl. Abbildung 72).

Aus diesem Grund wurde $\text{AuNP}_{\text{TEG_COOH}}$ mit **AlaBA** in einer EDC-vermittelten Kupplung umgesetzt, wobei erwartet wurde, dass bei erfolgreicher Kupplung die Signale der aromatischen Protonen von **AlaBA** eindeutig sichtbar und von den Signalen von L_{TEG} differenzierbar sein sollten. In der Tat wurde im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des aus der Kupplung resultierenden Produkts $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaBA}}$ zusätzlich zu den Signalen der aliphatischen Protonen der Liganden ein verbreitertes Signal bei circa 7.3 ppm beobachtet (vgl. Abbildung 73), das den Erfolg der Kupplung belegte. Dieser Befund bestätigte darüber hinaus rückwirkend, dass im ersten Schritt der Reaktionssequenz ein gemischt-funktionalisierter Goldnanopartikel erhalten wurde, der neben L_{TEG} auch **48** enthielt.

Durch Signalintegration wurde ein $\text{L}_{\text{TEG}}/\text{AlaBA}$ Verhältnis von 2:1 bestimmt (vgl. Abbildung 74). Berücksichtigt man, dass das Verhältnis von L_{TEG} und **48** während der Ligandenaustauschreaktion ursprünglich 9:1 betrug, befand sich demnach wesentlich mehr **AlaBA** auf dem Nanopartikel als erwartet. Dies deutet an, dass bei der gemeinsamen Immobilisierung von L_{TEG} und **48** wiederum einer der Liganden bevorzugt mit AuNP_{Cit} reagierte, in diesem Fall das Carbonsäure-Derivat **48**. Auch in diesem Fall könnten hierfür strukturelle bzw. konformative Unterschiede der beiden Liganden verantwortlich gewesen sein. Im Ergebnis führte dies dazu, dass der Anteil des funktionalisierten Liganden auf der Nanopartikeloberfläche höher als ursprünglich geplant war. Da es an dieser Stelle des Projekts jedoch wichtiger erschien, die Bindungseigenschaften eines mit einem Cyclopeptidderivat modifizierten Nanopartikels zu evaluieren, wurden keine weiteren Untersuchungen zur Darstellung von $\text{AuNP}_{\text{TEG_COOH}}$ mit einem anderen Belegungsgrad durchgeführt. Die UV/VIS-

Messungen (vgl. Abbildung 75) und TEM-Aufnahmen (vgl. Abbildung 76) belegten, dass die erhaltenen Goldnanopartikel wie erwartet eine ähnliche Größe und Form wie **AuNP_{TEG}** hatten.

Darstellung und Charakterisierung von $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaCP}}$

Die Reaktionssequenz der Synthese von $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaBA}}$ wurde auf die Darstellung des Cyclopeptid-haltigen Goldnanopartikel übertragen. Entsprechend wurde $\text{AuNP}_{\text{TEG_COOH}}$ auf analoge Weise mit **AlaCP** umgesetzt (Abbildung 77).

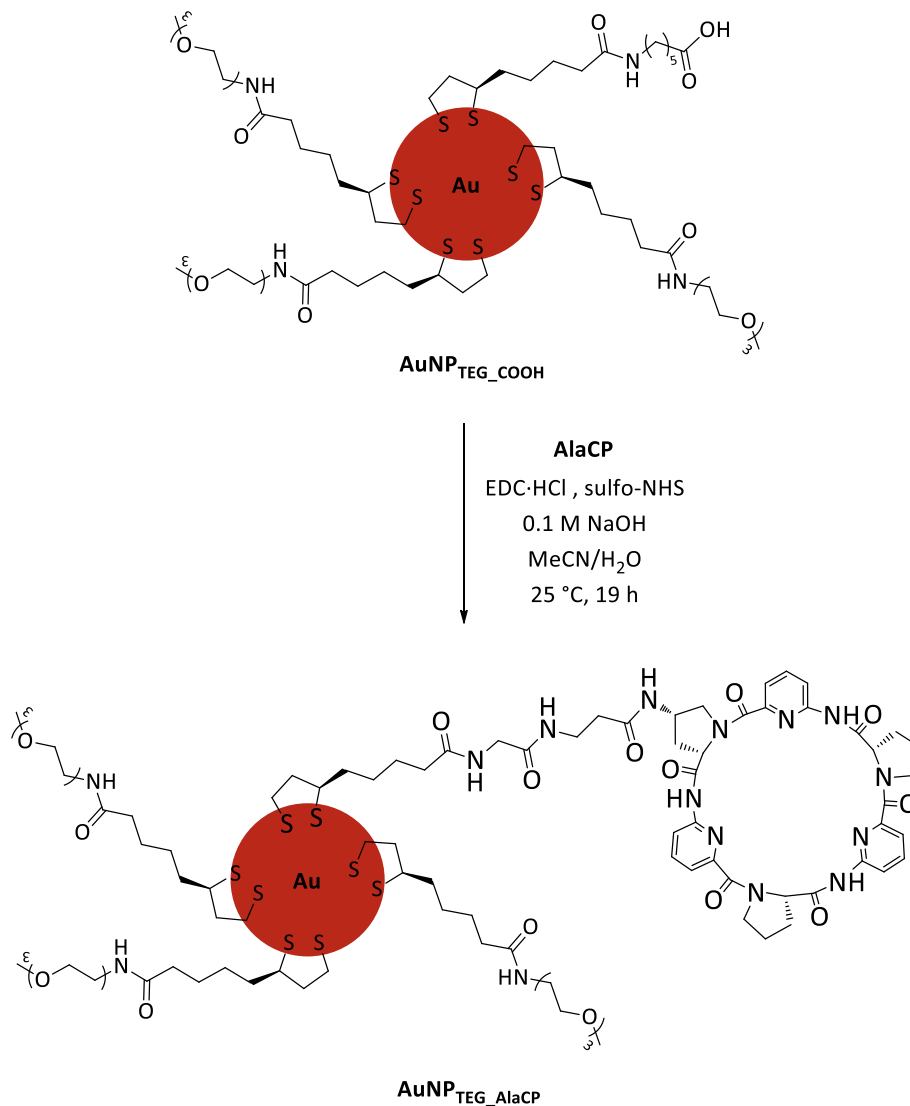


Abbildung 77: Darstellung von $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaCP}}$

Das nach Aufarbeitung erhaltene Produkt war wasserlöslich und die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Charakterisierung von $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaCP}}$ zeigte, dass der Nanopartikel keinerlei

Verunreinigungen enthält. Weiterhin sind sowohl im aromatischen als auch im aliphatischen Bereich die verbreiterten Signale beider Liganden zu erkennen (Abbildung 78).

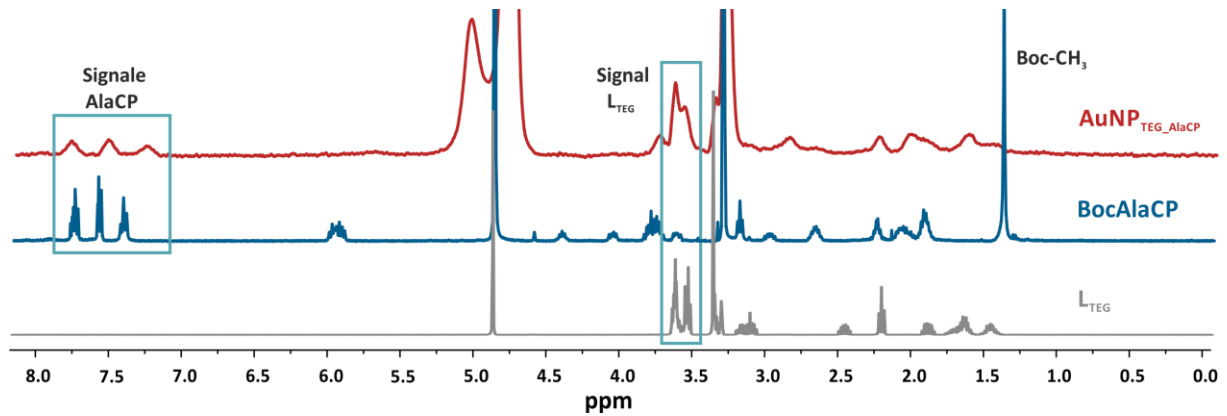


Abbildung 78: ^1H -NMR-Spektren des freien Liganden L_{TEG} , des Boc-geschützten Cyclopeptidamins BocAlaCP (400 MHz, 25 °C, MeOD-d_4) und von $\text{AuNP}_{\text{TEG-AlaCP}}$ (400 MHz, 25 °C, 50 Vol.-% $\text{MeOD-d}_4/\text{D}_2\text{O}$)

Zur Bestimmung des Ligandenverhältnisses wurden wiederum charakteristische Signale der beiden Liganden integriert (Abbildung 79).

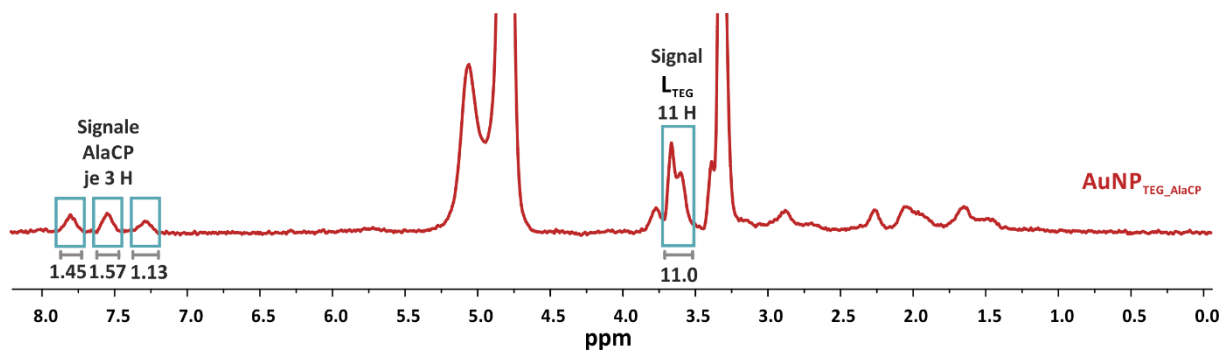


Abbildung 79: ^1H -NMR-Spektrum von $\text{AuNP}_{\text{TEG-AlaCP}}$ (400 MHz, 25 °C, 50 Vol.-% $\text{MeOD-d}_4/\text{D}_2\text{O}$) mit Integralen zur Bestimmung des Ligandenverhältnisses

Der Anteil des **AlaCP**-haltigen Liganden ergibt sich zu

$$\text{Anteil AlaCP} = \frac{(1.45 + 1.57 + 1.13)}{\left(\frac{(1.45 + 1.57 + 1.13)}{9} + \frac{11}{11}\right)} = 32 \%$$

Auch bei diesem Nanopartikel beträgt das Verhältnis von L_{TEG} zu dem funktionalisierten Liganden, in diesem Falle **AlaCP**, demnach also 1:2.

Das Maximum der SPR-Bande im UV/VIS-Spektrum von $AuNP_{TEG_AlaCP}$ liegt bei 524 nm (Abbildung 80).

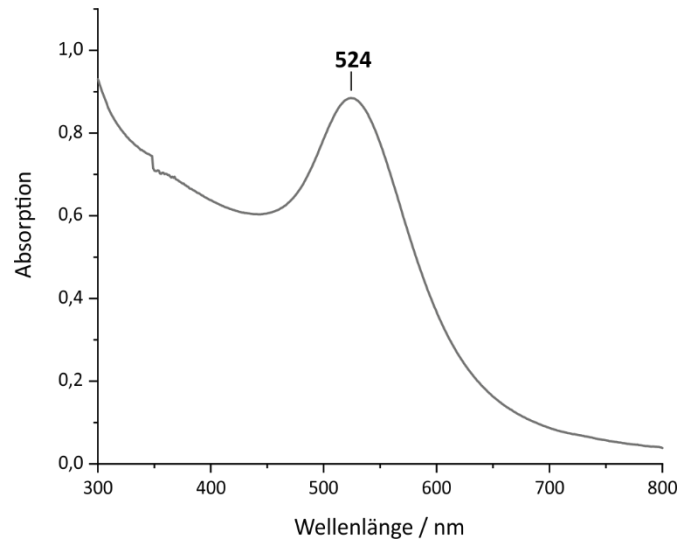


Abbildung 80: UV/VIS-Spektrum von $AuNP_{TEG_AlaCP}$ in Wasser

Der mittlere Durchmesser von $AuNP_{TEG_AlaCP}$ ergibt sich anhand von TEM-Aufnahmen zu $9.9 \text{ nm} \pm 1.8 \text{ nm}$ (Abbildung 81).

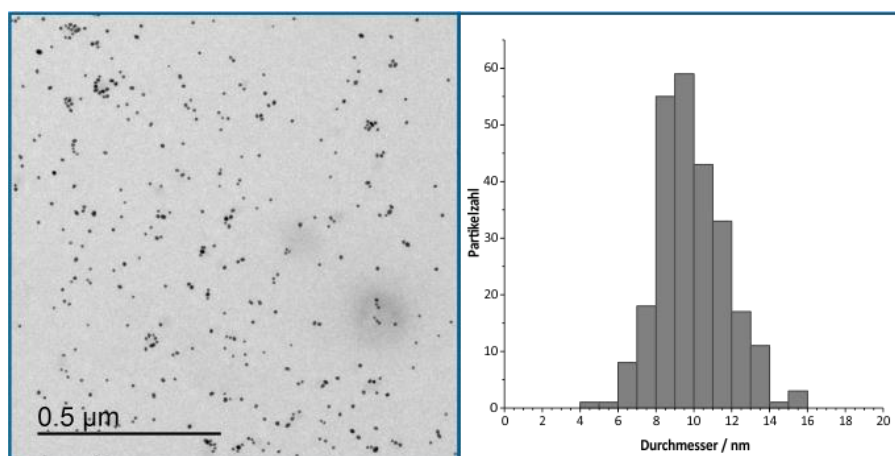


Abbildung 81: TEM-Aufnahme von $AuNP_{TEG_AlaCP}$ und Histogramm in dem die Anzahl der Nanopartikel in der TEM-Aufnahme mit einem bestimmten Durchmesser dargestellt ist

Diskussion zur Darstellung und Charakterisierung von $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaCP}}$

Die für die Darstellung des Nanopartikels $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaBA}}$ identifizierten Reaktionsbedingungen eigneten sich ebenso für die Darstellung des Cyclopeptid-haltigen Goldnanopartikels $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaCP}}$. Die Charakterisierung von $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaCP}}$ mittels ^1H -NMR-Spektroskopie belegte, dass die Nanopartikel neben dem Liganden L_{TEG} auch Cyclopeptideinheiten auf der Oberfläche enthielten. Besonders prägnant ist dies an den drei breiten Signalen zwischen 7 und 8 ppm erkennbar, die den Protonen der 6-Aminopicolinsäureuntereinheit des Cyclopeptids zuzuordnen sind (vgl. Abbildung 78). Durch die Integration von Signalen der beiden Liganden wurde auch für $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaCP}}$ ein Verhältnis von L_{TEG} zu AlaCP von 2:1 ermittelt (vgl. Abbildung 79). Dieses Verhältnis entsprach dem zuvor für $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaBA}}$ gefundenen, was ein indirektes Indiz für die Reproduzierbarkeit der Amidkupplung ist und für einen vollständigen Reaktionsumsatz spricht. Die strukturelle Charakterisierung von $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaCP}}$ mittels UV/VIS-Spektroskopie und TEM lieferte Ergebnisse, die sich mit den für $\text{AuNP}_{\text{TEG_AlaBA}}$ und AuNP_{TEG} erhaltenen deckten.

3.3.3 Untersuchungen der Goldnanopartikel

3.3.3.1 Qualitative visuelle Bindungsstudien

Für einleitende qualitative Studien zur möglichen Detektion von Anionen mit Hilfe von **AuNP**_{TEG_AlaCP} wurden Lösungen des Nanopartikels in Wasser mit zunehmenden Mengen verschiedener Natriumsalz-Stammlösungen versetzt. Insgesamt wurden neun verschiedene Salze verwendet, nämlich Natriumchlorid, Natriumbromid, Natriumiodid, Natriumsulfat, Natriumcarbonat, Dinatriumhydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenarsenat, Natriumpyrophosphat und Natriumnitrat. Nach der ersten Zugabe der Lösungen der Natriumsalze zu der jeweiligen Nanopartikellösung betrug die Anionenkonzentration jeweils 0.5 mM. Die Salzkonzentrationen der einzelnen Probenlösungen wurden in Schritten von 0.5 mM sukzessive erhöht, bis bei einer Konzentration von 2.5 mM in der Probe mit Natriumsulfat eine Trübung zu beobachten war. Alle anderen Lösungen waren zu diesem Zeitpunkt unverändert (Abbildung 82 oben).

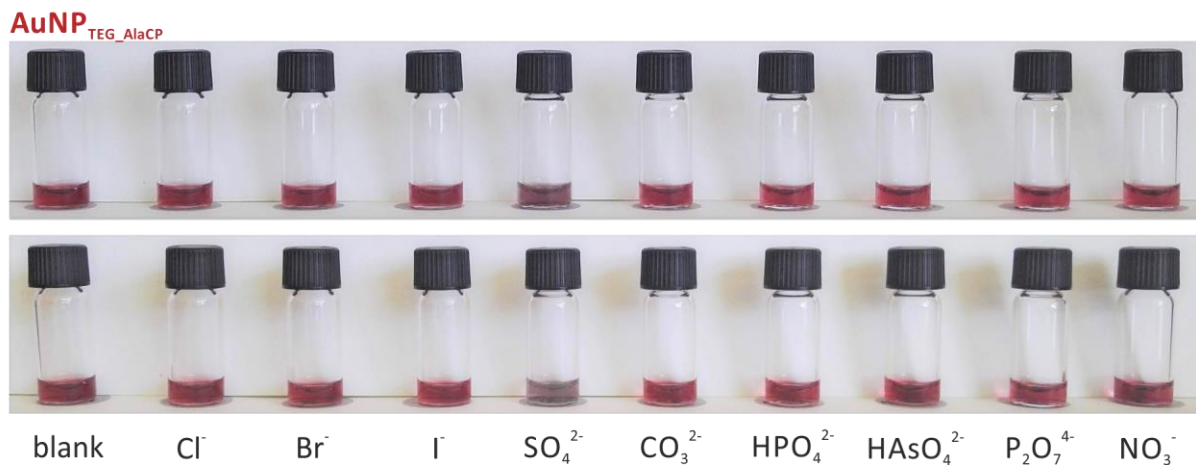


Abbildung 82: Bilder der Lösungen von **AuNP**_{TEG_AlaCP} (0.25 mg/mL) in Gegenwart verschiedener Natriumsalze (2.5 mM) in Wasser nach 5 min (oben) und 30 min (unten)

Nach 30 Minuten setzte sich in der Sulfatprobe am Boden ein schwarzer Feststoff ab. Die überstehende Lösung war blass-rosa. Bei allen weiteren Proben traten auch nach 30 min keine sichtbaren Veränderungen auf (Abbildung 82 unten). Auch die Erhöhung der Salzkonzentration oder das Stehenlassen der Proben über Nacht verursachte in keiner dieser Lösungen eine Veränderung.

Eine analoge Testreihe wurde mit **AuNP**_{TEG_AlaBA} durchgeführt. In diesem Fall reagierte keine der Proben auf die Salzzugabe (Abbildung 83).

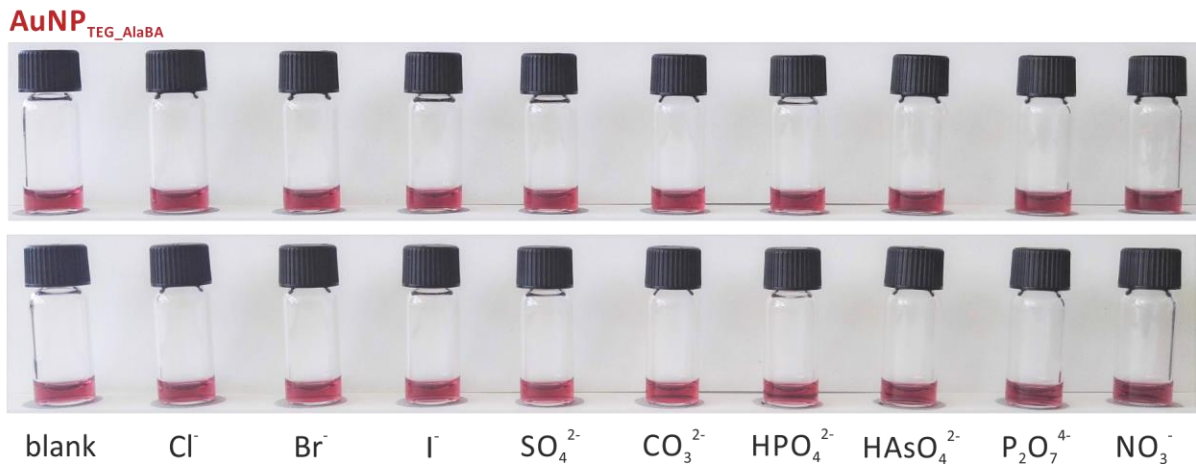


Abbildung 83: Bilder der Lösungen von **AuNP**_{TEG_AlaBA} (0.25 mg/mL) in Gegenwart verschiedener Natriumsalze (2.5 mM) in Wasser nach 5 min (oben) und 30 min (unten)

3.3.3.3 UV/VIS-spektroskopische Bindungsstudien

Zur Bestimmung der minimalen Sulfatkonzentration, bei der eine optische Veränderung der Lösung von **AuNP**_{TEG-AlaCP} stattfindet, wurden UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden wässrige Lösungen dieses Goldnanopartikels mit steigenden Mengen an Natriumsulfat versetzt, sodass die Salzkonzentration zwischen 0 und 12.5 mM variierte und die UV/VIS-Spektren dieser Lösungen fünf Minuten nach Salzzugabe vermessen (Abbildung 85).

Mit zunehmender Sulfatkonzentration wird hierbei eine kontinuierliche Abnahme der Intensität der SPR-Bande beobachtet, wobei die erste deutliche Intensitätsänderung im Vergleich zu der Lösung ohne Natriumsulfat bei einer Sulfatkonzentration von 2.0 mM zu verzeichnen ist. Das Maximum der SPR-Bande verschiebt sich nur geringfügig von anfangs 524 nm zu 529 nm.

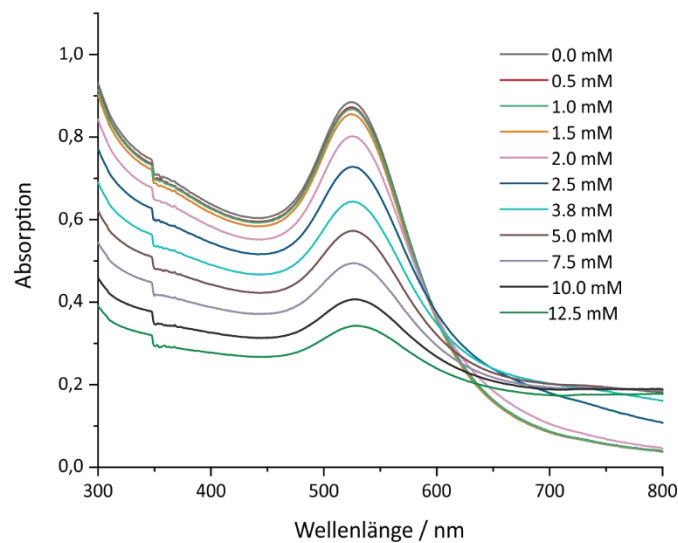


Abbildung 85: UV/VIS-Spektren des Goldnanopartikels **AuNP**_{TEG-AlaCP} (0.25 mg/mL) in Wasser in Gegenwart steigender Mengen Natriumsulfat nach jeweils 5 min

Zusätzlich wird beobachtet, dass die Intensität der SPR-Bande nicht nur mit ansteigender Anionenkonzentration abnimmt, sondern es mit der Zeit zu einer weiteren Abnahme kommt. So hat die SPR-Bande im Spektrum mit einer Sulfatkonzentration von 2.5 mM nach 30 Minuten

eine wesentlich geringere Intensität als im nach fünf Minuten aufgenommenen Spektrum, was in Einklang mit der zunehmenden Entfärbung der Lösung steht (Abbildung 86).

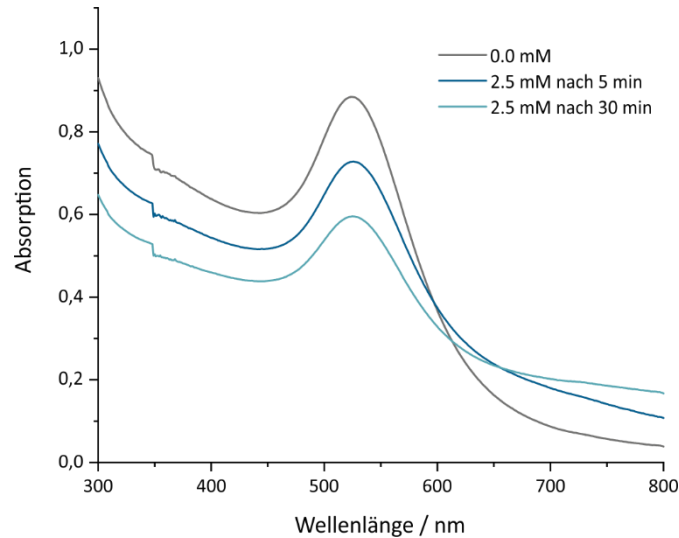


Abbildung 86: UV/VIS-Spektren des Goldnanopartikels $\text{AuNP}_{\text{TEG-AlaCP}}$ (0.25 mg/mL) in Wasser ohne Anion und mit einer Natriumsulfatkonzentration von 2.5 mM nach 5 und 30 min

Um zu überprüfen, ob UV/VIS-spektroskopische Veränderungen des Spektrums von $\text{AuNP}_{\text{TEG-AlaCP}}$ in Gegenwart anderer Anionen als Sulfat erkennbar sind, wurden zusätzlich Spektren von Lösungen aufgenommen, die anstelle von Natriumsulfat Natriumiodid enthielten (Abbildung 87).

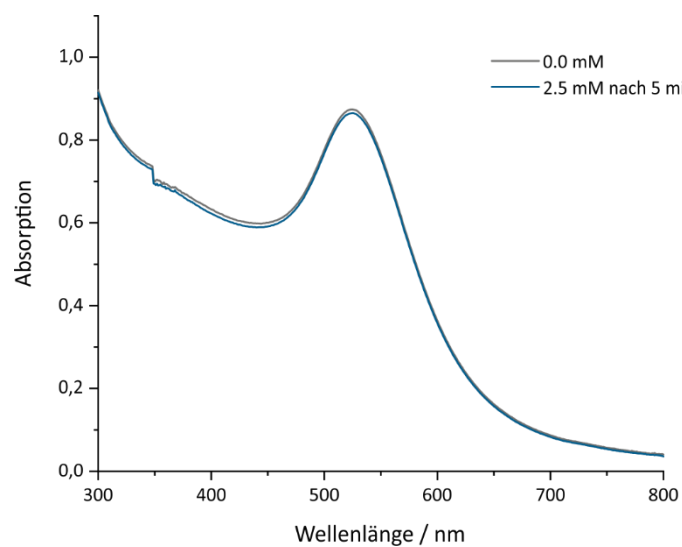


Abbildung 87: UV/VIS-Spektren des Goldnanopartikels $\text{AuNP}_{\text{TEG-AlaCP}}$ (0.25 mg/mL) in Wasser ohne Anion und mit einer Natriumiodidkonzentration von 2.5 mM nach 5 min

Dieses Salz wurde ausgewählt, da Iodid normalerweise ebenfalls effizient mit dem in **AuNP**_{TEG-AlaCP} enthaltenen Cyclopeptid wechselwirkt. In diesem Fall wird jedoch keine Intensitätsabnahme der SPR-Bande beobachtet.

3.3.3.4 TEM-Messungen

Die Effekte der Sulfatzugabe auf das Löslichkeitsverhalten von **AuNP**_{TEG-AlaCP} wurden zusätzlich mittels TEM untersucht. Dazu wurde eine wässrige Lösung von **AuNP**_{TEG-AlaCP} mit Natriumsulfat versetzt und TEM-Messungen 5 und 30 min nach Salzzugabe durchgeführt. Die erhaltenen TEM-Bilder wurden mit der Aufnahme der reinen Goldnanopartikellösung ohne Salz, in denen die einzelnen Nanopartikel gleichmäßig dispergiert vorlagen, verglichen. Die Salzzugabe führte demnach bereits nach 5 min zur Bildung einzelner größerer Aggregate, welche circa 20 bis 70 Nanopartikel enthalten, während weiterhin auch einzelne Nanopartikel zu beobachten sind. In der erhaltenen TEM-Aufnahme 30 min nach Sulfatzugabe wird ein mehr oder weniger durchgängiges Netzwerk von Nanopartikeln beobachtet und nur sehr wenige Nanopartikel sind nicht in die Wechselwirkung mit anderen Partikeln involviert (Abbildung 88).

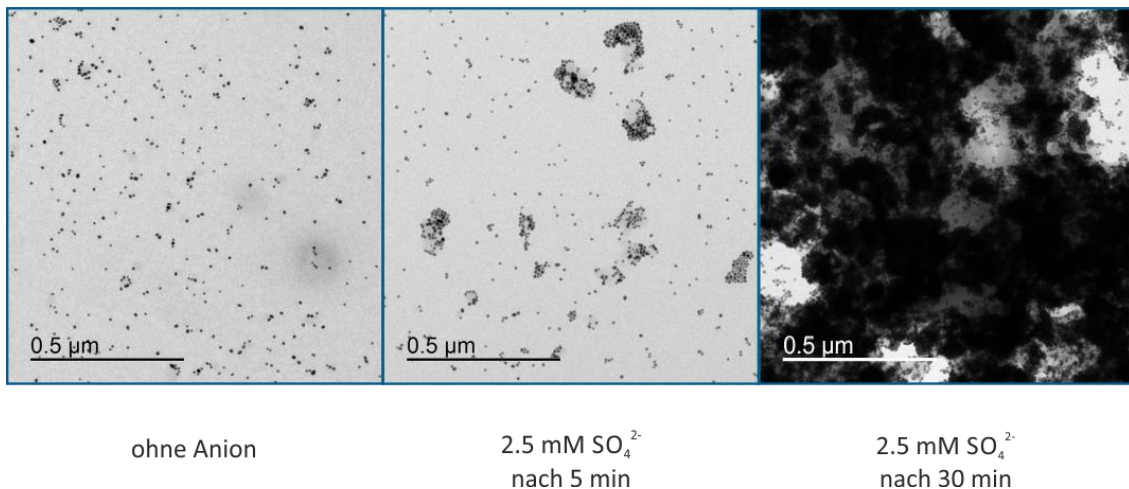


Abbildung 88: TEM-Aufnahmen der Goldnanopartikel **AuNP**_{TEG-AlaCP} (0.25 mg/mL) in Wasser ohne Salz und mit einer Natriumsulfatkonzentration von 2.5 mM nach 5 min und 30 min

3.3.3.5 Diskussion der Goldnanopartikel Untersuchungen zur Anionen-erkennung

In den qualitativen Bindungsstudien reagierte **AuNP**_{TEG-AlaCP} lediglich auf Natriumsulfat, wobei eine Konzentration des Salzes von mindestens 2.5 mM nötig war, um eine optische Veränderung der Probe zu erreichen. Diese äußerte sich zunächst in der Trübung der Probenlösung und führte nachfolgend zu einer teilweisen Entfärbung der Lösung einhergehend mit der Bildung eines Niederschlags (vgl. Abbildung 82). Keines der acht weiteren getesteten Anionen hatte einen Einfluss auf die Nanopartikellösungen, auch nicht nach 18 h. Weiterhin wurde ebenso keinerlei Effekt der Natriumsulfatzugabe auf Lösungen des Goldnanopartikels **AuNP**_{TEG-AlaBA} beobachtet (vgl. Abbildung 83), wodurch belegt werden konnte, dass die Anionen-induzierte Nanopartikelaggregation nur in Anwesenheit Oberflächen-gebundener Cyclopeptideinheiten stattfindet. Mit Sulfat wird überaus selektiv ein Anion nachgewiesen, von dem bekannt ist, dass es mit dem betreffenden Cyclopeptid in wässrigen Lösungsmittelgemischen stabile Sandwichkomplexe bildet.^[30,57,118] Typischerweise wird unter analogen Bedingungen auch Iodid stark gebunden und ein wasserlösliches BCP bindet in reinem Wasser Iodid sogar stärker als Sulfat. Für **AuNP**_{TEG-AlaCP} wurde hingegen keinerlei Farbveränderung der Lösung in Gegenwart von Natriumiodid beobachtet. Dieses Ergebnis könnte ein Indiz dafür sein, dass in unmittelbarer Umgebung der Nanopartikeloberfläche andere Bedingungen vorherrschen als in homogener wässriger Phase. So könnte die Dielektrizitätskonstante aufgrund der hohen lokalen Konzentration der organischen Liganden geringer sein als in Wasser, was einerseits zu einer Verstärkung der Anionenbindung führt, aber bekanntermaßen auch die Sulfat/Iodidselektivität zugunsten von Sulfat verschiebt.^[60]

Das Ergebnis des Konkurrenzexperiments (vgl. Abbildung 84) belegte zudem die hohe Selektivität für Sulfat und deutete damit an, dass ein Nachweis von Sulfat auch in Anwesenheit eines Überschusses konkurrierender Anionen möglich ist, was im Hinblick auf die anwendungsbezogene Nutzung einer solchen Goldnanopartikel-basierten Nachweismethode einen Vorteil darstellt.

Mittels UV/VIS-spektroskopischer Untersuchungen wurde die minimal notwendige Konzentration des Sulfatsalzes, die zu einer ausgeprägten Abnahme der Intensität der SPR-

Bande führt, zu 2.0 mM bestimmt. Damit liegt die Sensitivität der Nachweisreaktion in einem Bereich, der für die Wasseranalytik sinnvoll erscheint, da es sich bei Sulfat um ein ubiquitär vorkommendes, nicht toxisches Anion handelt. So liegt der Grenzwert für Sulfat im Trinkwasser in Deutschland gemäß der aktuellen Trinkwasserverordnung bei 2.6 mM.^[119] Sulfatkonzentrationen, die Probleme bei der Entsorgung beziehungsweise Lagerung radioaktiven Abfalls bereiten, liegen typischerweise noch um mindestens eine Größenordnung höher.^[120]

Durch die UV/VIS-Messungen von Lösungen des Nanopartikels **AuNP**_{TEG-AlaCP} mit variierenden Sulfatmengen und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Salzzugabe konnten darüber hinaus weitere wichtige Informationen gewonnen werden. So wird aus einem Vergleich des Absorptionsmaximums der SPR-Bande der Probe mit 2.5 mM Sulfat nach 30 min und der Probe mit 5.0 mM Sulfat nach 5 min, dass in beiden Fällen knapp unter 0.6 liegt (vgl. Abbildung 85 und Abbildung 86), deutlich, dass die Erhöhung der Sulfatkonzentration hauptsächlich die Geschwindigkeit der Bildung des Niederschlags beeinflusst, nicht aber das Ausmaß. Demnach besteht kein linearer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des gebildeten Niederschlags und der Sulfatkonzentration. Vielmehr kommt es zu einem eher abrupten Übergang zwischen dispergierten und aggregierten Nanopartikeln, sobald eine bestimmte Sulfatkonzentration in der Probenlösung vorliegt, der vermutlich auf die Multivalenz^[121] der Nanopartikel zurückgeführt werden kann einhergehend mit der damit verbundenen positiven, Kooperativität^[122] der Wechselwirkungen. Des Weiteren führte die Zugabe von Natriumsulfat fast ausschließlich zu einer Abnahme der Intensität der SPR-Bande und lediglich zu einer nahezu vernachlässigbaren Rotverschiebung des Maximums um 5 nm (vgl. Abbildung 85). Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass keine kleineren löslichen Aggregate gebildet werden, was sich in einer starken Rotverschiebung der SPR-Bande und einer blauen Farbe der Nanopartikellösung äußern würde, sondern dass sehr große Aggregate gebildet werden, welche vollständig aus der Lösung ausfallen. Diese Annahme wird durch die TEM-Aufnahmen gestützt, die deutlich zeigen, dass nach Abschluss der Aggregation ein nahezu durchgehendes Netzwerk aggregierter Nanopartikel vorliegt (vgl. Abbildung 88). Möglicherweise kann das Ausfallen der Goldnanopartikel dabei auf den recht hohen Cyclopeptidanteil auf der Goldnanopartikeloberfläche zurückgeführt werden, wodurch ein sehr hoher Vernetzungsgrad möglich ist. Sessler *et al.* wiederum führten die Anionen-

induzierte Bildung unlöslicher Aggregate auf eine veränderte Oberflächenpolarität zurück, wobei die Gegenionen im System einen maßgeblichen Einfluss auf die Vernetzung hatten.^[105]

So können Faktoren wie eine veränderte Gesamtpolarität des Systems oder auch ein Einfluss der Gegenionen auf die Aggregatbildung nicht ausgeschlossen werden.

Die Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit Anionenrezeptoren, die mit ihren Substraten Sandwich-artige 2:1 Komplexe bilden, erweist sich also als vielversprechende Strategie zur Entwicklung optischer Sonden. Bei Verwendung von Cyclopeptiden als Rezeptoreinheit wurde schließlich eine Sonde erhalten, die den sehr selektiven Nachweis von Sulfat erlaubt. Hinsichtlich ihrer Sensitivität liegt diese Sonde für Sulfat in einem sinnvollen Bereich, möchte man das Konzept jedoch auf andere Substrate übertragen, die möglicherweise niedrigere Nachweisgrenzen erfordern, sollte man versuchen diese durch die strukturelle Variation der Oberflächen-gebundenen Liganden oder die Variation der Ligandenverhältnisse zu erreichen.

3.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen von Projekt B wurden Cyclopeptid-funktionalisierte Goldnanopartikel dargestellt und untersucht, ob diese sich zum optischen Nachweis von Anionen in Wasser eignen.

In diesem Zusammenhang wurde der Goldnanopartikel **AuNP_{TEG_AlaCP}** (Abbildung 89) synthetisiert mit dessen Hilfe Sulfatanionen in Wasser sehr selektiv visuell nachgewiesen werden können.

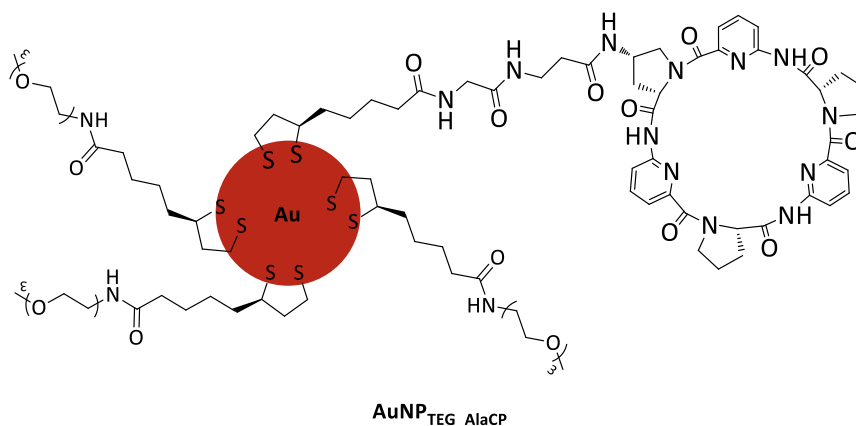


Abbildung 89: Im Rahmen der Promotion dargestellter Goldnanopartikel **AuNP_{TEG_AlaCP}**

AuNP_{TEG_AlaCP} wurde ausgehend von Citrat-geschützten Goldnanopartikeln in einem zweistufigen Verfahren erhalten, bei dem auf dem Goldnanopartikel zunächst eine Mischung eines Liganden mit Triethylenglycolresten und eines Liganden mit einer endständigen Carbonsäuregruppe immobilisiert wurde. Die endständige Carbonsäurefunktionalität wurde anschließend mit einem Cyclopeptidderivat mit einer Aminogruppe gekuppelt. Dieser Ansatz wurde gewählt, da eine gleichzeitige Immobilisierung eines Triethylenglycol- und eines Cyclopeptid-haltigen Liganden in einem Schritt nicht gelang.

Die so erhaltenen Goldnanopartikel waren homogen und in Wasser löslich, aggregierten aber, sobald der Lösung Natriumsulfat zugesetzt wurde. Sie erlaubten entsprechend den Sulfatnachweis mit bloßem Auge, da die Nanopartikelaggregation zu einer Entfärbung der ursprünglich roten Lösung und der Bildung eines Niederschlags führte. Keines von acht

weiteren getesteten Anionen hatte einen analogen Effekt, sodass sich der Nachweis von Sulfat als überaus selektiv erwies.

Im Rahmen des Projekts wurde also ein vielversprechendes Konzept für die Entwicklung optischer Sonden für Anionen entwickelt, das möglicherweise auf den Nachweis anderer Anionen übertragen werden kann. Die hohe Sulfatselektivität von der im Rahmen der Promotion dargestellten Goldnanopartikel **AuNP_{TEG_AlaCP}** ist eine Konsequenz aus der Fähigkeit der Oberflächen-gebundenen Cyclopeptideinheiten, mit Anionen Sandwich-artige 2:1 Komplexe zu bilden und so die Vernetzung der Goldnanopartikel zu induzieren. Zukünftige Arbeiten könnten sich daher mit der Immobilisierung anderer Anionenrezeptoren beschäftigen, die mit Substraten jedoch strukturell analoge Komplexe bilden. Damit sollten potenziell ähnliche optische Sonden zugänglich sein, die jedoch eine andere Anionenselektivität besitzen. Zusätzlich könnte evaluiert werden, ob durch eine Variation des Ligandenverhältnisses auf der Nanopartikeloberfläche, Einfluss auf die Sensitivität dieser Sonden genommen werden kann.

4 Experimentaltteil

4.1 Vorbemerkungen zu verwendeten Chemikalien sowie apparativen und analytischen Methoden

Die Ausgangsverbindungen sowie alle verwendeten Reagenzien waren kommerziell erhältlich (Acros, Aldrich, BASF, Brenntag, Carbolution, Eurisotop, J.T. Baker, Merck, Roth, Sigma Aldrich, Wacker) und wurden ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt. Trockene Lösungsmittel wurden nach gängigen Methoden erhalten.

CHNS-Elementaranalysen

Zur Messung der CHNS-Analysen wurde ein Elementaranalysator vario MICRO cube der Firma Elementar Analysensysteme GmbH verwendet.

Drehwert

Drehwerte wurden mit dem Gerät JASCO P-2000 Polarimeter von Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland bestimmt und mithilfe des Programms Polarimeter SpectraManager ausgewertet.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Reaktionskontrolle wurden Kieselgel-Aluminiumfolien 60 mit Fluoreszenzindikator F₂₅₄ und Glasplatten mit reversed-phase-Material RP-8 mit Fluoreszenzindikator F₂₅₄ von der Firma Merck verwendet.

GC-HRMS (EI⁺)

Die gaschromatographische Auftrennung erfolgte mit Hilfe einer DB5-MS Säule an dem Gerät 7890A von Agilent. Das verwendete Massenspektrometer ist das GCT Premier Micromass MS Technologies von Waters.

ESI-MS

Die Spektren wurden mit einem Esquire 3000 Plus oder Esquire 6000 der Firma Bruker Daltonics mit dem Programm Esquire Control aufgenommen. Zur Auswertung wurde Origin 2019 verwendet.

Größenausschlusschromatographie

Die Gelfiltrationsmedien Sephadex® LH-20 und G 10 der Firma GE Healthcare wurden für Aufreinigungen mittels Größenausschlusschromatographie verwendet.

HPLC (analytisch)

Verwendet wurde eine HPLC-Apparatur der Firma Dionex bestehend aus: ASI-100 Automated Sample Injector, P680 HPLC Pump, Thermostatted Column Compartment TCC-100, UVD170U; wobei folgende Säulen zum Einsatz kamen:

- Supelco™ Ascentis® C18, 25 cm × 4.6 mm, 5 µm
- Thermo Scientific™ BetaBasic™ 18, 25 cm × 4.6 mm, 5 µm
- Macherey-Nagel™ NUCLEODUR® HILIC, 25 cm × 4.6 mm, 5 µm

Zur Auswertung der Chromatogramme wurde das Programm Chromeleon Version 6.7 verwendet.

HPLC (semi-präparativ)

Verwendet wurde eine HPLC-Apparatur der Firma Dionex bestehend aus: Pumpe, Auto Sampler, Variable Wavelength Detector und Fraction Collector der Ultimate 300 Serie, wobei folgende Säulen zum Einsatz kamen:

- Thermo Scientific™ BetaBasic™ 18 C18, 25 cm x 21 mm, 5 µm
- Macherey-Nagel NUCLEODUR® HILIC, 25 cm × 21 mm, 5 µm

Experimentalteil

Zur Auswertung der Chromatogramme wurde das Programm Chromeleon Version 6.7 verwendet. Die verwendeten Gradienten und Lösungsmittel sind an entsprechender Stelle angegeben.

IR (ATR)

Die IR-Spektren wurden an dem Gerät Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR-Spektrometer mit der Universal ATR Sampling Accessory Einheit gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Spectrum v6.3.5 bzw. Origin 2019.

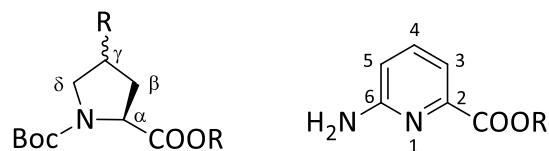
Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Bindungsstudien wurden mit dem Gerät MicroCal VP-ITC durchgeführt. Die erhaltenen Roh-Thermogramme wurden mit NITPIC^[123] bearbeitet und mit Sedphat^[124,125] ausgewertet.

Kernresonanzspektren (¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹⁹F-NMR)

Die NMR-Spektren wurden an den FT-NMR-Geräten AVANCE™ III 400 und 600 der Firma Bruker bei 22 °C bzw. 100 °C aufgenommen. Die Multiplizität der Signale wird wie folgt angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, br = breites Signal. Als interne Standards wurden die Resonanzsignale der Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel verwendet (CDCl₃: $\delta_{\text{H}} = 7.26$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 77.16$ ppm, CD₃CN, $\delta_{\text{H}} = 1.94$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 1.32$ ppm DMSO-d₆: $\delta_{\text{H}} = 2.50$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39.52$ ppm, MeOD-d₄: $\delta_{\text{H}} = 3.31$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 49.00$ ppm). Für ¹⁹F-NMR-Spektren wurde Trifluoressigsäure mit $\delta^{\text{F}} = -76.55$ ppm als externer Standard verwendet.

Signalzuordnung: Den Zuordnungen in den Synthesevorschriften liegt folgende Nomenklatur zu Grunde.



MS-Spektren (MALDI/TOF)

Die Massenspektren wurden mit dem Gerät Bruker Daltonics Ultraflex aufgenommen und mit dem Programm Bruker Daltonics flex Analysis ausgewertet. Als Matrix diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Aufreinigungen wurden mit Kieselgel 60 von Merck (nass gepackt) bzw. RP-Säulen mit dem Säulenmaterial POLYGOPREP 60-50 C8 (40–63 µm) der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät Müller-SPM-X-300 bestimmt.

TEM

Die Proben wurden auf Kohlelochfilmen (Plano S147-4) durch Aufbringen der Nanopartikellösung und Trocknen an Luft präpariert. Anschließend wurden Hellfeldaufnahmen an einem JEOL JEM-2100 LaB6 Transmissionselektronenmikroskop ausgestattet mit einer Gatan Orius SC1000 CCD Kamera aufgenommen (Belichtungszeit 0.5 s). Die Aufnahmen haben eine Größe von 1024x1024 Pixeln. Die Auswertung der TEM-Aufnahmen hinsichtlich der Größenverteilung der Goldnanopartikel erfolgte mit *ImageJ*.^[126]

Experimentaltteil

Ultrafiltration

Zur Behandlung von Goldnanopartikelproben kamen Zentrifugaleinheiten Vivaspin® 15R (MWCO 5000 Da) von Sartorius zum Einsatz.

UV/Vis

Absorptionsspektren wurden mit dem Gerät Cary 100 von Varian aufgenommen und mit dem Programm Scan ausgewertet.

Zentrifugation

Für Zentrifugationen wurde das Gerät Centrifuge 5702 R von Eppendorf verwendet.

4.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

4.2.1 Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

Das Boc-geschützte Substrat wurde in trockenem 1,4-Dioxan (5 ml/mmol) gelöst oder suspendiert, die erhaltene Mischung auf 0 °C abgekühlt und mit einer 6 N Lösung aus HCl in trockenem 1,4-Dioxan (10 ml/mmol) versetzt. Nach Erwärmen auf 25 °C wurde die Reaktionsmischung noch 2 h gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Diethylether (10 ml/mmol) suspendiert, 1 h bei 25 °C gerührt und abfiltriert. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

4.2.2 Abspalten von Estern durch Verseifung

Der Ester wurde in 1,4-Dioxan (20 ml/mmol) gelöst, mit Wasser (20 ml/mmol) und 1 M Natronlauge (5 ml/mmol) versetzt und die resultierende Reaktionsmischung 2 h bei 25 °C gerührt. Das 1,4-Dioxan wurde unter vermindertem Druck entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit gesättigter Kaliumhydrogensulfatlösung auf pH = 2 eingestellt. Anschließend wurde dreimal mit Chloroform *p.a.* extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

4.2.3 Abspalten der Benzyl-Schutzgruppe

Das Benzyl-geschützte Substrat wurde in Methanol (40 ml/mmol) gelöst und mit einer Suspension von Pd/C (10 Gew.-%) in wenig Dichlormethan versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 – 18 h (DC-Kontrolle) unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck und 25 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde der Katalysator über Celite® abfiltriert, der Filterkuchen mit reichlich Methanol gewaschen und das Filtrat unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Nach dem Trocknen im Ölpumpenvakuum wurde der Rückstand ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt.

4.2.4 Abspalten der Cbz-Schutzgruppe

Das Cbz-geschützte Substrat wurde in Methanol (40 ml/mmol) gelöst, mit einer Suspension von Pd/C (10 Gew.-%) und Pd(OH)₂/C (20 Gew.-%) in wenig Dichlormethan und mit 1 Äquivalent 1 N Salzsäure pro frei werdender Aminogruppe versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 – 4 d Tage (DC-Kontrolle) unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck und 25 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde der Katalysator über Celite® abfiltriert, der Filterkuchen mit reichlich Methanol gewaschen und das Filtrat unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Nach dem Trocknen im Ölpumpenvakuum wurde der Rückstand ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt.

4.2.5 Abspalten der Allyl-Schutzgruppe

Der Allylester wurde unter einer Stickstoffatmosphäre in zuvor entgastem Tetrahydrofuran (20 ml/mmol) gelöst. Die Lösung wurde mit Pd(PPh₃)₄ (eine Spatelspitze) und Morpholin (3 Äq.) versetzt und 30 min bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (60 ml/mmol) gelöst. Die organische Phase wurde dreimal mit 3 %iger Kaliumhydrogensulfatlösung und zweimal mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet.

4.2.6 Allgemeine Vorgehensweise zur Cyclisierung

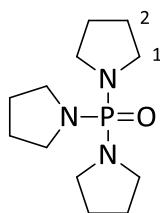
Die verwendete Apparatur wurde vor Beginn der Reaktion mehrmals sekuriert. Alle weiteren Reaktionsschritte wurden unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt.

Das lineare, beidseitig entschützte Hexapeptid (1 Äq.) und DIPEA (8 Äq.) wurden in DMF *p.a.* (40 mL/mmol) gelöst und innerhalb von 6 h bei 80 °C zu einer Lösung aus TBTU (5 Äq.) und DIPEA (13 Äq.) in DMF *p.a.* (200 mL/mmol) getropft. Es wurde eine weitere Stunde bei 80 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt, wobei die Details zur chromatographischen Aufreinigung den Beschreibungen der einzelnen Cyclopeptidsynthesen zu entnehmen sind.

4.3 Synthese des Kupplungsreagenzes PyCloP

4.3.1 Tripyrrolidinophosphinoxid^[127]

Pyrrrolidin (50.2 mL, 600 mmol, 3 Äq.) und Triethylamin (85.0 mL, 600 mmol, 1 Äq.) wurden in trockenem Toluol (200 mL) gelöst und die Lösung auf -5 °C abgekühlt. Eine Lösung aus Phosphorylchlorid (18.3 mL, 200 mmol, 3 Äq.) in trockenem Toluol (200 mL) wurde so zugetropft, dass eine Temperatur der Reaktionsmischung von 5 °C nicht überschritten wurde. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 2 h bei 0 °C gerührt und weitere 5 h zum Rückfluss erhitzt. Die Suspension wurde über Kieselgel abfiltriert, der Rückstand mit Ethylacetat *p.a.* (500 mL) gewaschen und das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde über eine kurze Vigreux-Kolonne destilliert (125 °C, 1·10⁻³ mbar).



Ausbeute: 39.0 g (152 mmol, 76 %) gelbliche Flüssigkeit.

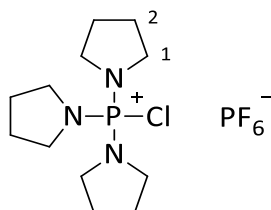
¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ =1.76 – 1.81 (m, 12 H, H-2), 3.11 – 3.16 (m, 12 H, H-1) ppm.

4.3.2 PyCloP^[128]

Phosphorylchlorid (13.8 mL, 152 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem Dichlormethan (25 mL) gelöst und zu dieser Lösung bei 25 °C eine Lösung von Tripyrrolidinophosphinoxid (39.0 g, 152 mmol, 1 Äq.) in trockenem Dichlormethan (25 mL) getropft. Nach 30 min Rühren bei 25 °C wurde die Reaktionsmischung unter Rühren zu einer Lösung aus Kaliumhexafluorophosphat (27.6 g, 152 mmol, 1 Äq.) in Wasser (350 mL) gegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan *p.a.* (3 × 120 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (3 × 60 mL) gewaschen, über MgSO₄

Experimentalteil

getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Ethylacetat *p.a.* (400 mL) umkristallisiert, abfiltriert und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.



Ausbeute: 51.6 g (122 mmol, 80 %) farbloser, kristalliner Feststoff.

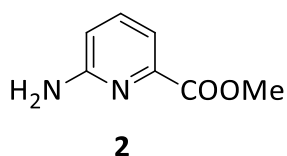
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 2.02 - 2.06$ (m, 12 H, *H-2*), 3.34 – 3.38 (m, 12 H, *H-1*) ppm.

4.4 Synthesen zu Projekt A

4.4.1 Darstellung der Grundbausteine

6-Aminopicolinsäuremethylester (**2**)^[49]

6-Aminopicolinsäure **1** (5.40 g, 39.1 mmol, 1 Äq.) wurde in Methanol *p.a.* (55 mL) suspendiert und die Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure (5.50 mL) versetzt. Die Suspension wurde für 72 h unter Rückfluss erhitzt, wobei sich das Edukt vollständig löste. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde die Reaktionsmischung mit gekühlter, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (300 mL) neutralisiert, die wässrige Phase mit Dichlormethan (3 × 200 mL) extrahiert und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.



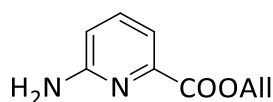
Experimentaltteil

Ausbeute: 4.82 g (31.7 mmol, 81 %) farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 3.94 (s, 3 H, Me-H), 4.80 (br , 2 H, NH), 6.67 (d, 1 H, 3J = 8.0 Hz, APA-H(5)), 7.46 – 7.55 (m, 2 H, APA-H(3) + APA-H(4)) ppm.

6-Aminopicolinsäureallylester (3)^[29]

6-Aminopicolinsäure **1** (8.32 g, 60.2 mmol, 1 Äq.) und Natriumhydrogencarbonat (10.1 g, 120 mmol, 2 Äq.) wurden in DMF p.a. (360 mL) suspendiert und mit 3-Brom-1-propen (15.6 mL, 180 mmol, 3 Äq.) versetzt. Die Suspension wurde für 7 d bei 25 °C gerührt, währenddessen sich das Edukt vollständig löste. Anschließend wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand in Ethylacetat (150 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde mit 10%iger Natriumcarbonatlösung (3 × 50 mL) sowie Wasser (3 × 50 mL) gewaschen, die organische Phase über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v)] aufgereinigt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.



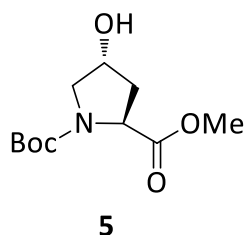
3

Ausbeute: 5.40 g (30.3 mmol, 50 %) farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 4.85 – 4.87 (m , 2 H, All- CH_2), 5.08 (br s, 2 H, NH_2), 5.28 – 5.30 (m, 1 H, All- H_{cis}), 5.39 – 5.42 (m, 1 H, All- H_{trans}), 6.01 – 6.08 (m, 1 H, All- H_{vic}), 6.72 (d, 1 H, 3J = 8.0 Hz, APA-H(3)), 7.47 (d, 1 H, 3J = 8.0 Hz, APA-H(5)), 7.54 (t, 1 H, 3J = 8.0 Hz, APA-H(4)) ppm.

Boc-(L-Hydroxyprolin)-methylester (5)^[50]

L-Hydroxyprolinmethylesterhydrochlorid **4** (9.12 g, 50.0 mmol, 1 Äq.) wurde in einem 1,4-Dioxan/Wasser-Gemisch (2/1 (v/v), 150 mL) suspendiert und bei 0 °C mit Di-*tert*-butyl-dicarbonat (12.0 g, 55.0 mmol, 1.1 Äq.) und Triethylamin (10.4 mL, 75.0 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Nach 2 h Rühren bei 25 °C wurde das 1,4-Dioxan unter vermindertem Druck entfernt. Der verbleibende, wässrige Rückstand wurde mit Ethylacetat (100 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend mit Wasser (50 mL) gewaschen und die wässrige Phase erneut mit Ethylacetat (2 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit 0.5 M Salzsäure (50 mL), Wasser (50 mL), 10 %iger Natriumcarbonatlösung (50 mL), Wasser (50 mL) und gesättigter Natriumchloridlösung (50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.



Ausbeute: 11.8 g (48.3 mmol, 97 %) farbloser Feststoff.

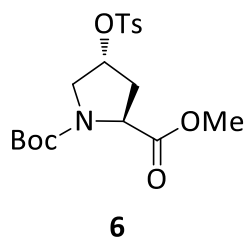
¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 1.40 + 1.45 (2 s, 9 H, Boc-*H*), 2.03 – 2.09 (m, 1 H, Pro-C_β-*H*), 2.23 – 2.32 (m, 2 H, Pro-C_β-*H* + -OH), 3.43 – 3.64 (m, 2 H, Pro-C_δ-*H*), 3.72 (s, 3 H, -O-CH₃), 4.37 – 4.49 (m, 2 H, Pro-C_α-*H* + Pro-C_γ-*H*) ppm.

Boc-((4*R*)-4-Tosyloxy-L-prolin)-methylester (6)^[51]

Verbindung **5** (11.8 g, 48.3 mmol, 1 Äq.) wurde in Pyridin (47.0 mL, 580 mmol, 12 Äq.) und Dichlormethan *p.a.* (50 mL) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (36.8 g, 193 mmol, 4 Äq.) versetzt und 48 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in

Experimentaltteil

Ethylacetat 100 mL) aufgenommen und die so erhaltene Lösung nacheinander mit 10 %iger Natriumcarbonatlösung (3 × 50 mL) und Wasser (3 × 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch [SiO₂, Ethylacetat/Hexan, 1:2 (v/v)] aufgereinigt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

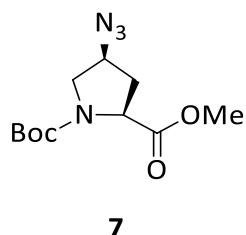


Ausbeute: 17.5 g (43.8 mmol, 91 %) farbloser Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 1.39 + 1.42 (2 s, 9 H, Boc-H), 2.04 – 2.19 (m, 1 H, Pro-C _{β} -H), 2.38 – 2.56 (m, 1 H, Pro-C _{β} -H), 2.46 (s, 3 H, Tos-OMe-H), 3.52 – 3.62 (m, 2 H, Pro-C _{δ} -H), 3.72 (s, 3 H, -O-CH₃), 4.33 – 4.41 (m, 1 H, Pro-C _{γ} -H), 5.01 – 5.06 (m, 1 H, Pro-C _{α} -H), 7.36 (d, 2 H, ³J = 8.1 Hz, Tos-C(3)-+C(5)-H), 7.78 (d, 2 H, ³J = 8.2 Hz, Tos-C(2)-+C(6)-H) ppm.

Boc-((4S)-4-Azido-L-prolin)-methylester (7)^[51]

Verbindung **6** (17.5 g, 43.8 mmol, 1 Äq.) wurde in DMF *p.a.* (120 mL) gelöst, mit Natriumazid (5.69 g, 87.6 mmol, 2 Äq.) versetzt und die Reaktionsmischung für 3.5 h in einem auf 90 °C temperierten Ölbad erhitzt. Nach Abkühlen auf 25 °C wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum einkondensiert, der Rückstand in Wasser (100 mL) aufgenommen und mit Ethylacetat (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit Wasser (50 mL), 10 %iger Natriumcarbonatlösung (50 mL) sowie gesättigter Natriumchloridlösung (50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.



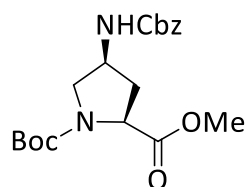
Ausbeute: 11.6 g (42.9 mmol, 98 %) gelbliches Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 1.41 + 1.47 (2 s, 9 H, Boc-*H*), 2.14 – 2.19 (m, 1 H, Pro- C_β -*H*), 2.42 – 2.50 (m, 1 H, Pro- C_β -*H*), 3.43 – 3.51 (m, 1 H, Pro- C_δ -*H*), 3.66 – 3.77 (m, 1 H, Pro- C_δ -*H*), 3.75 (s, 3 H, -O- CH_3), 4.12 – 4.16 (m, 1 H, Pro- C_γ -*H*), 4.30 – 4.44 (m, 1 H, Pro- C_α -*H*) ppm.

Boc-((4S)-Cbz-4-Amino-L-prolin)-methylester (8)^[51]

Verbindung **7** (7.00 g, 25.9 mmol, 1 Äq.) wurde in Methanol *p.a.* (150 mL) gelöst und mit in wenig Wasser suspendiertem 10 %iger Pd/C-Katalysator (500 mg) sowie 1 M Salzsäure (28.5 mL, 28.5 mmol, 1.1 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck für 7 d gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite® abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in trockenem Dichlormethan (200 mL) gelöst und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde sie in der Kälte mit DIPEA (6.70 mL, 39.4 mmol, 1.5 Äq.) und Benzylchlorformiat (7.50 mL, 52.8 mmol, 2 Äq.) versetzt und bei 25 °C für 48 h gerührt. Das Gemisch wurde mit 3 %iger Kaliumhydrogensulfatlösung (2 × 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat/Hexan, 1:2 (v/v)] aufgereinigt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Experimentalteil



8

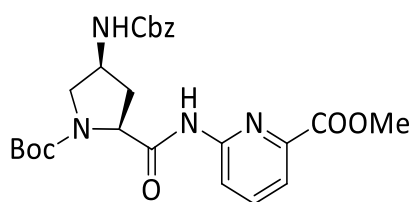
Ausbeute: 7.46 g (19.7 mmol, 76 %) gelbes Harz.

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 1.40 + 1.45 (2 s, 9 H, Boc-*H*), 1.92 – 1.99 (m, 1 H, Pro-C _{β} -*H*), 2.40 – 2.52 (m, 1 H, Pro-C _{β} -*H*), 3.44 – 3.66 (m, 2 H, Pro-C _{δ} -*H*), 3.73 + 3.75 (2 s, 3 H, O-CH₃), 4.23 – 4.39 (m, 2 H, Pro-C _{γ} -*H* + Pro-C _{α} -*H*), 5.09 (s, 2 H, CH₂-Ph), 5.75 – 5.85 (m, 1 H, NH), 7.30 – 7.37 (m, 5 H, Ph-*H*) ppm.

4.4.2 Darstellung der linearen Peptide

Dipeptid Boc-(((4S)-Cbz-Apro)-APA)-OMe (10)

Verbindung **8** (3.15 g, 8.78 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Spaltung von Estern am C-Terminus entschützt und das erhaltene Produkt zusammen mit Aminopicolinsäuremethylester **2** (1.41 g, 9.27 mmol, 1.1 Äq.) und PyCloP (3.91 g, 9.27 mmol, 1.1 Äq.) in Dichlormethan *p.a.* (135 mL) gelöst. Nach Zusatz von DIPEA (6.04 mL, 35.5 mmol, 4 Äq.) wurde die Reaktionsmischung 6 d bei 25 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO₂, Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v)] aufgereinigt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.



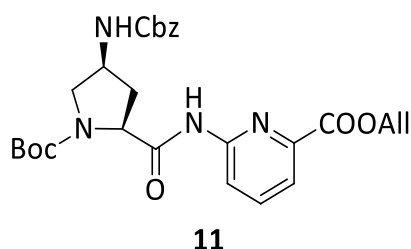
10

Ausbeute: 3.40 g (6.32 mmol, 82 %) farbloser Feststoff.

¹H-NMR (600 MHz, 100 °C, DMSO-d₆): δ = 1.36 (s, 9 H, Boc-H), 1.92 – 1.96 (m, 1H, Pro-C_β-H), 2.51 – 2.59 (m, 1 H, Pro-C_β-H), 3.27 (dd, 1 H, ²J = 10.6 Hz, ³J = 6.6 Hz, Pro-C_γ-H), 3.73 (dd, 1 H, ²J = 10.6 Hz, ³J = 7.0 Hz, Pro-C_δ-H), 3.90 (s, 3 H, Me-H), 4.06 – 4.15 (m, 1 H, Pro-C_δ-H), 4.51 (dd, 1 H, ³J = 8.6 Hz, ³J = 6.4 Hz, Pro-C_α-H), 5.03 – 5.07 (m, 2 H, ZCH₂), 6.95 (s, 1 H, ZNH), 7.27-7.35 (m, 5 H, ZPhH), 7.75 (d, 1 H, ³J = 7.3 Hz, APA-H(3)), 7.95 (t, 1 H, ³J = 8.1 Hz, APA-H(4)), 8.25 (d, 1 H, ³J = 8.1 Hz, APA-H(5)), 10.40 (s, 1 H, NH) ppm.

Dipeptid Boc-[((4S)-Cbz-Apro)-APA]-OAll (11)^[29]

Verbindung **8** (7.18 g, 19.0 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Spaltung von Estern am C-Terminus entschützt und das erhaltene Produkt zusammen mit Aminopicolinsäureallylester **3** (3.92 g, 22.0 mmol, 1.1 Äq.) und PyCloP (10.1 g, 24.0 mmol, 1.2 Äq.) in Dichlormethan *p.a.* (150 mL) gelöst. Nach Zusatz von DIPEA (10.2 mL, 60.0 mmol, 3 Äq.) wurde die Reaktionsmischung 6 d bei 25 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO₂, Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v)] aufgereinigt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.



Ausbeute: 7.55 g (14.4 mmol, 76 %) farbloser Feststoff.

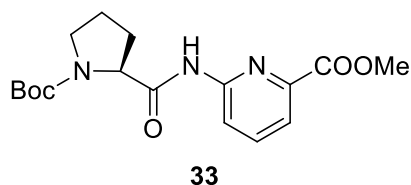
¹H-NMR (600 MHz, 100 °C, DMSO-d₆): δ = 1.36 (s, 9 H, Boc-H), 1.91 – 1.95 (m, 1 H, Apro-C_β-H), 2.54 – 2.58 (m, 1 H, Apro-C_β-H), 3.25 – 3.27 (m, 1 H, Apro-C_γ-H), 3.71 – 3.74 (m, 1 H, Apro-C_δ-H), 4.08 – 4.12 (m, 1 H, Apro-C_δ-H), 4.50 – 4.52 (m, 1 H, Apro-C_α-H), 4.84 – 4.85 (m, 2 H, Z-CH₂), 5.02 – 5.07 (m, 2 H, All-CH₂), 5.29 – 5.31 (m, 1 H, All-H_{cis}), 5.40 – 5.43 (m, 1 H, All-H_{trans}), 6.02 – 6.08 (m, 1 H, All-H_{vic}), 6.98 (s, 1 H, Cbz-NH), 7.28 – 7.35 (m, 5 H, Cbz-Ph-H), 7.77 (d, 1 H, ³J = 7.5 Hz APA-H(3)), 7.96 (t, 1 H, ³J = 7.9 Hz, APA-H(4)), 8.26 (d, 1 H, ³J = 8.3 Hz, APA-H(5)), 10.4 (m, 1 H, APA-NH) ppm.

Dipeptid Boc-[Pro-APA]-OMe (33)

Boc-L-Prolin **32** (2.58 g, 12.0 mmol, 1.5 Äq.), 6-Aminopicolinsäuremethylester **2** (1.22 g, 8.00 mmol, 1 Äq.) und PyCloP (5.06 g, 12.0 mmol, 1.5 Äq.) wurden in Dichlormethan *p.a.* (100 mL) gelöst und mit DIPEA (4.10 mL, 24.0 mmol, 3 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung

Experimentalteil

wurde 6 d bei 25 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat/Hexan, 1:1 (v/v)] aufgereinigt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

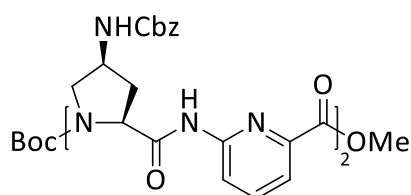


Ausbeute: 2.63 g (7.53 mmol, 94 %) farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 100 °C, DMSO-d_6): δ = 1.36 (s, 9 H, Boc-H), 1.80 – 1.84 (m, 1H, Pro- C_β -H), 1.90 – 1.97 (m, 1H, Pro- C_γ -H), 2.21 – 2.26 (m, 1 H, Pro- C_β -H), 3.38 – 3.47 (m, 1 H, Pro- C_δ -H), 3.90 (s, 3 H, Me-H), 4.06 – 4.15 (m, 1 H, Pro- C_δ -H), 4.48 (dd, 1 H, 2J = 8.2 Hz, 3J = 4.0 Hz, Pro- C_α -H), 7.73 (d, 1 H, 3J = 7.5 Hz, APA-H(3)), 7.95 (t, 1 H, 3J = 8.0 Hz, APA-H(4)), 8.25 (d, 1 H, 3J = 8.6 Hz, APA-H(5)), 10.3 (s, 1 H, NH) ppm.

Tetrapeptid Boc-(((4S)-Cbz-Apro)-APA)₂-OMe (15)

Dipeptid **10** (847 mg, 1.70 mmol, 1 Äq.) wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am N-Terminus und eine äquivalente Menge entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Methyl-Schutzgruppe am C-Terminus entschützt. Die Produkte dieser Entschützungen wurden in *N,N*-Dimethylformamid (50 mL) gelöst und mit TBTU (655 mg, 2.04 mmol, 1.2 Äq.) und DIPEA (1.30 mL, 7.48 mmol, 4.4 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 18 h gerührt und anschließend unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat] aufgereinigt.



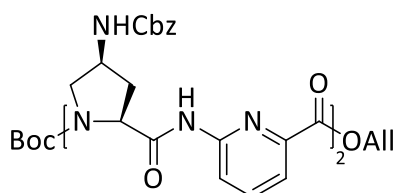
15

Ausbeute: 770 mg (890 μmol , 52 %) farbloser Feststoff.

MS MALDI/TOF (m/z): 865.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (14 %), 887.7 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (100 %), 903.7 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (17 %).

Tetrapeptid Boc-[[*(4S)*-Cbz-Apro]-APA]₂-OAll (16)

Dipeptid **11** (3.15 g, 6.00 mmol, 1 Äq.) wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am N-Terminus und eine äquivalente Menge entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Allyl-Schutzgruppe am C-Terminus entschützt. Die Produkte dieser Entschützungen wurden in *N,N*-Dimethylformamid (120 mL) gelöst und mit TBTU (2.12 g, 6.60 mmol, 1.1 Äq.) und DIPEA (4.00 mL, 24.0 mmol, 4 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 18 h gerührt und anschließend unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO_2 , Ethylacetat] aufgereinigt.



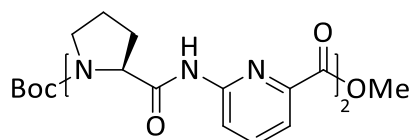
16

Ausbeute: 5.34 g (6.00 mmol, 100 %) gelblicher Feststoff.

MS MALDI/TOF (m/z): 891.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (50 %), 913.7 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (100 %), 929.7 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (30 %).

Tetrapeptid Boc-[Pro-APA]₂-OMe (36)

Boc-Pro-APA-OMe **33** (1.15 g, 3.29 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am N-Terminus und eine äquivalente Menge Boc-Pro-APA-OMe **33** (1.15 g, 3.29 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Spaltung von Estern am C-Terminus entschützt. Die Produkte dieser Umsetzungen wurden zusammen mit PyCloP (1.67 g, 3.95 mmol, 1.2 Äq.) in Dichlormethan *p.a.* (120 mL) gelöst und mit DIPEA (19.0 mL, 14.5 mmol, 4.4 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei 25 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO₂, Ethylacetat/Hexan, 2:1 → 3:1 → 5:1 → Ethylacetat (v/v)] aufgereinigt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.



36

Ausbeute: 1.70 g (3.00 mmol, 91 %) farbloser Feststoff.

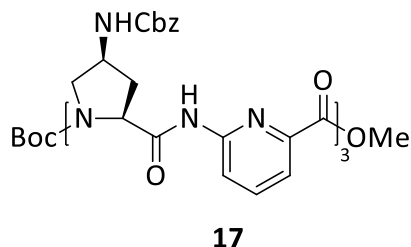
MS MALDI/TOF (*m/z*): 467.3 [M – Boc + H]⁺ (100 %), 567.4 [M + H]⁺ (79 %), 589.4 [M + Na]⁺ (92 %).

Hexapeptid Boc-(((4S)-Cbz-Apro)-APA)₃-OMe (17)

Tetrapeptid **15** (770 mg, 890 µmol, 1 Äq.) wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am N-Terminus und eine äquivalente Menge Dipeptid **10** (444 mg, 890 µmol, 1 Äq.) entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Methyl-Schutzgruppe am C-Terminus entschützt. Die Produkte dieser Entschützungen wurden in *N,N*-Dimethylformamid (30 mL) gelöst und mit TBTU (344 mg, 1.07 mmol, 1.2 Äq.) und DIPEA (605 µL, 3.56 mmol, 4 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 d bei 25 °C gerührt und anschließend unter Rühren in Wasser (100 mL) gegeben. Der pH-Wert der Suspension

Experimentaltteil

wurde mit 1 M HCl auf 4 eingestellt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Das Produkt wurde im Exsikkator über Phosphorpentoxid sowie im Ölpumpenvakuum getrocknet.

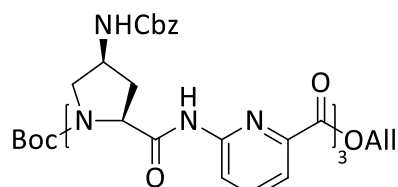


Ausbeute: 679 mg (551 μmol , 62 %) gelblicher Feststoff.

MS MALDI/TOF (m/z): 1131.6 $[\text{M} - \text{Boc} + \text{H}]^+$ (7 %), 1153.6 $[\text{M} - \text{Boc} + \text{Na}]^+$ (15 %), 1231.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (3 %), 1253.8 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (100 %), 1269.8 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (29 %).

Hexapeptid Boc-[[*(4S)*-Cbz-Apro]-APA]₃-OAll (**18**)

Tetrapeptid **16** (5.34 g, 6.00 mmol, 1 Äq.) wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am N-Terminus und eine äquivalente Menge Dipeptid **11** (3.15 g, 6.00 mmol, 1 Äq.) entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Allyl-Schutzgruppe am C-Terminus entschützt. Die Produkte dieser Entschützungen wurden in *N,N*-Dimethylformamid (120 mL) gelöst und mit TBTU (2.12 g, 6.60 mmol, 1.1 Äq.) und DIPEA (4.00 mL, 24.0 mmol, 4 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 d bei 25 °C gerührt und anschließend unter Rühren in Wasser (240 mL) gegeben. Der pH-Wert der Suspension wurde mit 1 M HCl auf 4 eingestellt und der Feststoff abfiltriert. Das Produkt wurde im Exsikkator über Phosphorpentoxid sowie im Ölpumpenvakuum getrocknet.



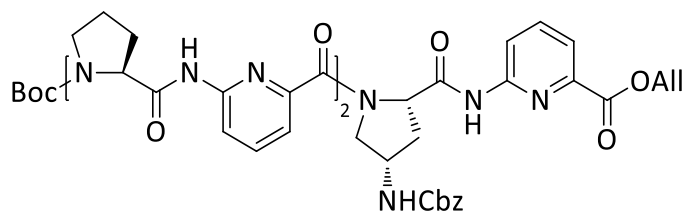
18

Ausbeute: 7.54 g (6.00 mmol, 100 %) gelblicher Feststoff.

MS MALDI/TOF (m/z): 1157.5 $[M - \text{Boc} + \text{H}]^+$ (3 %), 1179.5 $[M - \text{Boc} + \text{Na}]^+$ (4 %), 1197.3 $[M - \text{Boc} + \text{K}]^+$ (9 %), 1257.5 $[M + \text{H}]^+$ (3 %), 1279.4 $[M + \text{Na}]^+$ (100 %), 1295.5 $[M + \text{K}]^+$ (19 %).

Hexapeptid Boc-[(Pro-APA)₂-((4S)-Cbz-Apro-APA)]-OAll (38)

Boc-[[[(4S)-Z-Apro)-APA]-OAll **11** (1.50 g, 2.86 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am N-Terminus entschützt und eine äquivalente Menge Boc-[Pro-APA]₂-OMe **36** (1.62 g, 2.86 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Spaltung von Estern am C-Terminus entschützt. Die Produkte dieser Umsetzungen wurden zusammen mit TBTU (1.11 g, 3.46 mmol, 1.2 Äq.) in DMF *p.a.* (50 mL) gelöst und mit DIPEA (1.95 mL, 11.4 mmol, 4 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 d bei 25 °C gerührt und anschließend unter Rühren in Wasser (280 mL) gegeben. Der pH-Wert der Suspension wurde mit 1 M HCl auf 4 eingestellt und danach der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Das Produkt wurde im Exsikkator über Phosphorpentoxid sowie im Ölpumpenvakuum getrocknet.



38

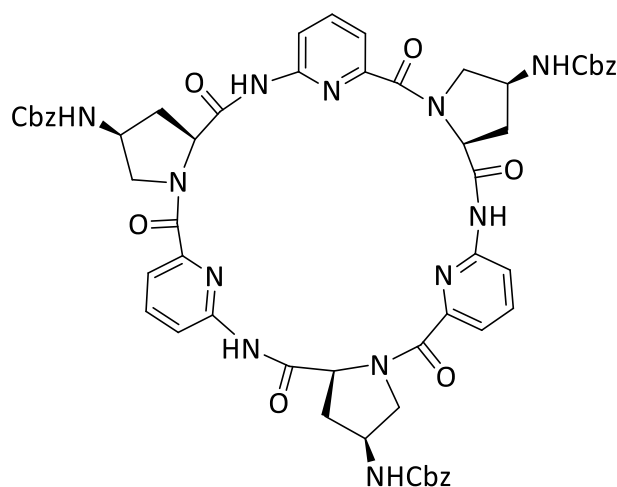
Ausbeute: 2.61 g (2.72 mmol, 95 %) farbloser Feststoff.

MS MALDI/TOF (m/z): 959.5 $[M + H]^+$ (4 %), 981.5 $[M + Na]^+$ (92 %), 997.5 $[M + K]^+$ (21 %).

4.4.3 Synthese der Cyclopeptide

cyclo-[(((4S)-Cbz-Apro)-APA)₃] (20)^[29]

Boc-[(((4S)-Cbz-Apro)-APA)₃-OAll **18** (1.41 g, 1.12 mmol, 1 Äq.) wurde zunächst entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Spaltung von Allylstern am C-Terminus entschützt und anschließend entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am N-Terminus entschützt. Das vollständig entschützte Hexapeptid wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Cyclisierung umgesetzt. Nach der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch $[SiO_2, \text{Aceton}]$ vorgereinigt. Im Anschluss wurde das erhaltene Rohprodukt in wenig Aceton gelöst und auf eine mit Wasser/1,4-Dioxan (10:1 (v/v)) vorkonditionierte RP-8 Säule aufgetragen. Das Lösungsmittelverhältnis wurde langsam (Wasser/1,4-Dioxan, 10:1 \rightarrow 5:1 \rightarrow 2:1 \rightarrow 1:1 \rightarrow 1:2 (v/v)) umgestellt, bis das Produkt eluierte. Die Produktfraktionen wurden eingengt und erneut mit Hilfe einer Kieselgelsäule $[SiO_2, \text{DCM/Aceton}, 10:1 \rightarrow \text{DCM/MeOH}, 20:1 \rightarrow 10:1 \text{ (v/v)}]$ weiter aufgereinigt. Abschließend wurde der Rückstand in Aceton gelöst und durch Eingießen in Diethylether unter Rühren wieder ausgefällt. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

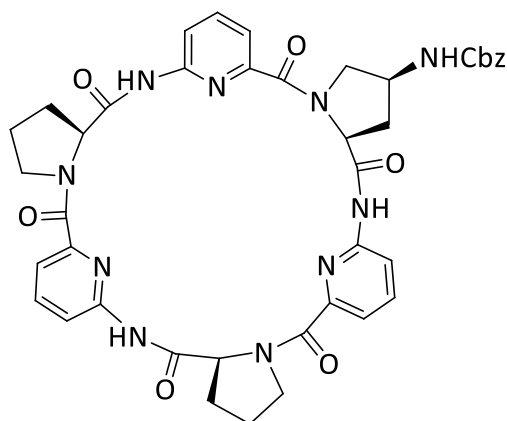


Ausbeute: 763 mg (694 μmol , 62 %) farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD-d_4): δ = 2.07 – 2.17 (m, 3 H, Apro- $\text{C}_\beta\text{-H}$), 2.83 – 2.89 (m, 3 H, Apro- $\text{C}_\beta\text{-H}$), 3.58 – 3.62 (m, 3 H, Apro- $\text{C}_\delta\text{-H}$), 4.02 – 4.07 (m, 3 H, Apro- $\text{C}_\delta\text{-H}$), 4.26 – 4.33 (m, 3 H, Apro- $\text{C}_\gamma\text{-H}$), 4.98 – 5.02 (m, 6 H, Cbz- CH_2), 5.67 – 5.70 (m, 3 H, Apro- $\text{C}_\alpha\text{-H}$), 7.21 – 7.37 (m, 15 H, CbzPh- H), 7.41 (d, 3 H, 3J = 8.1 Hz, APA- $\text{CH}(3)$) 7.54 (d, 3 H, 3J = 7.6 Hz, APA- $\text{CH}(5)$), 7.68 (m, 3 H, 3J = 8.0 Hz, APA- $\text{CH}(4)$) ppm.

cyclo-[(Pro-APA) $_2$ -((4S)-Cbz-Apro-APA)] (40)^[29]

Verbindung **38** (1.16 g, 1.21 mmol, 1 Äq.) wurde zunächst entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Spaltung von Allylestern am C-Terminus und anschließend entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am N-Terminus entschützt. Das vollständig entschützte Hexapeptid wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Cyclisierung umgesetzt. Nach der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch [SiO_2 , Aceton] vorgereinigt. Im Anschluss wurde das erhaltene Rohprodukt in wenig Aceton gelöst und auf eine mit Wasser/1,4-Dioxan (10:1 (v/v)) vorkonditionierte RP-8 Säule aufgetragen. Das Lösungsmittelverhältnis wurde langsam (Wasser/1,4-Dioxan, 10:1 \rightarrow 5:1 \rightarrow 2:1 \rightarrow 1:1 (v/v)) umgestellt, bis das Produkt eluierte. Die Produktfraktionen wurden eingengt, der Rückstand in Aceton gelöst und durch Eingießen in Diethylether unter Rühren wieder ausgefällt. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.



40

Experimentalteil

Ausbeute: 354 mg (442 μmol , 37 %) farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 1.79 – 1.99 (m, 5 H, Pro- $\text{C}_\beta\text{-H}$ + Pro- $\text{C}_\gamma\text{-H}$), 2.00 – 2.08 (m, 2H, Pro- $\text{C}_\beta\text{-H}$ + Apro- $\text{C}_\beta\text{-H}$), 2.52 – 2.58 (m, 2H, Pro- $\text{C}_\beta\text{-H}$), 2.86 – 2.88 (m, 1 H, Apro- $\text{C}_\beta\text{-H}$), 3.50 (m, 1 H unter H_2O -Signal, Apro- $\text{C}_\delta\text{-H}$), 3.55 – 3.60 (m, 2 H, Apro- $\text{C}_\delta\text{-H}$ + Pro- $\text{C}_\delta\text{-H}$), 3.65 – 3.72 (m, 2 H, Pro- $\text{C}_\delta\text{-H}$), 3.87 – 3.92 (m, 1 H, Pro- $\text{C}_\delta\text{-H}$), 4.16 – 4.19 (m, 1 H, Apro- $\text{C}_\gamma\text{-H}$), 5.00 – 5.01 (m, 2 H, ZCH_2), 5.54 – 5.63 (m, 3 H, Apro- $\text{C}_\alpha\text{-H}$ + Pro- $\text{C}_\alpha\text{-H}$), 7.22 (d, 1 H, $^3J = 8.2$ Hz, APAH(3)), 7.26 (d, 2 H, $^3J = 8.3$ Hz, APA- H (3)), 7.35 (b, 5 H, Z-PhH), 7.41 – 7.44 (m, 3 H, APA- H (5)), 7.53 – 7.55 (m, 1 H, ZNH), 7.69 – 7.76 (m, 3 H, APA- H (4)), 9.63 + 9.66 + 9.73 (3 x s, 3 x 1 H, NH) ppm.

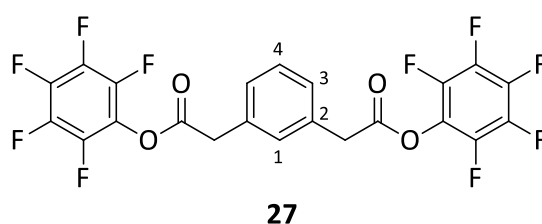
4.4.4 Synthese der Linker

Allgemeine Vorgehensweise

Die entsprechende Säure (1 Äq.) und Pentafluorphenol (2.4 Äq.) wurden in Dichlormethan (15 mL/mmol) gelöst und mit einer Lösung von EDC·HCl (2 Äq) und DMAP (10 mol-%) in Dichlormethan (2 mL/mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 20 h bei 25 °C gerührt und anschließend mit Wasser (2x) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch [SiO₂, Ethylacetat/Hexan, 1:10 (v/v)] aufgereinigt.

Bis(perfluorophenyl)-2,2'-(1,3-phenylen)diacetat (27)

1,3-Phenylendiessigsäure **22** (194 mg, 1.00 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise umgesetzt und aufgearbeitet.



Ausbeute: 447 mg (850 µmol, 85 %) farbloser Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 3.99 (s, 4 H, Ph-CH₂), 7.33 – 7.43 (m, 4 H, C(1)-H + C(2)-H + C(3)-H + C(4)-H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 40.2 (Ph-CH₂), 125.2 (m, F₅PhC(1)), 128.9 (C(3)), 129.6 (C(4)), 130.3 (C(1)), 132.9 (C(2)), 138.0 (dm, ¹J(C,F) = 250 Hz, F₅PhC(4)), 139.7 (dm, ¹J(C,F) = 254 Hz, F₅PhC(2)), 141.1 (dm, ¹J(C,F) = 252 Hz, F₅PhC(3)), 167.4 (CO) ppm.

Experimentaltteil

^{19}F -NMR (376 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = -151.4$ (d, 4 F, $^3J = 18.8$ Hz, PFP-*F*(2,6)), -156.4 (t, 2 F, $^3J = 22.6$ Hz, PFP-*F*(4)), -161.0 (t, 4 F, $^3J = 18.4$ Hz, PFP-*F*(3,5)) ppm.

Smp.: 90–91 °C

GC-HRMS (EI⁺): $\text{C}_{22}\text{H}_8\text{F}_{10}\text{O}_4$

berechnete Masse: $m([\text{M}-\text{C}_6\text{F}_5\text{O}]^+) = 343.0394$

gefundene Masse: $m([\text{M}-\text{C}_6\text{F}_5\text{O}]^+) = 343.0402$

IR (ATR): 1771 (w), 1514 (s), 1509 (s), 1102 (w), 986 (m) cm^{-1} .

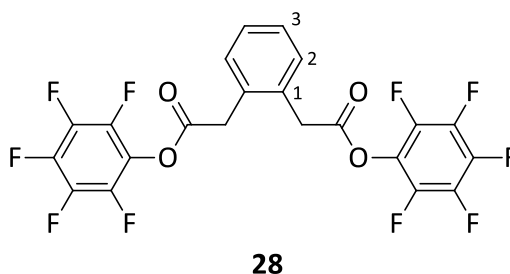
CHN-Analyse: $\text{C}_{22}\text{H}_8\text{F}_{10}\text{O}_4$

berechnet: C: 50.21 % H: 1.53 % N: /

gefunden: C: 50.45 % H: 1.69 % N: /

Bis(perfluorophenyl)-2,2'-(1,2-phenylen)diacetat (**28**)

1,2-Phenylendiessigsäure **23** (390 mg, 2.00 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise umgesetzt und aufgearbeitet.



Ausbeute: 890 mg (1.69 mol, 85 %) farbloser Feststoff.

Experimentalteil

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 4.01$ (s, 4 H, Ph- CH_2), 7.33 – 7.43 (m, 4 H, C(1)-H + C(2)-H + C(3)-H + C(4)-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 37.8$ (Ph- CH_2), 125.1 (m, $\text{F}_5\text{PhC}(1)$), 128.9 (C(3)), 131.4 (C(2)), 131.5 (C(1)), 138.0 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 253$ Hz, $\text{F}_5\text{PhC}(4)$), 139.8 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 254$ Hz, $\text{F}_5\text{PhC}(2)$), 141.2 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 252$ Hz, $\text{F}_5\text{PhC}(3)$), 167.2 (CO) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = -151.7$ (d, 4 F, $^3J = 15.1$ Hz, PFP-F(2,6)), -156.4 (t, 2 F, $^3J = 22.6$ Hz, PFP-F(4)), -161.1 (t, 4 F, $^3J = 20.7$ Hz, PFP-F(3,5)) ppm.

Smp.: 86 – 87 °C

GC-HRMS (EI⁺): $\text{C}_{22}\text{H}_8\text{F}_{10}\text{O}_4$

berechnete Masse: $m([\text{M}-\text{C}_6\text{F}_5\text{O}]^+) = 343.0394$

gefundene Masse: $m([\text{M}-\text{C}_6\text{F}_5\text{O}]^+) = 343.0412$

IR (ATR): 1773 (m), 1510 (s), 1342 (m), 1104 (s), 1084 (s), 982 (m) cm^{-1} .

CHN-Analyse: $\text{C}_{22}\text{H}_8\text{F}_{10}\text{O}_4$

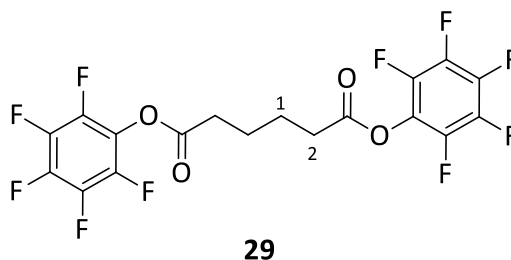
berechnet: C: 50.21 % H: 1.53 % N: /

gefunden: C: 50.18 % H: 1.58 % N: /

Bis(perfluorophenyl)adipat (29)

Adipinsäure **24** (293 mg, 2.00 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise umgesetzt und aufgearbeitet.

Experimentaltteil



Ausbeute: 760 mg (1.59 mmol, 80 %) farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 1.90 – 1.93 (m, 4 H, C(1)-H), 2.74 – 2.77 (m, 4 H, C(2)-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 24.0 (C(1)), 33.0 (C(2)), 125.1 (m, $\text{F}_5\text{PhC}(1)$), 138.0 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 255$ Hz, $\text{F}_5\text{PhC}(4)$), 139.7 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 254$ Hz, $\text{F}_5\text{PhC}(2)$), 141.3 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 250$ Hz, $\text{F}_5\text{PhC}(3)$), 169.1 (CO) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = -151.8 (d, 4 F, $^3J = 18.8$ Hz, PFP-F(2,6)), -156.9 (t, 2 F, $^3J = 18.8$ Hz, PFP-F(4)), -161.2 (t, 4 F, $^3J = 18.8$ Hz, PFP-F(3,5)) ppm.

Smp.: 98 – 99 °C

GC-HRMS (EI⁺): $\text{C}_{18}\text{H}_8\text{F}_{10}\text{O}_4$

berechnete Masse: $m([\text{M}-\text{C}_6\text{F}_5\text{O}]^+) = 295.0394$

gefundene Masse: $m([\text{M}-\text{C}_6\text{F}_5\text{O}]^+) = 295.0379$

IR (ATR): 2974 (w), 1778 (m), 1515 (s), 1093 (m), 1077 (m), 1102 (w), 985 (s) cm^{-1} .

Experimentaltteil

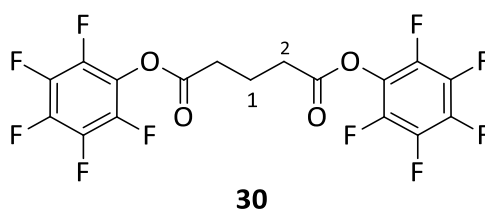
CHN-Analyse: C₁₈H₈F₁₀O₄

berechnet: C: 45.21 % H: 1.69 % N: /

gefunden: C: 45.29 % H: 1.72 % N: /

Bis(perfluorophenyl)glutarat (30)

Glutarsäure **25** (264 mg, 2.00 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise umgesetzt und aufgearbeitet.



Ausbeute: 823 mg (1.77 mmol, 89 %) farbloser Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 2.24 (q, 2 H, ³J = 8.00 Hz, C(1)-H), 2.86 (t, 4 H, ³J = 8.00 Hz, C(2)-H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 19.8 (C(1)), 31.9 (C(2)), 125.0 (m, F₅PhC(1)), 138.1 (dm, ¹J(C,F) = 256 Hz, F₅PhC(4)), 139.8 (dm, ¹J(C,F) = 254 Hz, F₅PhC(2)), 141.2 (dm, ¹J(C,F) = 252 Hz, F₅PhC(3)), 168.7 (CO) ppm.

¹⁹F-NMR (376 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = -151.7 (d, 4 F, ³J = 15.1 Hz, PFP-F(2,6)), -156.7 (t, 2 F, ³J = 20.7 Hz, PFP-F(4)), -161.1 (t, 4 F, ³J = 18.8 Hz, PFP-F(3,5)) ppm.

Smp.: 69 – 70 °C

Experimentaltteil

GC-HRMS (EI⁺): C₁₇H₆F₁₀O₄

berechnete Masse: $m([M-C_6F_5O]^+) = 281.0237$

gefundene Masse: $m([M-C_6F_5O]^+) = 281.0251$

IR (ATR): 1772 (w), 1507 (s), 988 (s) cm⁻¹.

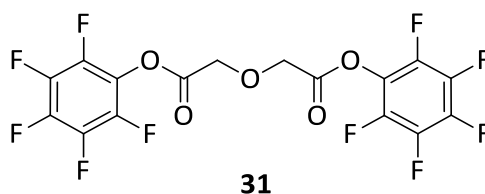
CHN-Analyse: C₁₇H₆F₁₀O₄

berechnet: C: 43.98 % H: 1.30 % N: /

gefunden: C: 44.06 % H: 1.28 % N: /

Bis(perfluorophenyl)-2,2'-oxydiacetat (31)

Diglycolsäure **26** (269 mg, 2.00 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise umgesetzt und aufgearbeitet.



Ausbeute: 580 mg (1.24 mmol, 62 %) farbloser Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): $\delta = 4.69$ (s, 4H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, 25 °C, CDCl₃): $\delta = 67.5$ (CH₂), 124.3 (m, F₅PhC(1)), 138.1 (dm, ¹J(C,F) = 256 Hz, F₅PhC(4)), 140.0 (dm, ¹J(C,F) = 255 Hz, F₅PhC(2)), 141.2 (dm, ¹J(C,F) = 252 Hz, F₅PhC(3)), 165.7 (CO) ppm.

Experimentalteil

^{19}F -NMR (376 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = -151.2$ (d, 4 F, $^3J = 15.1$ Hz, PFP-*F*(2,6)), -155.6 (t, 2 F, $^3J = 20.7$ Hz, PFP-*F*(4)), -160.4 (t, 4 F, $^3J = 18.8$ Hz, PFP-*F*(3,5)) ppm.

Smp.: 106 – 107 °C

GC-HRMS (EI⁺): $\text{C}_{16}\text{H}_4\text{F}_{10}\text{O}_5$

berechnete Masse: $m([\text{M}-\text{C}_6\text{F}_5\text{O}]^+) = 283.0030$

gefundene Masse: $m([\text{M}-\text{C}_6\text{F}_5\text{O}]^+) = 283.0030$

IR (ATR): 1804 (m), 1788 (m), 1514 (s), 1509 (s), 1107 (m), 985 (s), 959 (s) cm^{-1} .

CHN-Analyse: $\text{C}_{16}\text{H}_4\text{F}_{10}\text{O}_5$

berechnet: C: 41.22 % H: 0.86 % N: /

gefunden: C: 41.33 % H: 1.08 % N: /

4.4.5 Synthese der dreifach verbrückten Bis(cyclopeptide)

Allgemeine Vorgehensweise

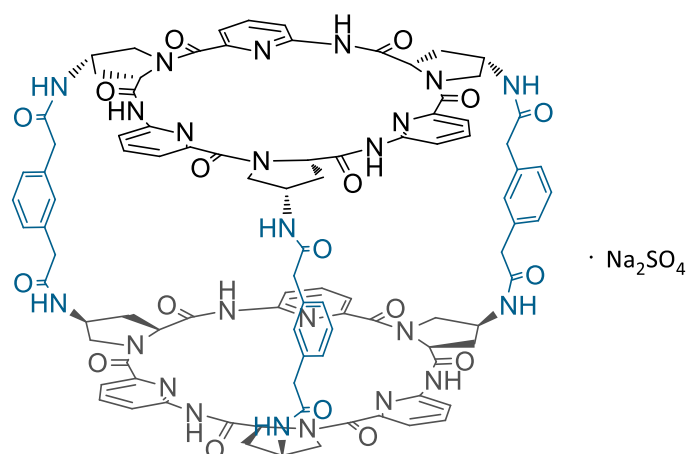
Cyclopeptid **20** (100 mg, 91.0 μmol , 1 Äq.) wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe entschützt, das Produkt in Methanol (50 mL) suspendiert und die Mischung mit $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (13.2 mg, 328 μmol , 3.6 Äquiv.) versetzt. Die entstandene Lösung wurde 18 h bei 25 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DMF (120 mL) aufgenommen, mit einer $(\text{NMe}_4)_2\text{SO}_4$ -Stammlösung in DMF (910 μL , 45.5 μmol , 0.5 Äq.) versetzt und 20 min bei 25 °C rühren gelassen. Die Lösung eines Linkers (1.5 Äq.) in DMF (50 mL) wurde über 5 h langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde weitere 18 h bei 25 °C gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Die Vorgehensweisen bei der Aufreinigung des jeweiligen Produkts sind den entsprechenden Vorschriften zu entnehmen.

BCP A

Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorgehensweise unter Verwendung des Linkers **27** (72.1 mg, 137 μmol , 1.5 Äq.). Für die Aufreinigung wurde der Rückstand mit Diethylether und Dichlormethan gewaschen und zentrifugiert. Das verbleibende Rohprodukt wurde in wenig DMF gelöst und mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt. Folgende Bedingungen wurden gewählt: Säule: NUCLEODUR HILIC, Temperatur, 25 °C; Flow, 10 mL/min; Gradient (Wasser/Acetonitril): 0 min, 10 % Wasser; 0 – 35 min, linearer Anstieg zu 15 % Wasser; 35 – 37 min, linearer Anstieg zu 40 % Wasser; 37 – 50 min, 40 % Wasser; 50 – 52 min lineares Absinken auf 10 % Wasser, 52 – 65 min, 10 % Wasser.

Die Verbindung konnte zunächst nur uneinheitlich isoliert werden. Nach Zugabe von $(\text{NMe}_4)_2\text{SO}_4$ zur NMR-Probe vereinfachte sich das Spektrum erheblich, sodass die Signale im Spektrum dem Sulfatkomplex des Bis(cyclopeptid)s zugeordnet werden konnten. Auch im MALDI-Massenspektrum wurden Signale des gewünschten Produkts beobachtet. Jedoch lieferte die Aufarbeitung dieser Verbindung kein analysenreines Produkt.



BCP A · Na₂SO₄

Ausbeute: 4.23 mg farbloser Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-d₆): δ = 1.68 – 1.70 (m, 6 H, Apro-C_β-H), 2.97 – 3.03 (m, 6 H, Apro-C_β-H + 6 H AE-CH₂), 3.16 – 3.18 (m, 6 H, AE-CH₂), 3.45 – 3.58 (m, 6 H, 6 Apro-C_δ-H), 3.68 – 3.71 (m, 6 H, 6 Apro-C_δ-H), 3.79 – 3.82 (m, 6 H, 6 Apro-C_γ-H), 6.64 – 6.66 (m, 9 H, 6 Apro-C_α-H + 3 PhC(2)-H), 6.77 (d, 6 H, ³J = 8.00 Hz, 6 PhC(4,6)-H), 6.84 – 6.85 (m, 6 H, 6 Apro-NH), 6.92 (t, 3 H, ³J = 8.00 Hz, PhC(5)-H), 7.45 (d, ³J = 8.00 Hz, 6 H, APA-CH(3)), 7.61 (d, ³J = 8.00 Hz, 6 H, APA-CH(5)), 7.68 (t, ³J = 8.00 Hz, 6 H, APA-CH(4)), 11.9 (s, 6 H, APA-NH) ppm.

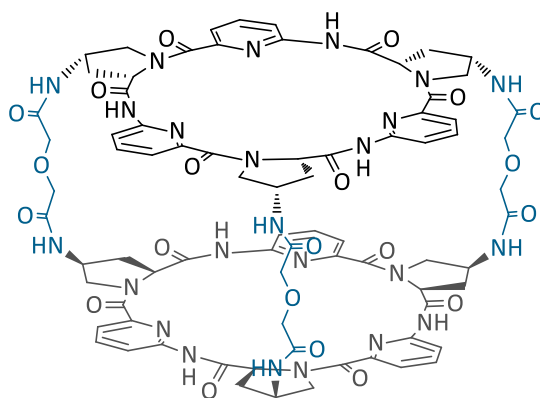
MS MALDI/TOF (*m/z*): 1873.9 [M + Li]⁺ (100 %), 1890.9 [M + Na]⁺ (13 %), 1905.9 [M + K]⁺ (2 %).

BCP E

Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Vorgehensweise unter Verwendung des Linkers **31** (64.2 mg, 137 μmol, 1.5 Äq.). Für die Isolierung des Produkts wurde der Rückstand mit Hilfe einer Kieselgelsäulenchromatographie [SiO₂, Methanol/Dichlormethan, 1:1 (v/v)] sowie einer RP-Säulenchromatographie [RP-8, MeOH/H₂O mit 0.05 % Na₂SO₄, 5:1 → 2:1 → 1:1 (v/v)] aufgereinigt. Das so erhaltene Gemisch aus **BCP E** · Na₂SO₄ und Natriumsulfat wurde in Wasser gelöst und diese Lösung gefriergetrocknet. Das Gemisch wurde anschließend in DCM/MeOH (1:1 (v/v)) gelöst und die Suspension zentrifugiert, um überschüssiges Natriumsulfat zu entfernen. Die überstehende Lösung wurde zur Trockne eingedunstet, der Rückstand in wenig

Experimentaltteil

Wasser/Methanol (4:1 (v/v)) aufgenommen und mit Bariumtriflimid (1.5 Äqu. bezogen auf die Menge des Sulfatkomplexes) versetzt. Die entstandene Suspension wurde zentrifugiert und die überstehende Lösung verworfen. Der zurückgebliebene Feststoff wurde mit DCM/MeOH (5 mL, 1:1 (v/v)) versetzt, wodurch **BCP E** in Lösung ging und Bariumsulfat durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Die überstehende Lösung wurde zur Trockne eingengt und **BCP E** so in analysenreiner Form erhalten.



BCP E

Ausbeute: 12.3 mg (7.28 μmol , 16 %) farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2/1): δ = 2.05 – 2.13 (m, 6 H, Apro- $\text{C}_\beta\text{-H}$), 2.97 – 3.04 (m, 6 H, Apro- $\text{C}_\beta\text{-H}$), 3.37 – 3.42 (m, 6 H, 6 Apro- $\text{C}_\delta\text{-H}$), 3.88 – 3.96 (m, 12 H, Linker- CH_2), 4.12 – 4.17 (m, 6 H, Apro- $\text{C}_\delta\text{-H}$), 4.36 – 4.44 (m, 6 H, Apro- $\text{C}_\gamma\text{-H}$), 5.70 – 5.75 (m, 6 H, Apro- $\text{C}_\alpha\text{-H}$), 7.25 (d, 3J = 8.00 Hz, 6 H, APA- $\text{CH}(3)$), 7.56 (d, 3J = 8.00 Hz, 6 H, APA- $\text{CH}(5)$), 7.73 (t, 3J = 8.00 Hz, 6 H, APA- $\text{CH}(4)$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, 25 °C, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2/1): δ = 37.6 (Apro- C_β), 47.4 (Apro- C_γ), 52.8 (Apro- C_δ), 62.1 (Apro- C_α), 72.9 (ga-C), 117.8 (APA-C(3)), 122.0 (APA-C(5)), 140.9 (APA-C(5)), 149.5 (APA-C(2)), 151.7 (APA-C(6)), 168.2 (APA-CO), 171.9 (ga-CO), 173.0 (Apro-CO) ppm.

Smp.: >300 °C

Experimentaltteil

MS MALDI/TOF (m/z): 1693.7 $[M + Li]^+$ (100 %), 1709.5 $[M + Na]^+$ (87 %), 1725.8 $[M + K]^+$ (26 %)

IR (ATR): 3156 (br), 2991 (w), 2889 (w), 1674 (m), 1601 (m), 1581 (s), 1494, (s), 1439 (s), 1378 (s), 1231 (m), 1199 (s), 1119 (m), 810 (m) cm^{-1} .

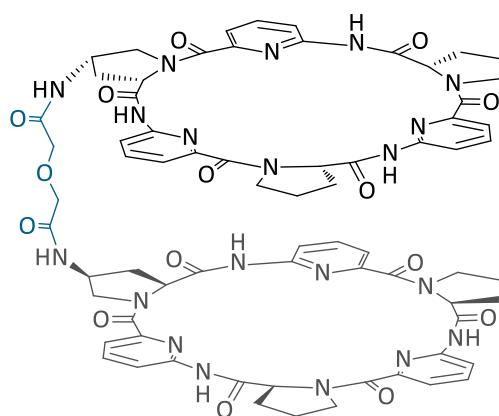
CHN-Analyse: $\text{C}_{78}\text{H}_{78}\text{N}_{24}\text{O}_{21} \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$

Berechnet: C: 50.16 % H: 5.29 % N: 18.00 %

Gefunden: C: 49.94 % H: 5.41 % N: 17.96 %

4.4.6 Synthese des einfach verbrückten Bis(cyclopeptids) BCP F

Verbindung **40** (110 mg, 137 μmol , 1 Äq.) wurde zunächst entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise zur Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe entschützt. Das so erhaltene Amin und Diglycolsäure **26** (9.19 mg, 68.5 μmol , 0.5 Äq.) wurden in DMF (120 mL) gelöst. Die Lösung wurde mit TBTU (52.8 mg, 164 μmol , 1.2 Äq.) sowie DIPEA (70.0 μL , 411 μmol , 3 Äq.) versetzt und für 48 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO_2 , Chloroform/Methanol, 3:1 (v/v)] vorgereinigt. Im Anschluss wurde eine RP-Säulenchromatographie [RP-8, 1,4-Dioxan/ H_2O , 10:1 \rightarrow 5:1 \rightarrow 2:1 (v/v)] durchgeführt. Das Rohprodukt wurde in Dichlormethan/Methanol (5 mL, 1:1 (v/v)) aufgenommen, mit Diethylether ausgefällt, zentrifugiert und getrocknet.



BCP F

Ausbeute: 58.2 mg (35.3 μmol , 52 %) farbloser Feststoff

Experimentalteil

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 25 °C, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2/1): δ = 1.81 – 1.88 (m, 8 H, Pro- $\text{C}_\gamma\text{-H}$), 1.97 – 2.03 (m, 6 H, 4 Pro- $\text{C}_\beta\text{-H}$ + 2 Apro- $\text{C}_\beta\text{-H}$), 2.53 – 2.58 (m, 4 H, Pro- $\text{C}_\beta\text{-H}$), 2.80 – 2.84 (m, 2 H, Apro- $\text{C}_\beta\text{-H}$), 3.63 – 3.67 (m, 10 H, 2 Apro- $\text{C}_\delta\text{-H}$ + 8 Pro- $\text{C}_\delta\text{-H}$), 3.72 – 3.78 (m, 4 H, ga- H), 3.88 – 3.91 (m, 2 H, Apro- $\text{C}_\delta\text{-H}$), 4.36 – 4.38 (m, 2 H, Apro- $\text{C}_\gamma\text{-H}$), 5.58 – 5.62 (m, 4 H, Pro- $\text{C}_\alpha\text{-H}$), 5.70 – 5.72 (m, 2 H, Apro- $\text{C}_\alpha\text{-H}$), 7.17 – .26 (m, 6 H, APA- $\text{CH}(3)$), 7.47 – 7.52 (m, 6 H, APA- $\text{CH}(5)$), 7.69 – 7.73 (m, 6 H, APA- $\text{CH}(4)$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, 25 °C, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2/1): δ = 23.4 + 23.4 (Pro- C_γ), 33.5 + 33.5 (Pro- C_β), 38.0 (Apro- C_β), 47.2 (Apro- C_γ), 49.7 (Pro- C_δ), 53.3 (Apro- C_δ), 61.9 (Apro- C_α), 63.2 + 63.2 (Pro- C_α), 70.9 (ga-C), 117.5 + 117.7 + 117.7 (APA-C(3)), 121.6 + 121.7 + 121.8 (APA-C(5)), 140.6 + 140.7 + 140.8 (APA-C(4)), 149.4 + 149.6 + 149.7 (APA-C(2)), 152.1 + 152.7 (APA-C(6)), 168.3 + 168.4 (APA-CO), 171.5 (ga-CO), 172.4 (Apro-CO), 172.7 + 172.8 (Pro-CO) ppm.

Smp.: >300 °C

ESI-MS (m/z): 750.2 [$\text{M} + 2 \text{Cl}$] $^{2-}$ (100 %), 1429.5 [$\text{M} + \text{H}$] $^-$ (4 %), 1465.5 [$\text{M} + \text{Cl}$] $^-$ (9 %)

IR (ATR): 3225 (br), 2980 (w), 2880 (w), 1770 (m), 1625 (m), 1572 (s), 1464, (s), 1399 (s), 1296 (m), 1155 (s), 1084 (m), 760 (m) cm^{-1} .

CHN-Analyse: $\text{C}_{70}\text{H}_{70}\text{N}_{20}\text{O}_{15} \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

Berechnet: C: 51.03 % H: 5.75 % N: 17.00 %

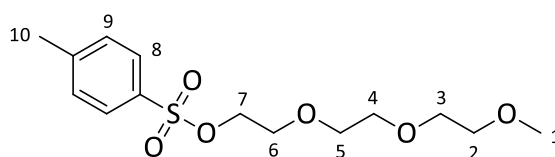
Gefunden: C: 50.88 % H: 5.45 % N: 16.88 %

4.5 Synthesen zu Projekt B

4.5.1 Synthese L_{TEG}

2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzensulfonat (**43**)^[34]

Triethylenglykolmonomethylether **42** (8.21 g, 50.0 mmol, 1 Äq.) wurde in THF (15 mL) gelöst und die erhaltene Lösung auf 0 °C abgekühlt. Unter Rühren wurde zunächst eine Lösung von NaOH (3.86 g, 96.5 mmol, 1.9 Äq.) in Wasser (16 mL) und anschließend eine Lösung von *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (12.4 g, 65.0 mmol, 3 Äq.) in THF (18 mL) langsam bei 0 °C zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde 1 h bei 0 °C und weitere 80 min bei 25 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit Diethylether (125 mL) und 1 M NaOH (40 mL) versetzt und die wässrige Phase abgetrennt. Die organische Phase wurde mit Wasser (2 x 50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.



43

Ausbeute: 15.0 g (47.1 mmol, 94 %) farbloses Öl.

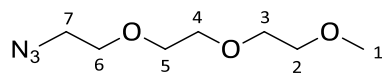
¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 2.44 (s, 3 H, C(10)-H), 3.36 (s, 3 H, C(1)-H), 3.51 – 3.61 (m, 8 H, C(2)-H, C(3)-H, C(4)-H, C(5)-H), 3.67 (t, 2 H, ³J = 4.00 Hz, C(6)-H), 4.15 (t, 2 H, ³J = 4.00 Hz, C(7)-H), 7.33 (d, 2 H, ³J = 8.30 Hz, C(9)-H), 7.78 (d, 2 H, ³J = 8.30 Hz, C(8)-H) ppm.

1-Azido-2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethan (**44**)^[34]

Verbindung **43** (7.96 g, 25.0 mmol, 1 Äq.) und Natriumazid (2.44 g, 37.5 mmol, 1.5 Äq.) wurden in einem Aceton/Wasser-Gemisch (36 mL, 5/1, (v/v)) gelöst und dieses Reaktionsgemisch 20 h refluxiert. Aceton wurde unter vermindertem Druck entfernt und der verbleibende Rückstand mit Wasser (20 mL) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde

Experimentaltteil

anschließend mit Diethylether (4 x 20 mL) extrahiert, die vereinigten, organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.



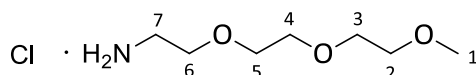
44

Ausbeute: 4.51 g (23.8 mmol, 95 %) farbloses Öl.

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 3.37 – 3.39 (m, 5 H, C(1)-H, C(7)-H), 3.53 – 3.57 (m, 2 H, C(6)-H), 3.64 – 3.68 (m, 8 H, C(2)-H, C(3)-H, C(4)-H, C(5)-H) ppm.

2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)ethanaminhydrochlorid (45)

Verbindung **44** (5.67 g, 30.0 mmol, 1 Äq.) wurde in Methanol (100 mL) gelöst und mit in wenig Wasser suspendiertem Pd/C (567 mg, 10 Gew.-%) sowie 1 M HCl (33.0 mL, 33.0 mmol, 1.1 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck und 25 °C für 8 d gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite® abfiltriert, der Filterkuchen mit Methanol nachgewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.



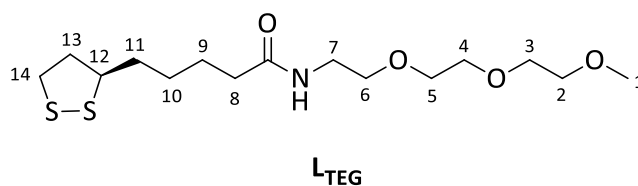
45

Ausbeute: 5.17 g (25.9 mmol, 86 %) hellgelbes Öl.

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 3.05 – 3.15 (m, 2 H, C(7)-H), 3.35 – 3.39 (m, 5 H, C(1)-H, C(6)-H), 3.61 – 3.68 (m, 6 H, C(3)-H, C(4)-H, C(5)-H) 3.77 (t, 2 H, ³J = 4.00 Hz, C(2)-H), 6.31 (s, 2 H, NH) ppm.

**(R)-5-(1,2-Dithiolan-3-yl)-N-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)-ethyl)pentanamid
(L_{TEG})**

(R)-1,2-Dithiolan-3-pentansäure (4.12 g, 20.0 mmol, 1 Äq.) und **45** (5.17 g, 25.9 mmol, 1.3 Äq.) wurden in DMF (50 mL) gelöst und mit TBTU (8.31 g, 25.9 mmol, 1.3 Äq.) sowie DIPEA (13.2 mL, 77.7 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 6 d bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie vorgereinigt [SiO₂, EtOAc/Petroleumether, 2:1 → Aceton (v/v)]. Das so erhaltene Rohprodukt wurde abschließend mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt. Folgende Bedingungen wurden gewählt: Säule: BetaBasic, Temperatur, 25 °C; Flow, 10 mL/min; Gradient (Wasser/Acetonitril): 0 – 5 Minuten, 10 % Acetonitril; 5 – 31 Minuten, linearer Anstieg auf 90 % Acetonitril; 31 – 40 Minuten, 90 % Acetonitril; 40 – 41 Minuten, lineare Abnahme auf 10 % Acetonitril; 41 – 42 Minuten, 10 % Acetonitril.



Ausbeute: 3.11 g (8.84 mmol, 44 %) hellgelbes Öl.

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, MeOD-d₄): δ = 1.39 – 1.53 (m, 2 H, C(10)-H), 1.60 – 1.72 (m, 4 H, C(9)-H + C(11)-H), 1.85 – 1.93 (m, 1 H, 1 C(13)-H), 2.21 (t, 2 H, ³J = 8.00 Hz, C(8)-H), 2.43 – 2.50 (m, 1 H, 1 C(13)-H), 3.07 – 3.21 (m, 2 H, C(14)-H), 3.34 – 3.36 (m, 5 H, C(1)-H + C(7)-H), 3.52 – 3.65 (m, 11 H, C(2)-H, C(3)-H, C(4)-H, C(5)-H, C(6)-H, C(12)-H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, 25 °C, MeOD-d₄): δ = 26.7 (C(10)), 29.9 (C(9)), 35.8 (C(11)), 36.8 (C(8)), 39.4 (C(13)), 40.4 (C(14)), 41.3 (C(12)), 57.6 (C(7)), 59.1 (C(1)), 70.6 + 71.2 + 71.4 + 71.6 (C(3) + C(4) + C(5) + C(6)), 72.9 (C(2)), 176.1 (CO).

MS (MALDI/TOF) *m/z*: 352.0 [M+H]⁺ (100 %), 374.0 [M+Na]⁺ (20 %), 390.0 [M+K]⁺ (8 %).

Experimentaltteil

IR (ATR): 311 (w), 2923 (m), 2863 (m), 1646 (s), 1095 (s), 850 (C-S) cm^{-1} .

CHN-Analyse: $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{S}_2 + 0.75 \text{H}_2\text{O}$

berechnet: C: 49.35 % H: 8.42 % N: 3.84 % S: 17.57 %

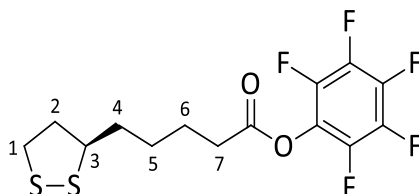
gefunden: C: 49.24 % H: 8.09 % N: 3.68 % S: 17.39 %

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = 57.2$ ($c = 1$, MeOH)

4.5.2 Synthese der funktionellen Liganden

(*R*)-Perfluorophenyl-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoat (**47**)^[129]

(*R*)-Liponsäure **46** (2.06 g, 10.0 mmol, 1 Äq.) und Pentafluorphenol (2.02 g, 11.0 mmol, 1.1 Äq.) wurden in Dichlormethan (40 mL) gelöst. Zur Reaktionsmischung wurde unter Rühren eine Lösung aus EDC·HCl (2.11 g, 11.0 mmol, 1 Äq.) und DMAP (122 mg, 1.00 mmol, 10 mol-%) in Dichlormethan (20 mL) getropft. Die Reaktionsmischung wurde bei 25 °C für 19 h gerührt und danach mit Wasser (3 × 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.



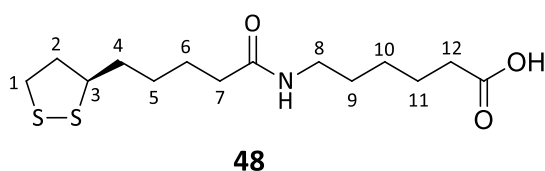
47

Ausbeute: 3.55 g (9.53 mmol, 95 %) gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3): $\delta = 1.51 - 1.65$ (m, 2 H, C(5)-H), 1.69 – 1.86 (m, 4 H, C(4)-H + C(6)-H), 1.88 – 1.97 (m, 1 H, C(2)-H), 2.44 – 2.51 (m, 1 H, C(2)-H), 2.69 (t, 2 H, $^3J = 7.40$ Hz, C(7)-H), 3.10 – 3.23 (m, 2 H, C(1)-H), 3.56 – 3.62 (m, 1 H, C(3)-H) ppm.

(R)-6-(5-(1,2-Dithiolan-3-yl)-pentanamido)hexansäure (48)

6-Aminohexansäure (1.19 g, 9.07 mmol, 1 Äq.) und **47** (3.71 g, 9.98 mmol, 1.1 Äq.) wurden in DMF (40 mL) gelöst und diese Lösung 72 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in DCM (50 mL) aufgenommen und mit 1 M HCl (2 x 30 mL) und Wasser (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit wenig Diethylether angerieben. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, der Filterkuchen mit Diethylether nachgewaschen und das Produkt abschließend getrocknet.



Ausbeute: 2.21 g (6.92 mmol, 76 %) hellgelber Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO-d₆): δ = 1.21 – 1.68 (m, 12 H, C(4)-H, C(5)-H, C(6)-H, C(9)-H, C(10)-H, C(11)-H), 1.83 – 1.89 (m, 1 H, C(2)-H), 2.03 (t, 2 H, ³J = 7.30 Hz, C(7)-H), 2.18 (t, 2 H, ³J = 7.40 Hz, C(12)-H), 2.36 – 2.44 (m, 1 H, C(2)-H), 2.97 – 3.02 (m, 2 H, C(8)-H), 3.09 – 3.19 (m, 2 H, C(1)-H), 3.56 – 3.61 (m, 1 H, C(3)-H), 7.76 (t, 1 H, ³J = 5.30 Hz, NH) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO-d₆): δ = 24.3 (C(11)), 25.2 (C(6)), 26.0 (C(10)), 28.4 (C(5)), 29.0 (C(9)), 33.7 (C(4)), 34.2 (C(7)), 35.3 (C(12)), 38.2 (C(2)), 38.3 (C(1)), 56.2 (C(3)), 171.9 (CONH), 174.6 (COOH) ppm.

Smp.: 79 °C

ESI-MS (negativ) (*m/z*): 318.0 [M – H]⁻ (100 %), 354.0 [M + Cl]⁻ (14 %).

Experimentalteil

IR (ATR): 3299 (w), 2919 (w), 2869 (w), 2852 (w), 1694 (m), 1632 (s), 1534 (s), 1269 (w), 941 (w) cm^{-1} .

CHN-Analyse: $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{S}_2$

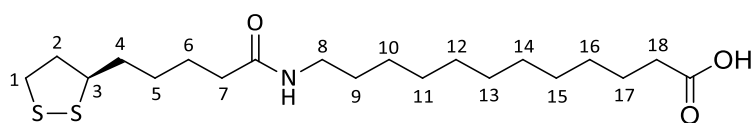
berechnet: C: 52.63 % H: 7.89 % N: 4.38 % S: 20.07 %

gefunden: C: 52.46 % H: 7.87 % N: 4.66 % S: 19.69 %

Drehwert: $[\alpha]_D^{24} = 66.0$ ($c = 0.5$, MeOH)

(R)-12-(5-(1,2-Dithiolan-3-yl)-pentanamido)dodekansäure (49)

12-Aminododekansäure (1.72 g, 7.98 mmol, 1 Äq.) und **47** (3.27 g, 8.78 mmol, 1.1 Äq.) wurden in DMF (40 mL) gelöst und diese Lösung 72 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in DCM (50 mL) aufgenommen und mit 1 M HCl (2 x 30 mL) und Wasser (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO_2 , DCM/MeOH, 20:1 (v/v)] aufgereinigt. Der so erhaltene Feststoff wurde in DCM (2 x 20 mL) suspendiert, zentrifugiert und getrocknet.



49

Ausbeute: 2.29 g (5.67 mmol, 71 %) hellgelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, DMSO-d_6): $\delta = 1.23 - 1.68$ (m, 24 H, C(4)-H, C(5)-H, C(6)-H, C(9)-H, C(10)-H, C(11)-H, C(12)-H, C(13)-H, C(14)-H, C(15)-H, C(16)-H, C(17)-H), 1.83 – 1.87 (m, 1 H, C(2)-H), 2.03 (t, 2 H, $^3J = 7.30$ Hz, C(7)-H), 2.18 (t, 2 H, $^3J = 7.40$ Hz, C(18)-H), 2.36 – 2.44 (m, 1 H, C(2)-H), 2.97 – 3.02 (m, 2 H, C(8)-H), 3.08 – 3.21 (m, 2 H, C(1)-H), 3.56 – 3.61 (m, 1 H, C(3)-H), 7.75 (t, 1 H, $^3J = 5.40$ Hz, NH) ppm.

Experimentalteil

^{13}C -NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 24.6 (C(17)), 25.2 (C(6)), 26.5 (C(16)), 28.4 + 28.6 + 28.8 + 28.8 + 29.0 + 29.0 + 29.1 + 29.2 (C(5), C(9), C(10), C(11), C(12), C(13), C(14), C(15)), 33.7 (C(4)), 34.2 (C(7)), 35.3 (C(18)), 38.2 (C(2)), 38.4 (C(1)), 56.2 (C(3)), 171.8 (CONH), 174.6 (COOH) ppm.

Smp.: 95 °C

ESI-MS (negativ) (m/z): 402.2 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$ (100 %), 438.1 [$\text{M} + \text{Cl}$] $^-$ (8 %).

IR (ATR): 3302 (w), 2917 (w), 2869 (w), 2850 (w), 1698 (m), 1632 (s), 1534 (m), 1414 (w), 1269 (w), 939 (w) cm^{-1} .

CHN-Analyse: $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_3\text{S}_2$

berechnet: C: 59.51 % H: 9.24 % N: 3.47 % S: 15.89 %

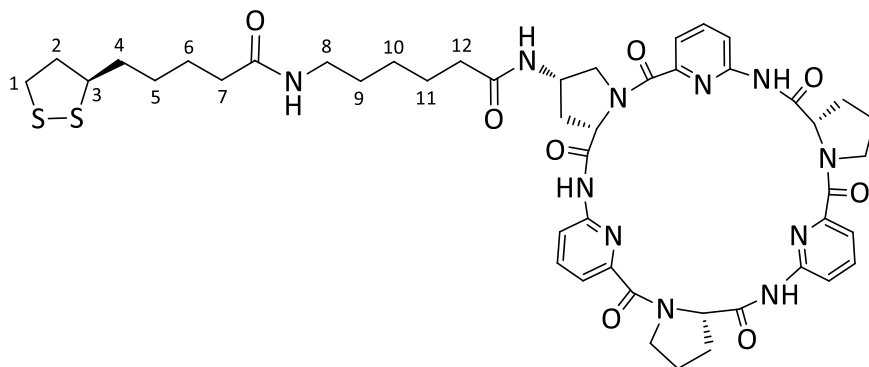
gefunden: C: 59.41 % H: 9.10 % N: 3.69 % S: 15.45 %

Drehwert: $[\alpha]_D^{24} = 56.7$ ($c = 0.5$, MeOH)

Ligand L_{CPC6}

Verbindung **40** (196 mg, 245 μmol , 1 Äq.) wurde zunächst entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise zur Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe entschützt. Das so erhaltene Amin wurde in DMF (15 mL) gelöst, mit **48** (118 mg, 368 μmol , 1.5 Äq.), TBTU (118 mg, 368 μmol , 1.5 Äq.) und DIPEA (125 μL , 735 μmol , 3 Äq.) versetzt und die Lösung 72 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels RP-8-Säulenchromatographie [$\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 5:1 \rightarrow 2:1 \rightarrow 1:2 (v/v)] aufgereinigt. Der so erhaltene Feststoff wurde in MeOH gelöst, mit Diethylether ausgefällt, zentrifugiert und getrocknet.

Experimentalteil



L_{CPC6}

Ausbeute: 154 mg (159 μ mol, 65 %) hellgelber Feststoff.

¹H-NMR (600 MHz, 25 °C, MeOD-*d*₄): δ = 1.16 – 1.20 (m, 2 H, C(10)-H), 1.30 – 1.33 (m, 2 H, C(9)-H), 1.36 – 1.48 (m, 4 H, C(6)-H + C(11)-H), 1.57 – 1.66 (m, 3 H, 1 C(4)-H + C(5)-H), 1.69 – 1.74 (m, 1 H, C(4)-H), 1.86 – 1.90 (m, 1 H, 1 C(2)-H), 1.91 – 1.97 (m, 2 H, 2 Pro-C _{γ} -H), 1.99 – 2.04 (m, 2 H, 2 Pro-C _{γ} -H), 2.06 – 2.17 (m, 5 H, 1 Apro-C _{β} -H + 2 Pro-C _{β} -H + C(7)-H), 2.19 (t, 2 H, J = 6.00 Hz, C(12)-H), 2.42 – 2.48 (m, 1 H, 1 C(2)-H), 2.66 – 2.69 (m, 2 H, 2 Pro-C _{β} -H), 2.89 – 2.93 (m, 1 H, 1 Apro-C _{β} -H), 3.04 – 3.07 (m, 2 H, C(8)-H), 3.08 – 3.11 (m, 1 H, 1 C(1)-H), 3.14 – 3.18 (m, 1 H, 1 C(1)-H), 3.55 – 3.59 (m, 1 H, C(3)-H), 3.69 – 3.72 (m, 1 H, 1 Apro-C _{δ} -H), 3.74 – 3.79 (m, 2 H, 2 Pro-C _{δ} -H), 3.80 – 3.84 (m, 2 H, 2 Pro-C _{δ} -H), 4.02 – 4.05 (m, 1 H, 1 Apro-C _{δ} -H), 4.47 – 4.49 (m, 1 H, Apro-C _{γ} -H), 5.61 – 5.69 (m, 2 H, Pro-C _{α} -H), 5.79 – 5.83 (m, 1 H, Apro-C _{α} -H), 7.32 – 7.43 (m, 3 H, APA-CH(5)), 7.54 – 7.59 (m, 3 H, APA-CH(3)), 7.75 – 7.82 (m, 3 H, APA-CH(4)) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, 25 °C, MeOD-*d*₄): δ = 23.6 + 23.7 (Pro-C _{γ}), 26.4 (C(5)), 26.7 (C(6)), 27.2 (C(10)), 29.7 (C(9)), 29.8 (C(11)), 33.9 + 33.9 (Pro-C _{β}), 35.5 (C(4)), 36.8 (C(7)), 36.9 (C(12)), 38.8 (Apro-C _{β}), 39.3 (C(1)), 40.1 (C(8)), 41.3 (C(2)), 48.0 (Apro-C _{γ}), 49.9 + 50.0 (Pro-C _{δ}), 53.5 (Apro-C _{δ}), 57.7 (C(3)), 62.2 (Apro-C _{α}), 63.4 + 63.5 (Pro-C _{α}), 117.5 + 117.6 + 117.6 (APA-C(5)), 121.8 (APA-C(3)), 140.6 (APA-C(4)), 150.1 + 150.2 (APA-C(2)), 152.5 + 153.1 + 153.2 (APA-C(6)), 168.8 (APA-CO), 173.0 (Pro-CO), 176.3 (C(7)-CO), 176.3 (C(12)-CO) ppm.

Smp.: 202 °C

Experimentaltteil

ESI-MS (negativ) (m/z): 966.4 [$M - H$]⁻ (27 %), 1002.4 [$M + Cl$]⁻ (100 %).

IR (ATR): 3270 (w), 2933 (w), 2869 (w), 1704 (w), 1625 (m), 1572 (s), 1532 (s), 1464 (s), 1418 (s), 1398 (s), 1298 (m), 1155 (m), 759 (m) cm^{-1} .

CHN-Analyse: $\text{C}_{47}\text{H}_{57}\text{N}_{11}\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

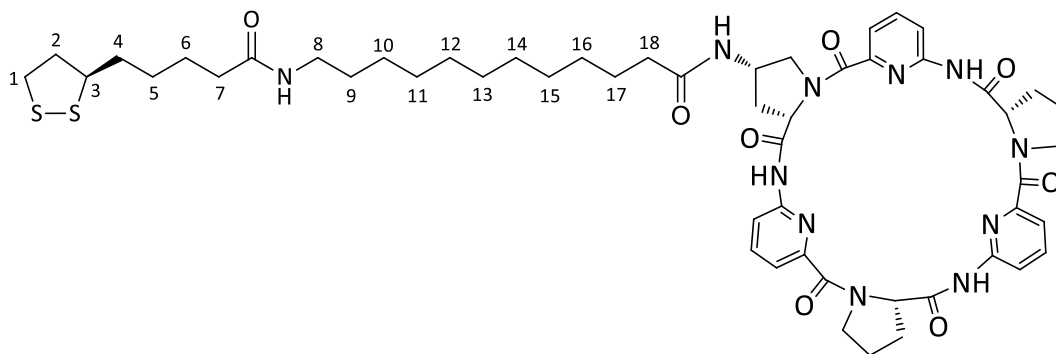
berechnet: C: 56.22 % H: 6.12 % N: 15.34 % S: 6.39 %

gefunden: C: 56.14 % H: 6.08 % N: 15.29 % S: 6.61 %

Drehwert: $[\alpha]_D^{26} = -241.7$ ($c = 0.25$, MeOH)

Ligand L_{CPC12}

Verbindung **40** (200 mg, 250 μmol , 1 Äq.) wurde zunächst entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise zur Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe entschützt. Das so erhaltene Amin wurde in DMF (15 mL) gelöst, mit **82** (151 mg, 375 μmol , 1.5 Äq.), TBTU (120 mg, 375 μmol , 1.5 Äq.) und DIPEA (128 μL , 750 μmol , 3 Äq.) versetzt und diese Lösung 72 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels RP-8-Säulenchromatographie [$\text{H}_2\text{O}/1,4\text{-Dioxan}$, 2:1 \rightarrow 1:1 \rightarrow 1:2 (v/v)] aufgereinigt. Der so erhaltene Feststoff wurde in MeOH gelöst, mit Diethylether ausgefällt, zentrifugiert und getrocknet.



L_{CPC12}

Experimentaltteil

Ausbeute: 153mg (145 μ mol, 58 %) hellgelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 0.91 – 0.94 (m, 1 H, 1 C(15)-H), 1.08 – 1.26 (m, 12 H, C(10)-H + C(11)-H + C(12)-H + C(13)-H + C(14)-H + 1 C(15)-H + 1 C(16)-H), 1.28 – 1.37 (m, 7 H, C(5)-H + C(6)-H + C(9)-H + 1 C(16)-H), 1.44 – 1.57 (m, 3 H, 1 C(4)-H + C(17)-H), 1.62 – 1.68 (m, 1 H, C(4)-H), 1.79 – 1.88 (m, 5 H, 4 Pro-C γ -H + 1 C(2)-H), 1.95 – 2.06 (m, 7 H, 1 Apro-C β -H + 2 Pro-C β -H + C(7)-H + C(18)-H), 2.37 – 2.42 (m, 1 H, 1 C(2)-H), 2.52 – 2.58 (m, 2 H, 2 Pro-C β -H), 2.80 – 2.85 (m, 1 H, 1 Apro-C β -H), 2.98 – 3.02 (m, 2 H, C(8)-H), 3.08 – 3.12 (m, 1 H, 1 C(1)-H), 3.16 – 3.19 (m, 1 H, 1 C(1)-H), 3.39 – 3.43 (m, 1 H, 1 Apro-C δ -H), 3.56 – 3.60 (m, 3 H, 2 Pro-C δ -H + C(3)-H), 3.67 – 3.71 (m, 2 H, 2 Pro-C δ -H), 3.84 – 3.88 (m, 1 H, 1 Apro-C δ -H), 4.26 – 4.29 (m, 1 H, Apro-C γ -H), 5.62 – 5.69 (m, 3 H, Pro-C α -H + Apro-C α -H), 7.21 – 7.29 (m, 3 H, APA-CH(5)), 7.41 – 7.45 (m, 3 H, APA-CH(3)), 7.70 – 7.75 (m, 3 H, APA-CH(4)) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, 25 °C, DMSO- d_6): δ = 16.8 (C(14)), 19.3 (C(16)), 22.4 + 22.4 (Pro-C γ), 23.1 + 25.1 + 26.5 (C(12) + C(13) + C(15)), 28.3 + 28.6 + 28.7 + 28.8 + 28.9 + 29.0 + 29.2 (C(5) + C(6) + C(9) + C(10) + C(11) + C(16) + C(17)), 32.6 + 32.6 (Pro-C β), 34.2 (C(4)), 35.3 (C(7)), 35.4 (C(18)), 37.5 (Apro-C β), 38.1 (C(1)), 38.8 (C(8)), 41.9 (C(2)), 46.2 (Apro-C γ), 48.2 + 48.3 (Pro-C δ), 52.0 (Apro-C δ), 56.2 (C(3)), 60.5 (Apro-C α), 61.5 + 61.6 (Pro-C α), 115.5 + 115.5 + 115.9 (APA-C(5)), 119.7 + 119.7 (APA-C(3)), 139.0 + 139.0 + 139.0 (APA-C(4)), 148.6 (APA-C(2)), 151.6 + 151.9 (APA-C(6)), 165.9 + 166.0 + 166.1 (APA-CO), 170.7 + 171.1 + 171.2 (Pro-CO), 171.8 (C(7)-CO), 172.5 (C(18)-CO) ppm.

Smp.: 187 °C

ESI-MS (negativ) (m/z): 1050.5 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$ (7 %), 1086.5 [$\text{M} + \text{Cl}$] $^-$ (100 %).

IR (ATR): 3296 (w), 2922 (w), 2869 (w), 2852 (w), 1694 (w), 1632 (m), 1534 (s), 1532 (s), 1462 (m), 1414 (w), 1269 (w), 1102 (w), 673 (w) cm^{-1} .

Experimentalteil

CHN-Analyse: $C_{53}H_{73}N_{11}O_{10}S_2 \cdot 1.5 H_2O$

berechnet: C: 58.98 % H: 6.72 % N: 14.27 % S: 5.94 %

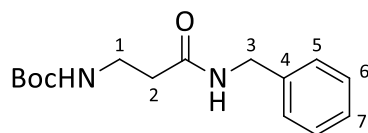
gefunden: C: 58.81 % H: 6.45 % N: 14.36 % S: 5.67 %

Drehwert: $[\alpha]_D^{26} = -167.1$ (c = 0.25, MeOH)

4.5.3 Synthese von Aminen für Kupplungen auf Goldnanopartikeln

tert-Butyl-(3-(benzylamino)-3-oxopropyl)carbamate (BocAlaBA)

Boc- β -Alanin (568 mg, 3.00 mmol, 1 Äq.) und Benzylamin (328 μ L, 3.00 mmol, 1 Äq.) wurden in DCM (10 mL) gelöst, mit TBTU (1.16 g, 3.60 mmol, 1.2 Äq.) sowie DIPEA (1.53 mL, 9.00 mmol, 3 Äq.) versetzt und diese Lösung für 72 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO₂, EA/Hexan, 4:1 (v/v)] aufgereinigt.



BocAlaBA

Ausbeute: 787 mg (2.83 mmol, 94 %) farbloser Feststoff.

¹H-NMR (600 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 1.40 (s, 9 H, Boc-*H*), 2.42 (t, 2 H, ³*J* = 5.90 Hz, C(2)-*H*), 3.39 (t, 2 H, ³*J* = 6.00 Hz, C(1)-*H*), 4.41 (d, 2 H, ³*J* = 5.50 Hz, C(3)-*H*), 5.22 (br s, 1 H, NH), 6.27 (br s, 1 H, NH), 7.24 – 7.32 (m, 5 H, Ph-*H*) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 28.5 (Boc-CH₃), 36.4 (C(2)), 36.9 (C(1)), 43.7 (C(3)), 79.5 (Boc-C), 127.7 (C(5)), 127.9 (C(6)), 128.8 (C(7)), 138.2 (C(4)), 156.3 (BocCO), 171.5 (BnNHCO) ppm.

ESI-MS (positiv) (*m/z*): 301.1 [M + Na]⁺ (16 %), 579.3 [M₂ + Na]⁺ (100 %).

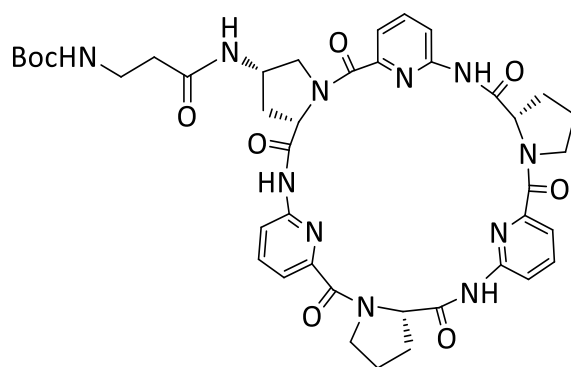
CHN-Analyse: C₁₅H₂₂N₂O₃

berechnet: C: 64.73 % H: 7.97 % N: 10.06 %

gefunden: C: 64.68 % H: 7.98 % N: 10.06 %

BocAlaCP

Verbindung **40** (80.9 mg, 101 μmol , 1 Äq.) wurde zunächst entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise zur Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe entschützt. Das so erhaltene Amin und Boc- β -Alanin (21.0 mg, 101 μmol , 1.1 Äq.) wurden in DMF (10 mL) gelöst, mit TBTU ((38.9 mg, 121 μmol , 1.2 Äq.) sowie DIPEA (51.5 μL , 303 μmol , 3 Äq.) versetzt und für 48 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO_2 , DCM/Aceton, 10:1 \rightarrow DCM/MeOH, 10:1 \rightarrow 8:1 \rightarrow 5:1 (v/v)] aufgereinigt. Das Rohprodukt wurde in Methanol aufgenommen, mit Diethylether ausgefällt, zentrifugiert und getrocknet.



BocAlaCP

Ausbeute: 69.0 mg (82.3 μmol , 81 %) farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, MeOD-d_4): δ = 1.37 (s, 9 H, Boc- H), 1.87 – 1.96 (m, 4 H, Pro- C_γ - H), 2.00 – 2.11 (m, 3 H, 2 Pro- C_β - H + 1 Apro- C_β - H), 2.22 – 2.27 (m, 2 H, C(1)- H), 2.65 – 2.69 (m, 2 H, 2 Pro- C_β - H), 2.95 – 3.02 (m, 1 H, Apro- C_β - H), 3.19 (t, J = 6.0 2 H, C(2)- H), 3.59 – 3.64 (m, 1 H, 1 Apro- C_δ - H), 3.71 – 3.84 (m, 4 H, Pro- C_δ - H), 4.04 – 4.08 (m, 1 H, 1 Apro- C_δ - H), 4.39 – 4.42 (m, 1 H, Apro- C_γ - H), 5.90 – 6.00 (m, 3 H, Apro- C_α - H + Pro- C_α - H), 7.41 (t, J = 8.0 3 H, APA- $\text{CH}(5)$), 7.57 – 7.59 (m, 3 H, APA- $\text{CH}(3)$), 7.72 – 7.78 (m, 3 H, APA- $\text{CH}(4)$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, 25 °C, MeOD-d_4): δ = 23.6 + 23.7 (Pro- C_γ), 28.7 (Boc- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 33.8 (Pro- C_β), 37.4 (C(2)), 37.9 (C(1)), 38.5 (Apro- C_β), 47.9 (Apro- C_γ), 49.7 (Pro- C_δ), 53.6 (Apro- C_δ), 62.5

Experimentalteil

(Apro- C_α), 63.7 + 63.7 (Pro- C_α), 80.1 (Boc- $C(CH_3)_3$), 117.4 + 117.4 + 117.6 (APA-C(5)), 121.7 + 121.8 (APA-C(3)), 140.4 + 140.4 + 140.4 (APA-C(4)), 150.2 + 150.3 + 150.4 (APA-C(2)), 152.8 + 153.2 + 153.2 (APA-C(6)), 158.3 (Boc-CO), 168.6 + 168.7 + 172.3 (APA-CO), 172.8 + 172.8 (Pro-CO), 174.2 (β -Alanin-CO) ppm.

Smp.: 241 °C

MS MALDI/TOF (m/z): 738.2 [$M - \text{Boc} + \text{H}$]⁺ (9 %), 860.3 [$M + \text{Na}$]⁺ (100 %), 876.4 [$M + \text{K}$]⁺ (9 %).

IR (ATR): 3256 (w), 3030 (w), 2979 (w), 2880 (w), 1700 (m), 1627 (m), 1572 (s), 1527 (s), 1465 (m), 1424 (w), 1399 (m), 1296 (w), 1158 (w), 760 (w) cm^{-1} .

CHN-Analyse: $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{N}_{11}\text{O}_9 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$

berechnet: C: 55.77 % H: 5.94 % N: 17.45 %

gefunden: C: 55.88 % H: 5.74 % N: 17.35 %

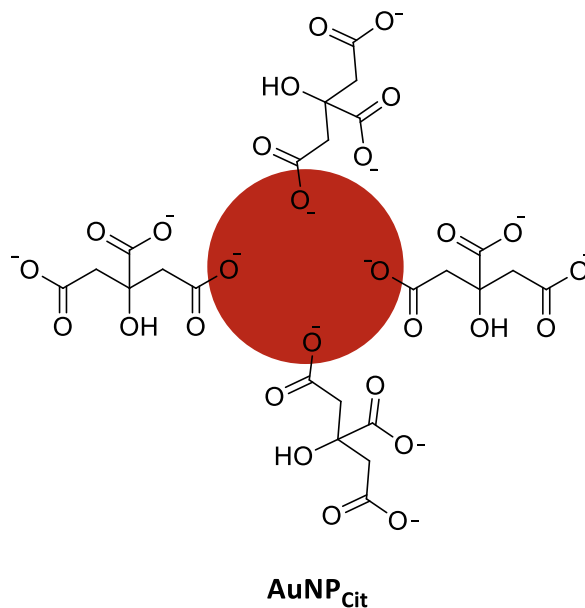
Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -359.3$ ($c = 0.5$, MeOH)

4.5.4 Synthesen der Goldnanopartikel AuNP

Bei allen Synthesen wurden ausschließlich Lösungsmittel in HPLC Qualität verwendet.

Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel AuNP_{Cit}^[84]

Trinatriumcitrat Dihydrat (484 mg, 1.65 mmol, 12.5 Äq.) wurde in Wasser (250 mL) gelöst, die Lösung auf 100 °C erhitzt und für 15 min refluxiert. Währenddessen wurde eine Lösung von Tetrachlorgoldsäure (44.8 mg, 132 µmol, 1 Äq.) in Wasser (1 mL) ebenfalls auf 100 °C erhitzt und anschließend schnell zu der siedenden Citratlösung gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 20 min refluxiert und dann auf 25 °C abkühlen gelassen. Die zur Funktionalisierung benötigte Menge an Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln wurde in einen Dialyseschlauch überführt und für 24 h bei 25 °C gegen Wasser dialysiert.

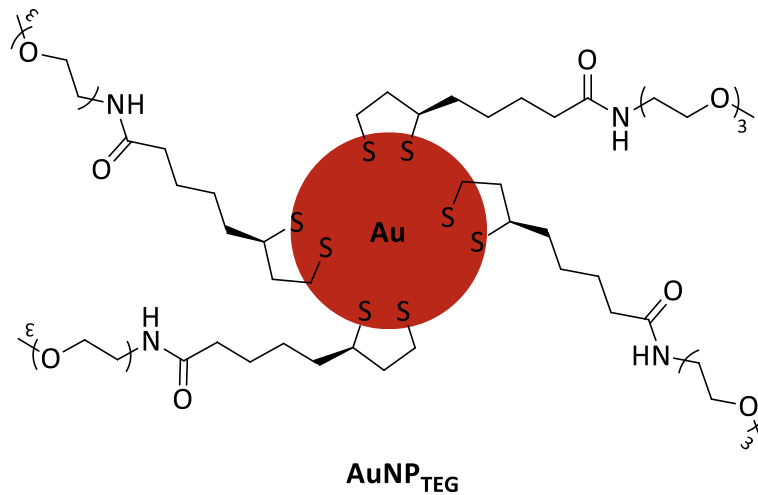


Mono-funktionalisierte Goldnanopartikel AuNP_{TEG}

Dialysierte AuNP_{Cit} Stammlösung (20 mL) wurde mit einer Stammlösung von L_{TEG} (1.00 mL, 100 µmol, 0.1 M in MeOH) versetzt und 48 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und mittels Größenausschlusschromatographie [Sephadex® G10, H₂O/MeOH = 1/1, (v/v)] vorgereinigt. Die AuNP Fraktion wurde in Membranfilter überführt, zentrifugiert (3000 rpm, 10 °C) und mit

Experimentaltteil

Wasser/Methanol (1:1 (v/v), 3 x 10 mL) gewaschen. Die erhaltenen Goldnanopartikel wurde für weitere Untersuchungen in dem entsprechenden Lösungsmittel wieder aufgenommen.



Ausbeute: 3.52 mg

Gemischt-funktionalisierte Goldnanopartikel AuNP_{TEG_CPC6} und AuNP_{TEG_CPC12}

Allgemeine Vorgehensweise

Dialysierte AuNP_{Cit} Stammlösung (20 mL) wurde mit einem organischen Lösungsmittel (MeOH oder DMF, 20 – 40 mL), gegebenenfalls einem Additiv, sowie wahlweise L_{CPC6} oder L_{CPC12} gelöst in MeOH oder DMF (1 mL) und einer Stammlösung von L_{TEG} (0.1 M in MeOH oder DMF) versetzt, wobei die Zugabezeitpunkte variiert wurden. Sobald beide Liganden zugesetzt waren, wurde 48 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in wenig Wasser/MeOH (1:2, (v/v)) aufgenommen und mittels Größenausschlusschromatographie [Sephadex[®] LH-20, H₂O/MeOH, 1:2, (v/v)] vorgereinigt. Die AuNP Fraktion wurde in Membranfilter überführt, zentrifugiert (3000 rpm, 10 °C) und mit Wasser/Methanol (1:1 (v/v), 3 x 10 mL) gewaschen. Die erhaltenen Goldnanopartikel wurde für weitere Untersuchungen in dem entsprechenden Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch wieder aufgenommen. Die in verschiedenen Ansätzen verwendeten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst, wobei die unter den Einträgen 1 und 2 angegeben Ansätze aufgrund der auftretenden Trübung nur einmal durchgeführt wurden. Die anderen Ansätze wurden jeweils mindestens dreimal wiederholt.

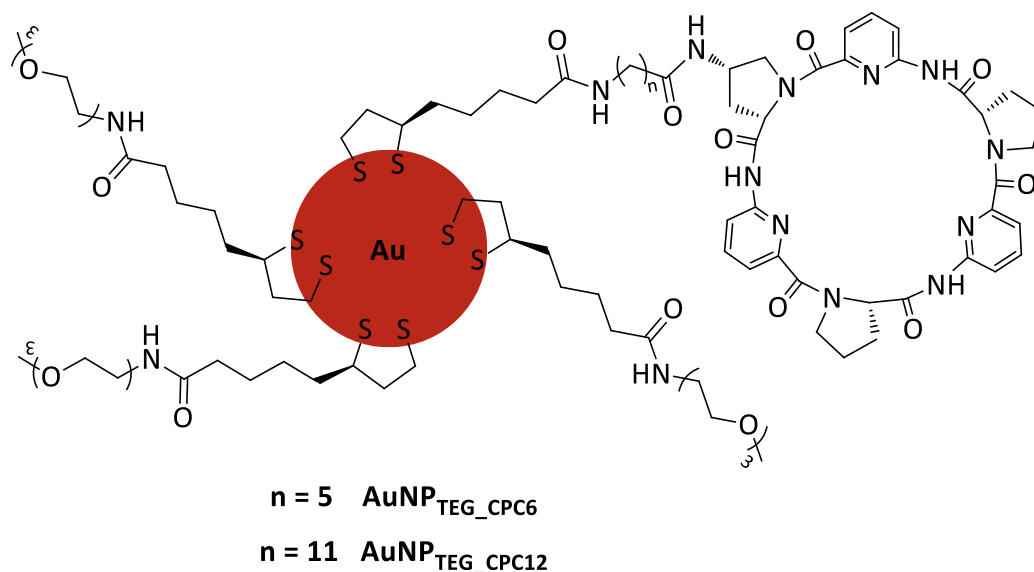
Experimentaltteil

Tabelle 10 Reaktionsbedingungen

Eintrag	MeOH / DMF	Additiv	L _{CPC6}	L _{CPC12}	L _{TEG}	Zeit zw. CPC und L _{TEG} Zugabe	Ergebnis
1	5 mL MeOH	/	9.68 mg 10.0 μmol 1 Äq.	/	900 μL 90.0 μmol 9 Äq.	/	kein CP auf AuNP
2	15 mL MeOH	/	/	10.5 mg 10.0 μmol 1 Äq.	900 μL 90.0 μmol 9 Äq.	/	kein CP auf AuNP
3	20 mL MeOH	/	9.68 mg 10.0 μmol 1 Äq.	/	900 μL 90.0 μmol 9 Äq.	/	kein CP auf AuNP
4	40 mL MeOH	/	9.68 mg 10.0 μmol 1 Äq.	/	900 μL 90.0 μmol 9 Äq.	/	kein CP auf AuNP
5	40 mL MeOH	/	9.68 mg 10.0 μmol 1 Äq.	/	900 μL 90.0 μmol 9 Äq.	1 min	0 - 6 % CP auf AuNP 232,234
6	40 mL MeOH	/	/	10.5 mg 10.0 μmol 1 Äq.	900 μL 90.0 μmol 9 Äq.	1 min	Kein CP auf AuNP
7	40 mL MeOH	/	9.68 mg 10.0 μmol 1 Äq.	/	900 μL 90.0 μmol 9 Äq.	1 h	0 - 4 % CP auf AuNP
8	40 mL MeOH	/	19.4 mg 20.0 μmol 2 Äq.	/	800 μL 80.0 μmol 8 Äq.	1 min	kein CP auf AuNP

Experimentaltteil

Eintrag	MeOH / DMF	Additiv	L _{CPC6}	L _{CPC12}	L _{TEG}	Zeit zw. CPC und L _{TEG} Zugabe	Ergebnis
9	40 mL MeOH	/	/	21.0 mg 20.0 μmol 1 Äq.	800 μL 80.0 μmol 8 Äq.	1 min	kein CP auf AuNP
10	40 mL MeOH	/	48.4 mg 50.0 μmol	/	/	/	kein CP auf AuNP
11	20 mL DMF	/	9.68 mg 10.0 μmol 1 Äq.	/	900 μL 90.0 μmol 9 Äq.	1 min	kein CP auf AuNP
12	40 mL MeOH	Natrium- 4-toluol- sulfonat 1.94 mg 10.0 μmol 1 Äq.	9.68 mg 10.0 μmol 1 Äq.	/	900 μL 90.0 μmol 9 Äq.	1 min	kein CP auf AuNP
13	40 mL MeOH	/	9.68 mg 10.0 μmol 1 Äq.	/	900 μL 90.0 μmol 9 Äq.	3 d	0 - 3 % CP auf AuNP
14	40 mL MeOH	Zitronen- säure 0.1 M 10 mL	9.68 mg 10.0 μmol 1 Äq.	/	900 μL 90.0 μmol 9 Äq.	1 min	kein CP auf AuNP



Zweistufige Funktionalisierung von Goldnanopartikeln

Allgemeine Vorgehensweise

Dialysierte AuNP_{Cit} Stammlösung (20 mL) wurde zunächst mit Methanol (20 mL) versetzt. Anschließend wurde zeitgleich eine Stammlösung von **48** in Methanol (100 µL, 10.0 µmol, 0.1 M, 1 Äq.) und eine L_{TEG}-Stammlösung in Methanol (900 µL, 90.0 µmol, 0.1 M, 9 Äq.) zugegeben und die resultierende Mischung 24 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in wenig Wasser/MeOH (1:2, (v/v)) aufgenommen und mittels Größenausschlusschromatographie [Sephadex® LH-20, H₂O/MeOH, 1:2, (v/v)] vorgereinigt. Die AuNP Fraktion wurde in Membranfilter überführt, zentrifugiert (3000 rpm, 10 °C) und mit einem Wasser/Methanol-Gemisch (1:1 (v/v), 3 x 10 mL) gewaschen.

Das so erhaltene Zwischenprodukt wurde in Wasser/Acetonitril (800 µL, 1:1, (v/v)) aufgenommen und diese Lösung mit einer Lösung von sulfo-NHS (3.26 mg, 15.0 µmol, 1.5 Äq.) und EDC · HCl (2.88 mg, 15.0 µmol, 1.5 Äq.) in Wasser (200 µL) versetzt. Anschließend wurde eine mit 0.1 M NaOH auf pH 8 eingestellte Lösung eines Amins (0.5 Äq. bezogen auf **48**) in Wasser/Acetonitril (400 µL, 1:1, (v/v)) zugegeben. Das Amin wurde zuvor nach der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe entschützt. Der pH-Wert der so erhaltenen Reaktionsmischung wurde ebenfalls mit 0.1 M NaOH-Lösung auf pH = 8 eingestellt

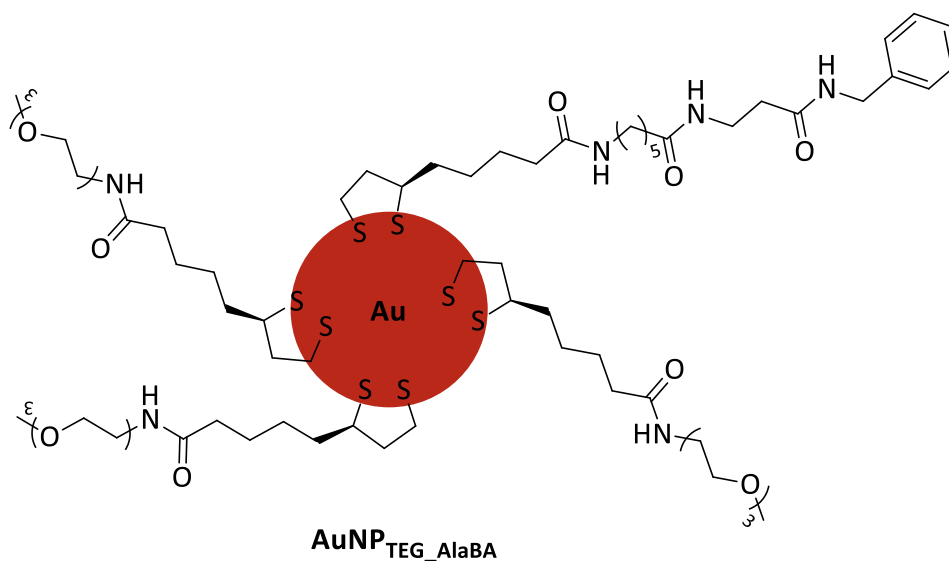
und die Lösung 19 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mittels Größenausschlusschromatographie [Sephadex® LH-20, H₂O/MeOH, 1:2, (v/v)] aufgereinigt und die so erhaltene AuNP-Produktlösung unter vermindertem Druck vom restlichen Lösungsmittel befreit. Für die weiteren Untersuchungen wurden die erhaltenen Nanopartikel in entsprechenden Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen wieder aufgenommen.

AuNP_{TEG}_AlaBA

Die verwendeten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Synthese wurde über viermal wiederholt, jeweils mit demselben Ergebnis.

Tabelle 11: Zusammenfassung der für die Darstellung von AuNP_{TEG}_AlaBA verwendeten Reaktionsbedingungen

Eintrag	48	L _{TEG}	AlaBA	Ergebnis	Ausbeute
				L _{TEG} /AlaBA = 1/2 mit	
1	100 µL 10.0 µmol 1 Äq.	900 µL 90.0 µmol 9 Äq.	1.26 mg 5.0 µmol 0.5 Äq.	32 ± 1 % AlaBA auf AuNP	2.68 – 2.94 mg

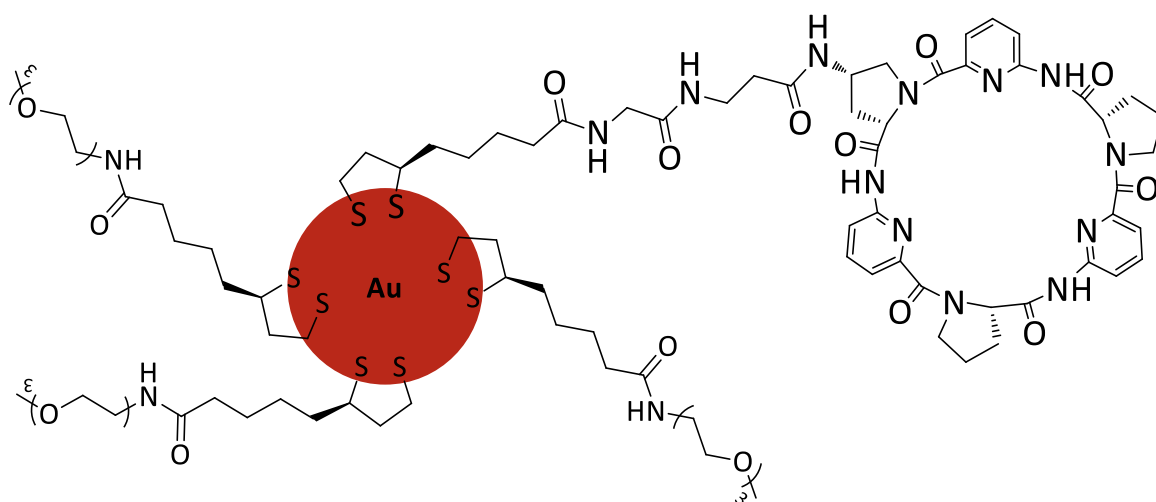


AuNP_{TEG}-AlaCP

Die verwendeten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Synthese wurde über viermal wiederholt, jeweils mit demselben Ergebnis.

Tabelle 12: Zusammenfassung der für die Darstellung von AuNP_{TEG}-AlaCP verwendeten Reaktionsbedingungen

Eintrag	48	L _{TEG}	AlaCP	Ergebnis	Ausbeute
1	100 µL	900 µL	4.05 mg	L _{TEG} /AlaCP = 1/2	2.67 – 2.74 mg
	10.0 µmol	90.0 µmol	5.00 µmol	mit	
	1 Äq.	9 Äq.	0.5 Äq.	32 ± 1 % AlaCP auf AuNP	



AuNP_{TEG}-AlaCP

4.6 Analytische Messungen

4.6.1 ITC-Titrations Projekt A

Alle ITC Messungen wurden in Acetonitril/Wasser (HPLC grade) 2:1 (v/v) durchgeführt. Die Rezeptoren und Gäste wurden mit Hilfe einer analytischen Präzisionswaage eingewogen und in definierten Volumina des Lösungsmittelgemischs gelöst. Alle in derselben ITC-Messung verwendeten Lösungen wurden aus demselben Lösungsmittelgemisch hergestellt. Die Konzentrationen der Rezeptoren und Gäste sind in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Konzentrationen der Rezeptoren und Gäste in den ITC Messungen

Rezeptor	Gast	c(Rezeptor) / mM	c(Gast) / mM
BCP E	NaI	0.35	7.0
	Na ₂ SO ₄	0.10	2.0
BCP F	Na ₂ SO ₄	0.25	5.0

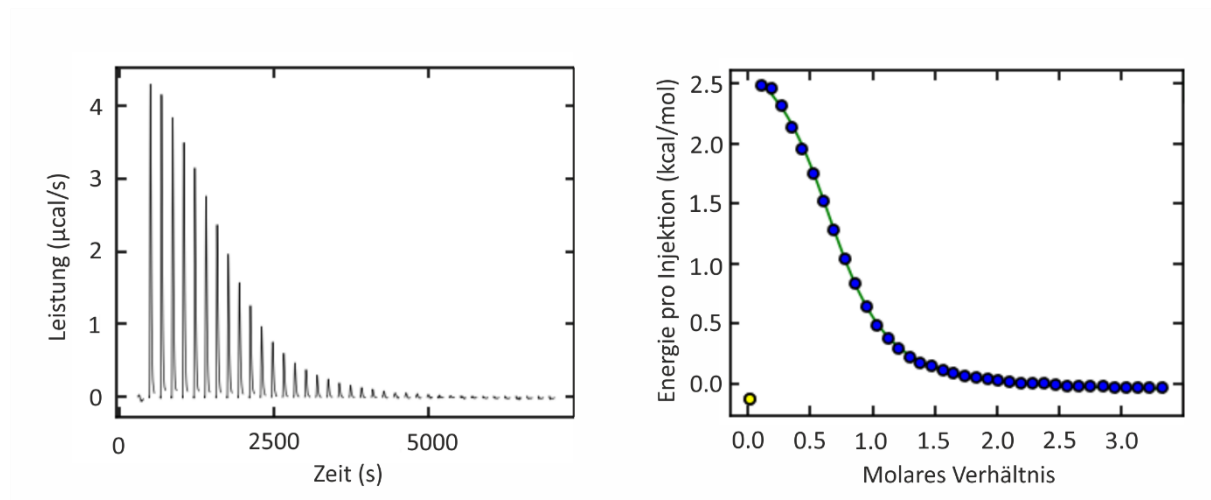
Eine ITC-Messung bestand in der Zugabe einer Lösung des Gastes zu einer Lösung des Rezeptors bei 25 °C, wobei die Zugabemenge der ersten Injektion 2 µL betrug. Anschließend wurden 38 mal 6 µL in einem zeitlichen Abstand von 180 s injiziert.

Die Bindungskonstanten und thermodynamischen Parameter wurden unter Verwendung des mathematischen Modells einer 1:1 Komplexbildung berechnet. Zur Auswertung der erhaltenen Messdaten wurden zunächst die Rohthermogramme mit Hilfe von NITPIC^[123] analysiert und anschließend mit Hilfe von Sedphat^[124,125] eine nicht-lineare Regression der Bindungsisotherme durchgeführt. Die Messpunkte der ersten Injektionen wurden jeweils vor der Auswertung verworfen.

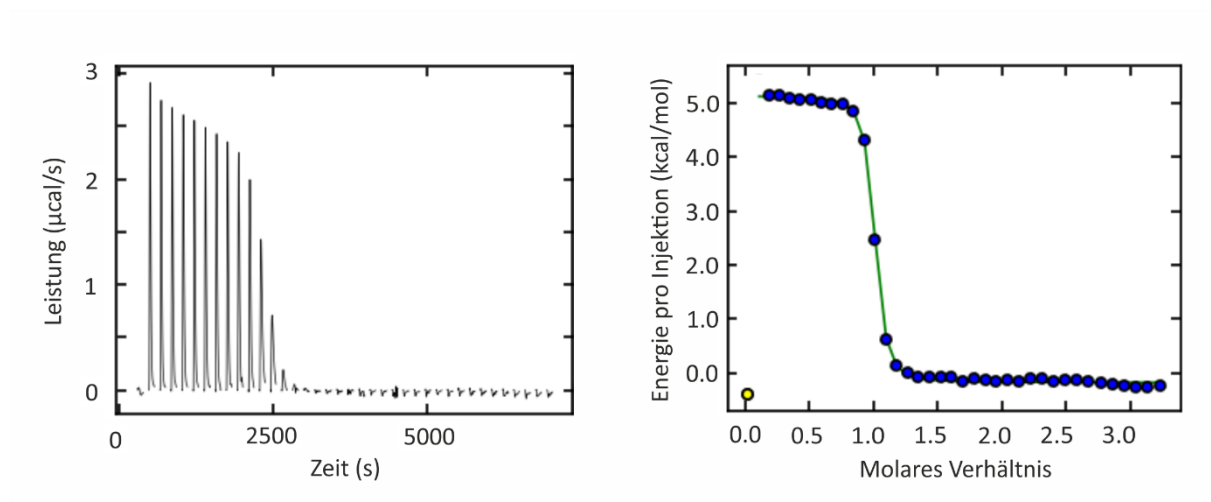
Jede ITC-Messung wurde unabhängig voneinander dreimal durchgeführt. Die erhaltenen Bindungskonstanten, Stöchiometriefaktoren und entsprechenden Energien sind Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Für jede Rezeptor-Gast-Kombination sind nachfolgend exemplarisch ein Thermogramm und die dazugehörige Bindungsisotherme abgebildet (Abbildung 90).

Experimentaltteil

ITC-Titration von **BCP E** mit NaI



ITC-Titration von **BCP E** mit Na_2SO_4



ITC-Titration von **BCP F** mit Na_2SO_4

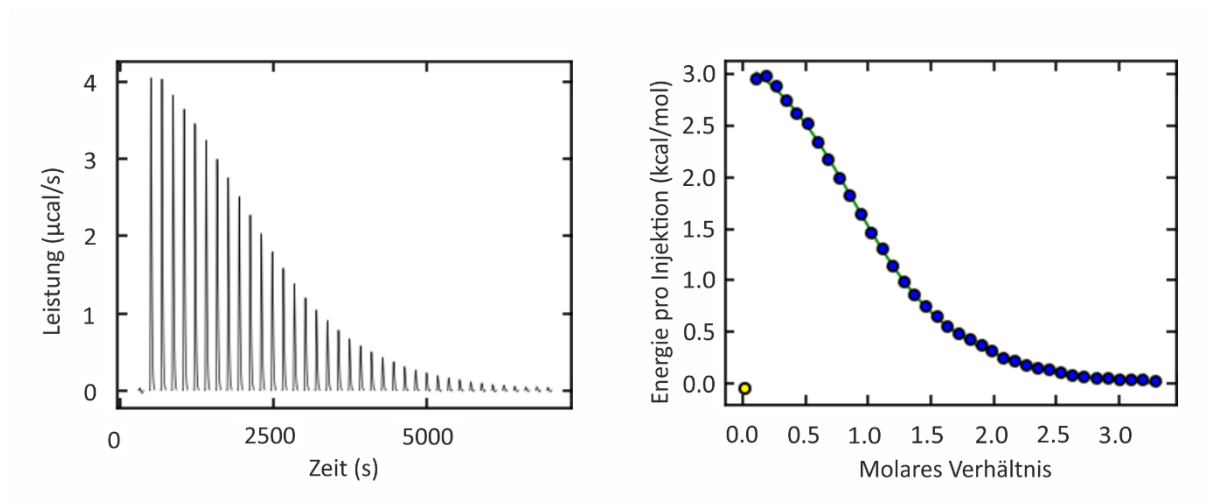


Abbildung 90: Ausgewählte Thermogramme und Bindungsisothermen der ITC-Titrationsen mit **BCP E** oder **BCP F**

4.6.2 NMR-Titration Projekt A

Die Spektren der ^1H NMR Titration wurden an dem Gerät Bruker Avance™ III 400 bei 25 °C, 400 MHz mit 256 Scans aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden kommerziell erhältlich Acetonitril- d_3 und D_2O verwendet. **BCP E** und Natriumiodid wurden mittels einer analytischen Präzisionswaage eingewogen und in definierten Volumina eines 67 Vol.-% MeCN- d_3 / D_2O Gemisches gelöst. Die so erhaltene Stammlösung von **BCP E** hatte eine Konzentration von 1.25 mM und die von Natriumiodid 25 mM. Beide Lösungen wurden aus demselben Lösungsmittelgemisch hergestellt. Für die Titration wurden insgesamt 11 NMR Röhren verwendet und mit jeweils 200 μL der Rezeptorstammlösung befüllt. Anschließend wurden die Röhren mit einer steigenden Menge an Gaststammlösung (0 – 200 μL , in 20 μL Schritten) versetzt. Die resultierenden Proben wurden mit dem reinem Lösungsmittelgemisch jeweils auf ein Volumen von 500 μL aufgefüllt. Die resultierenden Zusammensetzungen der einzelnen Proben sind in Tabelle 14 zusammengefasst:

Tabelle 14: Zusammensetzungen der für die NMR-Titration von BCP F mit NaI verwendeten Lösungen

Probe	V(BCP F- Stammlösung) μL	V(NaI- Stammlösung) μL	V(Lösungs- mittelgemisch) μL	Äqu. NaI
1	200	0	300	0
2	200	20	280	2
3	200	40	260	4
4	200	60	240	6
5	200	80	220	8
6	200	100	200	10
7	200	120	180	12
8	200	140	160	14
9	200	160	140	16
10	200	180	120	18
11	200	200	100	20

Experimentaltteil

Die Proben wurden sorgfältig gemischt und im Anschluss ^1H -NMR-spektroskopisch vermessen. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurden die chemischen Verschiebungen der Aminoprolin- $\text{C}_\alpha\text{-H}$ und der Aminoprolin- $\text{C}_\gamma\text{-H}$ -Signale verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Auf Basis dieser Werte wurde die Bindungskonstante des Komplexes mit Hilfe des Programms Bindfit^[130] ermittelt, wobei die Bildung eines 1:1 Komplexes angenommen wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 91 gezeigt.

Tabelle 15: Benötigte Rezeptor- und Gastkonzentrationen sowie chemische Verschiebungen der beobachteten Protonen zur Auswertung mit Bindfit

Probe	c(BCP F) M	c(NaI) M	$\delta(\text{Apro-C}_\alpha)$ ppm	$\delta(\text{Apro-C}_\gamma)$ ppm
1	0.0005	0	5.7787	4.3739
2	0.0005	0.001	6.1828	4.2611
3	0.0005	0.002	6.3864	4.2047
4	0.0005	0.003	6.4957	4.1752
5	0.0005	0.004	6.5477	4.1617
6	0.0005	0.005	6.5842	4.1528
7	0.0005	0.006	6.6110	4.1463
8	0.0005	0.007	6.6281	4.1434
9	0.0005	0.008	6.6432	4.1418
10	0.0005	0.009	6.6507	4.1409
11	0.0005	0.010	6.6589	4.1398

Experimentaltteil

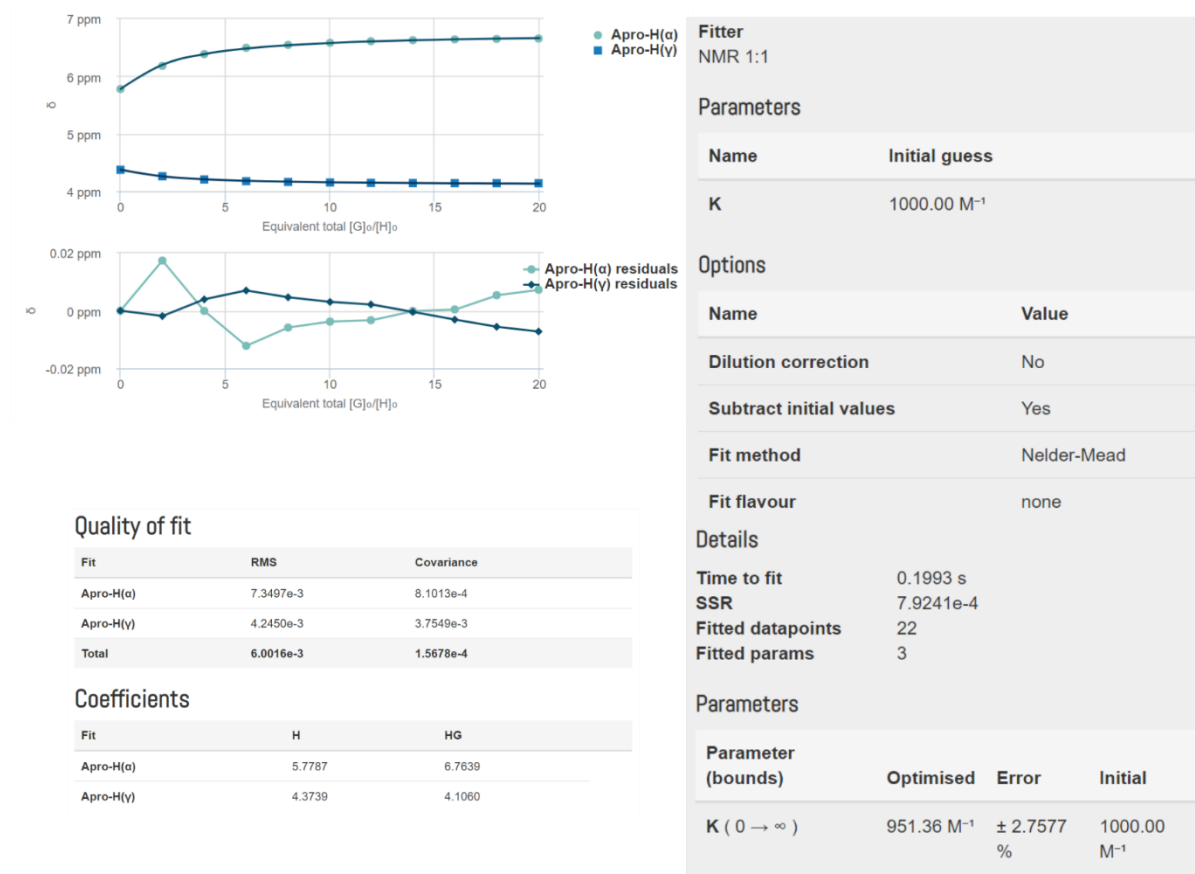


Abbildung 91: Mit Bindfit generiertes Ergebnis der NMR-Titration von BCP F mit NaI

4.6.3 EXSY-NMR Projekt A

Die 2D-¹H-¹H-EXSY-Spektren wurden an einem Bruker Avance™ III 600 Spektrometer bei 600 MHz und 25 °C aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden kommerziell erhältliches Acetonitril-*d*₃ und D₂O verwendet. **BCP E** und Natriumsulfat wurden mit Hilfe einer analytischen Präzisionswaage eingewogen. Eine Lösung von **BCP E** (1 mM) in 67 Vol.-% MeCN-*d*₃/D₂O wurde mit Natriumsulfatstammlösung (0.5 Äq.) versetzt, gut durchmischt und anschließend NMR-spektroskopisch vermessen. Die 2D-¹H-¹H-EXSY-Spektren wurden unter Verwendung einer NOESY Pulsfolge bei einer Mischzeit $\tau_m = 0$ ms gemessen, um das Referenzspektrum zu erhalten. Weitere Messungen wurden bei Mischzeiten von $\tau_m = 30$ ms, 60 ms, 90 ms, 150 ms, 250 ms und 500 ms durchgeführt, um die optimale Mischzeit zu bestimmen. Die Magnetisierungsgeschwindigkeitskonstanten wurden aus den Volumina der Kreuz- und Diagonalsignale der Aminoprolin-H α -Signale, normalisiert auf die Volumina der Diagonalsignale der Referenzmessung bei einer Mischzeit von $\tau_m = 250$ ms mit Hilfe des Programms EXSYCalc^[68] berechnet. Die jeweiligen Volumina sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Peakvolumina der zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten genutzten Kreuz- und Diagonalsignale

Referenzmessung bei 0 ms		Messung bei 250 ms	
A₀	72434949.75	A	36704286.00
B₀	60949723.75	B	25793732.25
		A-B	25640556.75
		B-A	24897347.00

Der mit diesen Werten erhaltene Output von EXSYCalc ist in Abbildung 92 dargestellt.

Experimentaltteil

The screenshot shows the EXSYCalc software window. At the top, it displays 'Number of sites' set to 2 and 'EXSY spectrum at mixing time = 0.25 s'. To the right, there are 'About' and 'Help' buttons. Below this, there are two tables. The first table shows peak volumes for sites A and B at two different mixing times. The second table shows diagonal peak volumes for sites A and B at a mixing time of 0 s. Below the tables, there is an 'EXCHANGE RATE MATRIX' section with a 2x2 matrix of values. To the right of the matrix are 'Calculate' and 'Close' buttons. At the bottom, there is a 'Powered by' section with the Mestrelab Research logo and text.

Number of sites: 2

EXSY spectrum at mixing time = 0.25 s

	A	B
A	36704286.00	24897347.00
B	25640556.75	25793732.25

Reference EXSY spectrum
Mixing time = 0 s

	Diagonal peak
A	72434949.75
B	60949723.75

EXCHANGE RATE MATRIX

-4.814 5.126
4.188 -5.832

Calculate

Close

Powered by

M MESTRELAB RESEARCH
NMR Solutions

Abbildung 92: Output von EXSYCalc bei Eingabe der in Tabelle 16 enthaltenen Peakvolumina

4.6.4 Visuelle qualitative Bindungsstudien Projekt B

Die qualitativen Bindungsstudien wurden in Wasser (HPLC grade) durchgeführt. Die Goldnanopartikel und Salze wurden mit Hilfe einer analytischen Präzisionswaage eingewogen und in Wasser gelöst, sodass eine Goldnanopartikelstammlösung mit einer Konzentration von 0.5 mg/mL resultierte und Salzlösungen der Konzentration 0.1 M erhalten wurden. Folgende Salze wurden verwendet: NaCl, NaBr, NaI, Na₂SO₄, Na₂CO₃, Na₂HPO₄, Na₂HAsO₄, Na₄P₂O₇, NaNO₃.

Zehn Probengläser wurden mit jeweils 100 µL der Nanopartikelstammlösung und mit weiteren 100 µL Wasser befüllt. Eine Lösung diente als Blindprobe und wurde entsprechend nicht mit einer Salzlösung versetzt. Jede der weiteren Proben diente zur Überprüfung der Reaktion von **AuNP**_{TEG-AlaCP} auf ein bestimmtes Anion. Hierfür wurden die Proben mit 1 µL der betreffenden Salzlösung versetzt. Die zugegebene Menge wurde in 1 µL Schritten auf insgesamt 5 µL erhöht. Zu diesem Zeitpunkt begann sich die Lösung, die Na₂SO₄ enthielt, zu trüben. Die Proben wurden entsprechend stehen gelassen und nach 5 bzw. 30 min fotografiert. Diese Messung wurde insgesamt dreimal wiederholt, jedes Mal mit demselben Ergebnis.

Drei analoge Messreihen wurden ebenfalls mit **AuNP**_{TEG-AlaBA} durchgeführt.

4.6.5 Konkurrenzexperiment Projekt B

Das visuelle Konkurrenzexperiment wurde in Wasser (HPLC grade) durchgeführt. Die Goldnanopartikel und Salze wurden mit Hilfe einer analytischen Präzisionswaage eingewogen und in Wasser gelöst, sodass eine Goldnanopartikelstammlösung von **AuNP**_{TEG-AlaCP} mit einer Konzentration von 0.5 mg/mL resultierte, die Na₂SO₄-Stammlösung eine Konzentration von 0.1 M besaß und die Stammlösungen von NaCl und Na₂HPO₄ jeweils eine Konzentration von 1.0 M.

Drei Probengläser wurden mit jeweils 100 µL der Nanopartikelstammlösung und mit 100 µL Wasser befüllt. Eine Probe wurde mit weiteren 15 µL Wasser versetzt und diente als Blindprobe. Die zweite Probe wurde mit 5 µL NaCl-Stammlösung, 5 µL Na₂HPO₄-Stammlösung und 5 µL Wasser versetzt. Die dritte Probe wurde mit 5 µL NaCl-Stammlösung, 5 µL Na₂HPO₄-Stammlösung und 5 µL Na₂SO₄-Stammlösung versetzt. Das Endvolumen aller Proben betrug somit 215 µL. Die drei Lösungen wurden 5 min nach Salzzugabe fotografiert.

4.6.6 UV/VIS Messungen Projekt B

Die Goldnanopartikel und Na_2SO_4 wurden mit Hilfe einer analytischen Präzisionswaage eingewogen und in Wasser gelöst, sodass eine **AuNP_{TEG_AlaCP}** Stammlösung mit einer Konzentration von 0.5 mg/mL und eine Na_2SO_4 -Lösung mit einer Konzentration von 0.1 M erhalten wurden. Als Referenz diente eine mit Wasser befüllte Küvette.

Für die Messungen wurden insgesamt 11 Proben mit jeweils 500 μL der Goldnanopartikelstammlösung angesetzt. Zu diesen Proben wurden steigende Mengen der Na_2SO_4 Stammlösung (0 – 125 μL) gegeben und die Proben jeweils mit Wasser auf ein Volumen von 1.00 mL aufgefüllt. Entsprechend betrug die Goldnanopartikelkonzentration in jeder Probe 0.25 mg/mL. Die Zusammensetzungen der einzelnen Proben sind in Tabelle 17 angegeben:

Tabelle 17: Zusammensetzungen der für die UV/VIS Messungen von **AuNP_{TEG_AlaCP}** verwendeten Proben

Probe	V(AuNP _{TEG_AlaCP} - Stammlösung) μL	V(Na_2SO_4 - Stammlösung) μL	c(Na_2SO_4) mM	V(Wasser) μL
1	500	0	0	500
2	500	5	0.5	495
3	500	10	1.0	490
4	500	15	1.5	485
5	500	20	2.0	480
6	500	25	2.5	475
7	500	37.5	3.75	462.5
8	500	50	5.0	450
9	500	75	7.5	425
10	500	100	10.0	400
11	500	125	12.5	375

Experimentalteil

Jede Probe wurde sorgfältig durchmischt und jeweils exakt fünf Minuten nach Salzzugabe vermessen.

4.6.7 TEM-Messungen Projekt B

Die Goldnanopartikel **AuNP**_{TEG_AlaCP} und Na₂SO₄ wurden mit Hilfe einer analytischen Präzisionswaage eingewogen und in Wasser (HPLC grade) gelöst, sodass eine **AuNP**_{TEG_AlaCP}-Stammlösung mit einer Konzentration von 0.25 mg/mL und eine Na₂SO₄-Stammlösung mit einer Konzentration von 0.1 M erhalten wurden.

In einem Probengefäß wurden 200 µL der Nanopartikelstammlösung mit 5 µL der Na₂SO₄-Stammlösung versetzt. Von dieser Mischung wurden nach 5 und 30 min TEM-Aufnahmen durchgeführt. Dazu wurde ein Tropfen der wässrigen Nanopartikellösung auf einen Kohlelochfilm (Plano S147-4) aufgebracht, dieser an Luft getrocknet und vermessen.

5 Literatur

- [1] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985.
- [2] a) P. Ehrlich, J. Morgenroth, *Berliner klinische Wochenschrift* **1900**, 37, 453; b) J. N. Langley, *Proc. Royal Soc. B* **1906**, 78, 170.
- [3] D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1958**, 44, 98.
- [4] D. E. Koshland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 33, 2375.
- [5] C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 7017.
- [6] C. H. Park, H. E. Simmons, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 2431.
- [7] a) B. Dietrich, J. M. Lehn, J. P. Sauvage, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 10, 2885; b) B. Dietrich, J. M. Lehn, J. P. Sauvage, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 10, 2889.
- [8] J.-M. Lehn in *Structure and Bonding*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **1973**, S. 1–69.
- [9] J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 91; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 89–112.
- [10] J. M. Lehn, *Science (New York, N.Y.)* **1993**, 260, 1762.
- [11] F. J. Millero, R. Feistel, D. G. Wright, T. J. McDougall, *Deep Sea Res. Part I* **2008**, 55, 50.
- [12] J. L. Sessler, P. A. Gale, W.-S. Cho, *Anion Receptor Chemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2006**.
- [13] S. M. Rowe, S. Miller, E. J. Sorscher, *N. Engl. J. Med.* **2005**, 352, 1992.
- [14] V. H. Smith, D. W. Schindler, *Trends Ecol. Evol.* **2009**, 24, 201.
- [15] K. Yoshihara in *Topics in Current Chemistry, Vol. 176* (Hrsg.: K. Yoshihara, R. Alberto), Springer, Berlin, **1996**, S. 17–35.
- [16] P. K. Dasgupta, J. V. Dyke, A. B. Kirk, W. A. Jackson, *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 6608.
- [17] P.L. Smedley, D.G. Kinniburgh, *Appl. Geochem.* **2002**, 17, 517.
- [18] S. G. Chang, D. Littlejohn, K. Y. Hu, *Science* **1987**, 237, 756.
- [19] B. A. Moyer, R. Custelcean, B. P. Hay, J. L. Sessler, K. Bowman-James, V. W. Day, S.-O. Kang, *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 3473.
- [20] N. H. Evans, P. D. Beer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 11716.
- [21] a) J. W. Pflugrath, F. A. Quioco, *Nature* **1985**, 314, 257; b) J. W. Pflugrath, F. A. Quioco, *J. Mol. Biol.* **1988**, 200, 163.

- [22] B. L. Jacobson, F. A. Quioco, *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 783.
- [23] J. J. He, F. A. Quioco, *Science* **1991**, *251*, 1479.
- [24] a) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 486; b) K. Choi, A. D. Hamilton, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 101; c) E. A. Katayev, Y. A. Ustynyuk, J. L. Sessler, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3004; d) P. A. Gale, E. Alcalde, *Anion Recognition in Supramolecular Chemistry*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2010**; e) P. A. Gale, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 82; f) I. Ravikumar, P. Ghosh, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3077; g) J. Cai, J. L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6198; h) L. Chen, S. N. Berry, X. Wu, E. N.W. Howe, P. A. Gale, *Chem* **2020**, *6*, 61; i) S. Kubik, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3648; j) S. Kubik, C. Reyheller, S. Stüwe, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2005**, *52*, 137; k) G. V. Oshovsky, D. N. Reinhoudt, W. Verboom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2366.
- [25] a) E. Graf, J. M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 6403; b) E. A. Kataev, C. Müller, G. V. Kolesnikov, V. N. Khrustalev, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 2747; c) H. Zhou, Y. Zhao, G. Gao, S. Li, J. Lan, J. You, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14908; d) S. J. Butler, K. A. Jolliffe, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3471.
- [26] a) A. Brugnara, F. Topić, K. Rissanen, A. d. La Lande, B. Colasson, O. Reinaud, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3897; b) S. J. Butler, B. K. McMahon, R. Pal, D. Parker, J. W. Walton, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 9511; c) H. T. Ngo, X. Liu, K. A. Jolliffe, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4928; d) K. K. Y. Yuen, K. A. Jolliffe, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4824.
- [27] M. J. Langton, C. J. Serpell, P. D. Beer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1974.
- [28] a) L. Qin, A. Hartley, P. Turner, R. B. P. Elmes, K. A. Jolliffe, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 4563; b) C. Jia, Q.-Q. Wang, R. A. Begum, V. W. Day, K. Bowman-James, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6953; c) V. J. Dungan, H. T. Ngo, P. G. Young, K. A. Jolliffe, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 264; d) T. A. Shumilova, T. Ruffer, H. Lang, E. A. Kataev, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 1500.
- [29] T. Fiehn, R. Goddard, R. W. Seidel, S. Kubik, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7241.
- [30] C. Reyheller, B. P. Hay, S. Kubik, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 2095.
- [31] a) P. Metrangolo, F. Meyer, T. Pilati, G. Resnati, G. Terraneo, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6206; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6114–6127; b) A. Priimagi, G. Cavallo, P. Metrangolo, G. Resnati, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2686; c) A. Borissov, I. Marques, J. Y. C. Lim, V. Félix, M. D. Smith, P. D. Beer, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4119; d) B. R.

- Mullaney, A. L. Thompson, P. D. Beer, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11642; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11458–11462.
- [32] a) H.-B. Liu, Q. Zhang, M.-X. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 6536; b) Y.-Z. Liu, K. Yuan, L. Liu, Z. Yuan, Y.-C. Zhu, *J. Phys. Chem. A* **2017**, *121*, 892.
- [33] L. Qin, J. R. Wright, J. D. E. Lane, S. N. Berry, R. B. P. Elmes, K. A. Jolliffe, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 12312.
- [34] T. Fiala, K. Sleziakova, K. Marsalek, K. Salvadori, V. Sindelar, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 1903.
- [35] K. A. Sharp, J. M. Vanderkooi, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 231.
- [36] a) F. Biedermann, W. M. Nau, H.-J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11158; b) S. Kubik (Hrsg.) *Supramolecular Chemistry in Water*, Wiley-VCH, Weinheim, **2019**.
- [37] M. B. Hillyer, B. C. Gibb, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2016**, *67*, 307.
- [38] D. B. Smithrud, E. M. Sanford, I. Chao, S. B. Ferguson, D. R. Carcanague, J. D. Evanseck, K. N. Houk, F. Diederich, *Pure Appl. Chem.* **1990**, *62*, 2227.
- [39] K. I. Assaf, M. S. Ural, F. Pan, T. Georgiev, S. Simova, K. Rissanen, D. Gabel, W. M. Nau, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 6956.
- [40] a) K. I. Assaf, W. M. Nau, *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 14164; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 13968–13981; b) K. I. Assaf, W. M. Nau, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 13968; *Angew. Chem.*, **2018**, *130*, 14164–14177.
- [41] S. Kubik, R. Goddard, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2722; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2648–2651.
- [42] S. Kubik, R. Goddard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5127.
- [43] S. Kubik, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12752.
- [44] B. P. Hay, T. K. Firman, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 5502.
- [45] J. D. Dunitz, *Chemistry & Biology* **1995**, *2*, 709.
- [46] Z. Rodriguez-Docampo, E. Eugenieva-Ilieva, C. Reyheller, A. M. Belenguer, S. Kubik, S. Otto, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9798.
- [47] E. Eugenieva-Ilieva, *Dissertation*, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, **2013**.
- [48] A. Schaly, *Dissertation*, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, **2013**.
- [49] N. Dales, J. Fonarev, J. Fu, Z. Zhang, WO 2010/112520 A1, **2010**.
- [50] M. Tamaki, G. Han, V. J. Hruby, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3593.

- [51] B. P. Gangamani, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 15017.
- [52] M. A. K. Zouatom, *Bachelorarbeit*, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, **2017**.
- [53] S. Otto, S. Kubik, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7804.
- [54] a) H.-J. Choi, D. Bühring, M. L. C. Quan, C. B. Knobler, D. J. Cram, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, *113*, 1733; b) S. O. Kang, V. W. Day, K. Bowman-James, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2677; c) W. Kiggen, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 712; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1984**, *23*, 714–715.
- [55] S. I. Knospe, *Bachelorarbeit*, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, **2019**.
- [56] J. A. Dean, N. A. Lange, *Lange's Handbook of Chemistry*, 15. Aufl., McGraw-Hill, New York, NY, **1999**.
- [57] S. Kubik, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2870.
- [58] Y. Marcus, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3880.
- [59] Y. Marcus, *Ion Properties*, Dekker, New York, **1997**.
- [60] F. Sommer, Y. Marcus, S. Kubik, *ACS Omega* **2017**, *2*, 3669.
- [61] A. Schaly, R. Belda, E. García-España, S. Kubik, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 6238.
- [62] J. G. Speight, N. A. Lange, *Lange's Handbook of Chemistry*, 16. Aufl., McGraw-Hill, New York, **2005**.
- [63] a) M. Lisbjerg, B. E. Nielsen, B. O. Milhøj, S. P. A. Sauer, M. Pittelkow, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 369; b) V. Havel, V. Sindelar, *ChemPlusChem* **2015**, *80*, 1601.
- [64] a) E. Freire, O. L. Mayorga, M. Straume, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 950A-959A; b) C. A. Brautigam, H. Zhao, C. Vargas, S. Keller, P. Schuck, *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 882.
- [65] C. A. Schalley, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [66] P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305.
- [67] Y. Marcus, *J. Chem. Thermodyn.* **2007**, *39*, 1338.
- [68] EXSYCalc. <https://mestrelab.com/software/freeware/>, Zugriff am 07.08.2020, Mestrelab.
- [69] a) C. L. Perrin, T. J. Dwyer, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 935; b) H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung*, 3. Aufl., Wiley-VCH-Verl.,

- Weinheim, **1999**; c) S. Macura, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1980**, *41*, 95; d) Zolnai, Juranic, Vikić-Topic, Macura, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, *40*, 611.
- [70] a) M. Yamanaka, A. Shivanyuk, J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2939; b) L. C. Palmer, A. Shivanyuk, M. Yamanaka, J. Rebek, *Chem. Commun.* **2005**, 857.
- [71] J. Nakazawa, Y. Sakae, M. Aida, Y. Naruta, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9448.
- [72] D. J. Cram, M. E. Tanner, C. B. Knobler, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7717.
- [73] M. D. Pluth, K. N. Raymond, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 161.
- [74] F. Sommer, S. Kubik, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8851.
- [75] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293.
- [76] a) A. Laguna, *Modern Supramolecular Gold Chemistry*, Wiley-VCH, Hoboken, **2009**; b) S. D. Brown, P. Nativo, J.-A. Smith, D. Stirling, P. R. Edwards, B. Venugopal, D. J. Flint, J. A. Plumb, D. Graham, N. J. Wheate, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4678; c) L. Dykman, N. Khlebtsov, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2256; d) B. I. Ipe, K. Yoosaf, K. G. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1907; e) R. Sardar, A. M. Funston, P. Mulvaney, R. W. Murray, *Langmuir* **2009**, *25*, 13840; f) A. N. Shipway, E. Katz, I. Willner, *ChemPhysChem* **2000**, *1*, 18; g) T. Stuchinskaya, M. Moreno, M. J. Cook, D. R. Edwards, D. A. Russell, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 822; h) G. Peng, U. Tisch, O. Adams, M. Hakim, N. Shehada, Y. Y. Broza, S. Billan, R. Abdah-Bortnyak, A. Kuten, H. Haick, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 669; i) D. Huang, F. Liao, S. Molesa, D. Redinger, V. Subramanian, *J. Electrochem. Soc.* **2003**, *150*, G412; j) Y.-C. Yeh, B. Creran, V. M. Rotello, *Nanoscale* **2012**, *4*, 1871.
- [77] Z. Wang, L. Ma, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1607.
- [78] V. Amendola, R. Pilot, M. Frasconi, O. M. Maragò, M. A. Iati, *J. Phys. Condens. Matter* **2017**, *29*, 203002.
- [79] H. Kang, J. T. Buchman, R. S. Rodriguez, H. L. Ring, J. He, K. C. Bantz, C. L. Haynes, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 664.
- [80] M. Faraday, *Phil. Trans. R. Soc.* **1857**, *147*, 145.
- [81] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.
- [82] G. Frens, *Nat. Phys.* **1973**, *241*, 20.
- [83] P. Zhao, N. Li, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 638.
- [84] I. Ojea-Jiménez, N. G. Bastús, V. Puentes, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 15752.
- [85] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, *0*, 801.

- [86] 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.
- [87] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, C. Kiely, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1655.
- [88] A. F. G. Leontowich, C. F. Calver, M. Dasog, R. W. J. Scott, *Langmuir* **2010**, *26*, 1285.
- [89] W. W. Weare, S. M. Reed, M. G. Warner, J. E. Hutchison, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12890.
- [90] F. Manea, C. Bindoli, S. Polizzi, L. Lay, P. Scrimin, *Langmuir* **2008**, *24*, 4120.
- [91] a) Á. I. López-Lorente, M. L. Soriano, M. Valcárcel, *Microchim. Acta* **2014**, *181*, 1789; b) P. Nowak, V. Saggiomo, F. Salehian, M. Colomb-Delsuc, Y. Han, S. Otto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4192; c) M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1993**, *9*, 3408; d) D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3280.
- [92] M. Busby, C. Chiorboli, F. Scandola, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 6020.
- [93] a) M. J. Hostetler, A. C. Templeton, R. W. Murray, *Langmuir* **1999**, *15*, 3782; b) J. Bresee, K. E. Maier, C. Melander, D. L. Feldheim, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7516.
- [94] A. François, A. Laroche, N. Pinaud, L. Salmon, J. Ruiz, J. Robert, D. Astruc, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2003.
- [95] D. Bartczak, A. G. Kanaras, *Langmuir* **2011**, *27*, 10119.
- [96] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, V. M. Rotello, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2739.
- [97] C. Wang, C. Yu, *Rev. Anal. Chem* **2013**, *32*, 1.
- [98] R. A. Sperling, P. Rivera Gil, F. Zhang, M. Zanella, W. J. Parak, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1896.
- [99] D. J. Maxwell, J. R. Taylor, S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9606.
- [100] A. Labande, J. Ruiz, D. Astruc, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1782.
- [101] a) A. Campion, P. Kambhampati, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 241; b) J. T. Krug, G. D. Wang, S. R. Emory, S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9208; c) Nie, Emory, *Science* **1997**, *275*, 1102.
- [102] S. S. R. Dasary, A. K. Singh, D. Senapati, H. Yu, P. C. Ray, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13806.
- [103] Y. Kim, R. C. Johnson, J. T. Hupp, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 165.
- [104] P. A. Gale, J. L. Sessler, V. Král, V. Lynch, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5140.

- [105] A. Aydogan, G. Lee, C.-H. Lee, J. L. Sessler, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 2368.
- [106] M. H. Kim, S. Kim, H. H. Jang, S. Yi, S. H. Seo, M. S. Han, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4712.
- [107] W. L. Daniel, M. S. Han, J.-S. Lee, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6362.
- [108] J. Massue, S. J. Quinn, T. Gunnlaugsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6900.
- [109] a) S. Watanabe, H. Seguchi, K. Yoshida, K. Kifune, T. Tadaki, H. Shiozaki, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8827; b) T. Minami, K. Kaneko, T. Nagasaki, Y. Kubo, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 432.
- [110] Y. Kubo, S. Uchida, Y. Kemmochi, T. Okubo, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4369.
- [111] a) K. B. Sebby, E. Mansfield, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 2913; b) R. L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, C. A. Mirkin, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 289; c) Z. Li, R. Jin, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1558; d) J. A. Dougan, C. Karlsson, W. E. Smith, D. Graham, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3668; e) G. Zhang, Z. Yang, W. Lu, R. Zhang, Q. Huang, M. Tian, L. Li, D. Liang, C. Li, *Biomaterials* **2009**, *30*, 1928; f) K. M. Joly, G. Mirri, Y. Willener, S. L. Horswell, C. J. Moody, J. H. R. Tucker, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2395; g) S.-Y. Lin, Y.-T. Tsai, C.-C. Chen, C.-M. Lin, C.-h. Chen, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2134; h) J. Sharma, R. Chhabra, C. S. Andersen, K. V. Gothelf, H. Yan, Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7820; i) V. Dixit, J. van den Bossche, D. M. Sherman, D. H. Thompson, R. P. Andres, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 603; j) C. Mangeney, F. Ferrage, I. Aujard, V. Marchi-Artzner, L. Jullien, O. Ouari, E. D. Rékaï, A. Laschewsky, I. Vikholm, J. W. Sadowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5811; k) B. C. Mei, K. Susumu, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, T. J. Mountziaris, H. Mattoussi, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4949; l) E. Oh, J. B. Delehanty, C. A. Klug, K. Susumu, W. Russ Algar, R. Goswami, I. L. Medintz, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 1956; m) M. H. Stewart, K. Susumu, B. C. Mei, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9804.
- [112] a) R. H. Terrill, T. A. Postlethwaite, C.-h. Chen, C.-D. Poon, A. Terzis, A. Chen, J. E. Hutchison, M. R. Clark, G. Wignall, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12537; b) B. Zhang, B. Yan, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 973.
- [113] M. Nilam, M. Ahmed, M. A. Alnajjar, A. Hennig, *Analyst* **2019**, *144*, 579.
- [114] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103.

- [115] D.-H. Tsai, M. Davila-Morris, F. W. DelRio, S. Guha, M. R. Zachariah, V. A. Hackley, *Langmuir* **2011**, *27*, 9302.
- [116] a) R. P. Briñas, M. Maetani, J. J. Barchi, *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *392*, 415; b) V. Chechik, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7780; c) J. Comenge, *ScienceOpen Res.* **2015**; d) R. L. Donkers, Y. Song, R. W. Murray, *Langmuir* **2004**, *20*, 4703; e) M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, R. Baxter, G. Teobaldi, F. Zerbetto, *Langmuir* **2003**, *19*, 5172; f) R. S. Ingram, M. J. Hostetler, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9175; g) A. M. Smith, L. E. Marbella, K. A. Johnston, M. J. Hartmann, S. E. Crawford, L. M. Kozycz, D. S. Seferos, J. E. Millstone, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2771; h) M. Zheng, X. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12047.
- [117] S. Roux, B. Garcia, J.-L. Bridot, M. Salomé, C. Marquette, L. Lemelle, P. Gillet, L. Blum, P. Perriat, O. Tillement, *Langmuir* **2005**, *21*, 2526.
- [118] S. Kubik, R. Goddard, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2648.
- [119] "Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. Trinkwasserverordnung (TrinkwV)", zu finden unter http://www.gesetze-im-internet.de/trinkwv_2001/BJNR095910001.html#BJNR095910001BJNG000201310, **2016**.
- [120] R. Custelcean, F. V. Sloop, A. Rajbanshi, S. Wan, B. A. Moyer, *Cryst. Growth Des.* **2015**, *15*, 517.
- [121] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kokschi, J. Dervede, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472.
- [122] C. A. Hunter, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7488.
- [123] S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C. A. Brautigam, P. Schuck, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5066.
- [124] P. Schuck, *Sedphat*.
<http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedphat/download.htm>, Zugriff am 07.08.2020.
- [125] J. C. D. Houtman, P. H. Brown, B. Bowden, H. Yamaguchi, E. Appella, L. E. Samelson, P. Schuck, *Protein Sci.* **2007**, *16*, 30.
- [126] Wayne Rasband, *ImageJ*. <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>, Zugriff am 07.08.2020, National Institutes of Health.

Literatur

- [127] T. Yvernault, G. Yvernault, J.C. Bollinger, *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. C* **1978**, 519.
- [128] J. Coste, E. Frerot, P. Jouin, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2437.
- [129] C. Rentier, G. Pacini, F. Nuti, E. Peroni, P. Rovero, A. M. Papini, *J. Pept. Sci.* **2015**, 21, 408.
- [130] *Bindfit*. <http://app.supramolecular.org/bindfit/>, Zugriff am 07.08.2020.

6 Anhang

6.1 Massenspektren Projekt A

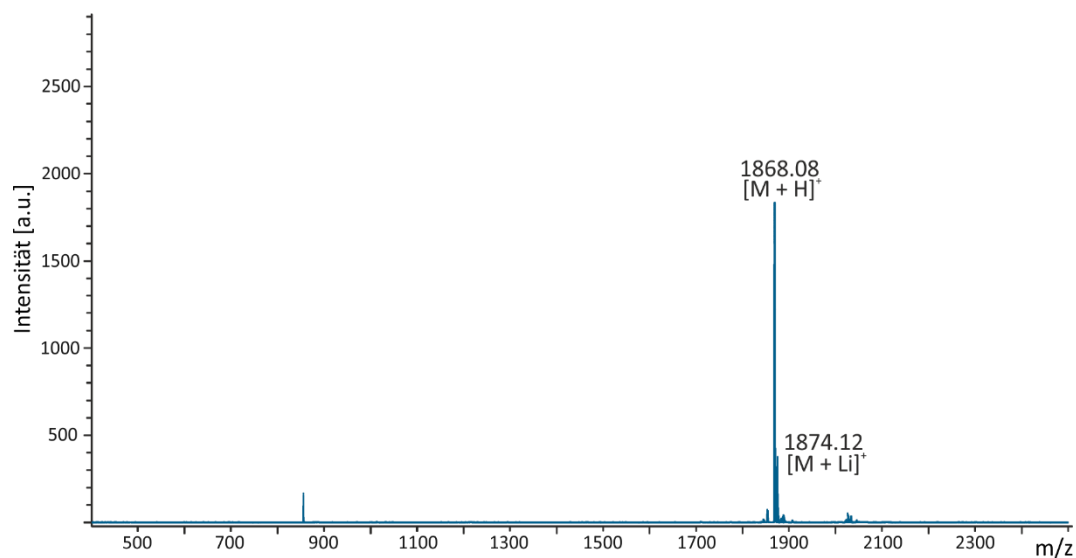


Abbildung 93: MALDI-TOF Massenspektrum der Umsetzung von **21** mit Aktivester **28** zur Darstellung von **BCP B**

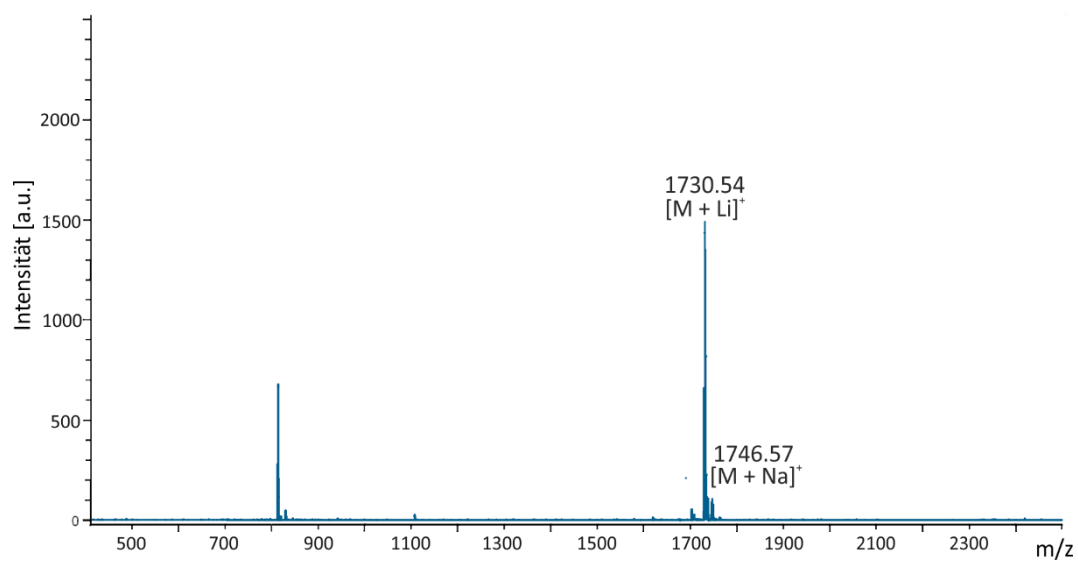


Abbildung 94: MALDI-TOF Massenspektrum der Umsetzung von **21** mit Aktivester **29** zur Darstellung von **BCP C**

Anhang

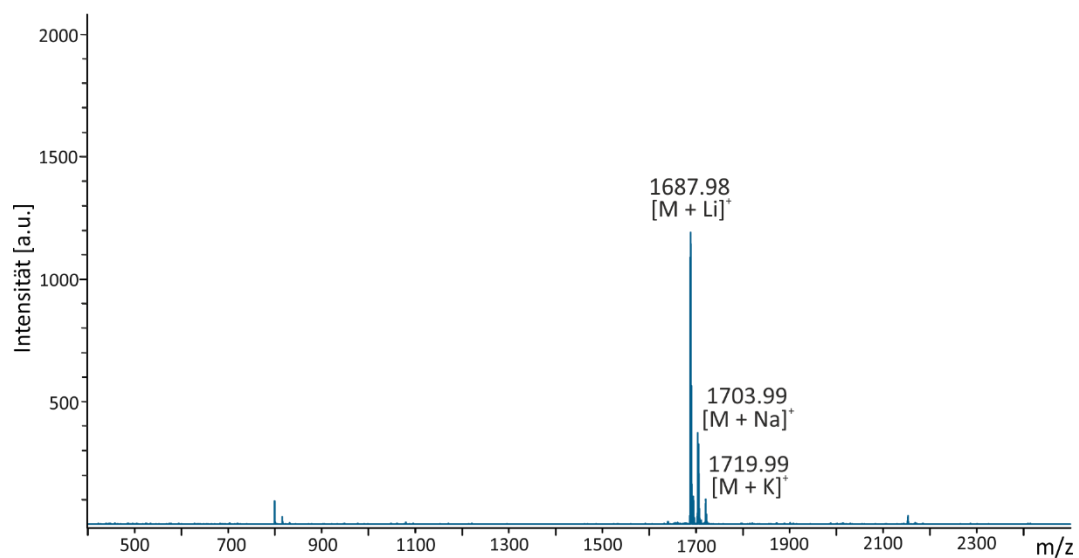


Abbildung 95: MALDI-TOF Massenspektrum der Umsetzung von **21** mit Aktivester **30** zur Darstellung von **BCP D**

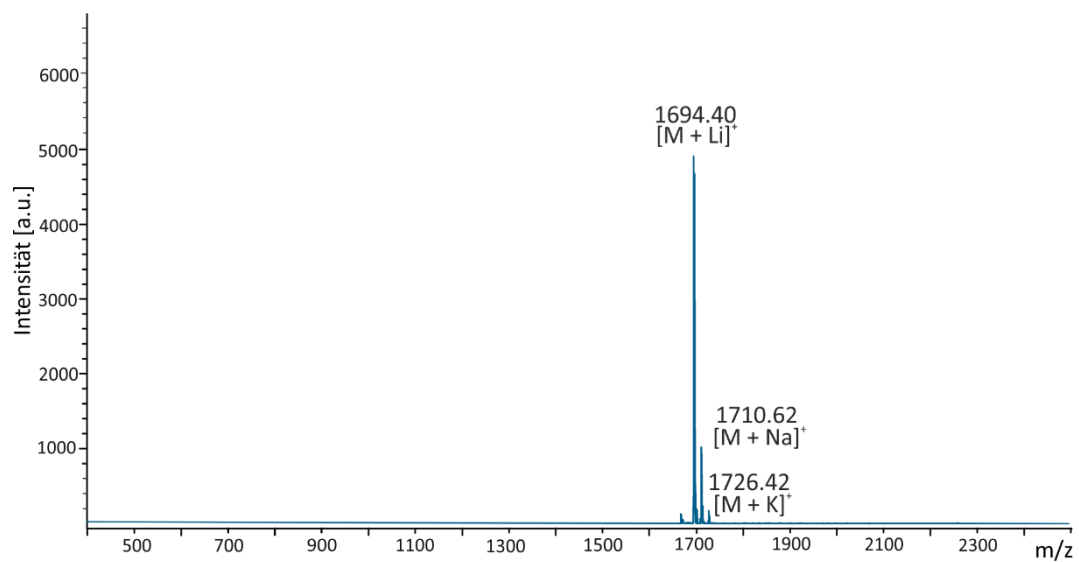


Abbildung 96: MALDI-TOF Massenspektrum der Umsetzung von **21** mit Aktivester **31** zur Darstellung von **BCP E**

Anhang

Tabelle 18: Zuordnung der m/z -Verhältnisse der in den MALDI-TOF-Massenspektren der einzelnen Testreaktionen zur Darstellung der BCPs beobachteten, intensivitätsstärksten Signale

Produkt	M	m/z			
	[g/mol]	H ⁺	Li ⁺	Na ⁺	K ⁺
BCP A	1867.89	/	1874.21	1890.22	/
BCP B	1867.89	1868.08	1874.12	/	/
BCP C	1723.76	/	1730.54	1746.57	/
BCP D	1680.64	/	1687.98	1703.99	1719.99
BCP E	1687.60	/	1694.40	1710.62	1726.42

6.2 HPLC Chromatogramme Projekt A

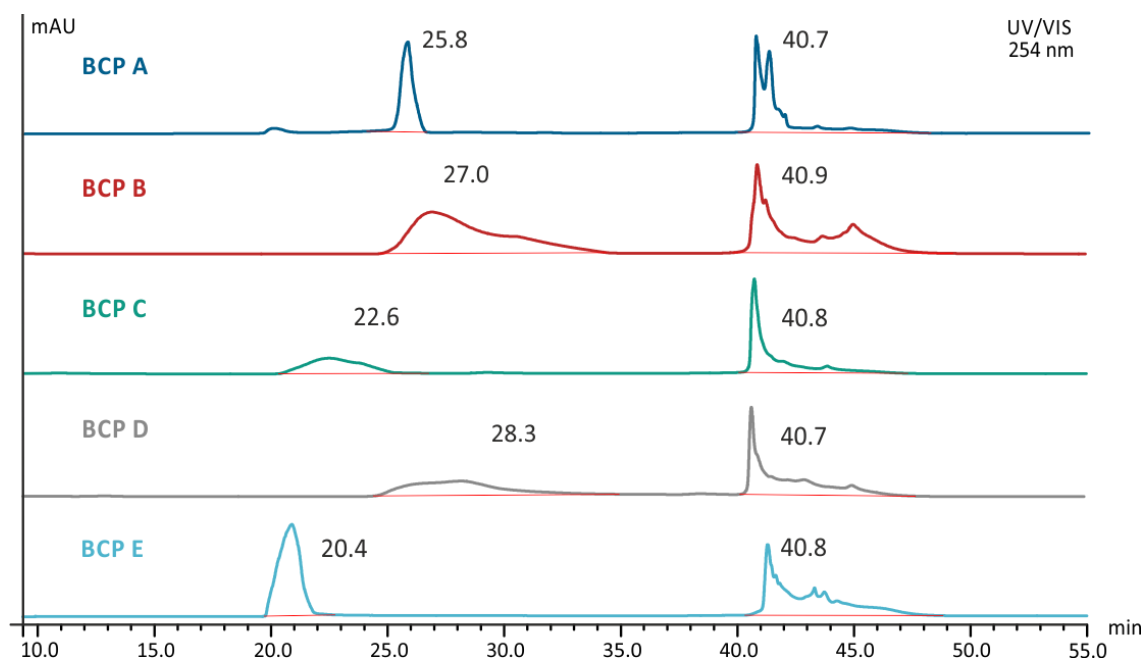


Abbildung 97: HPLC-Chromatogramme der Reaktionsmischungen, die bei den Umsetzungen von **21** mit den Linkern **27 – 31** erhalten wurden

6.3 DFT-Rechnungen Projekt A

Tabelle 19: Kartesische Koordinaten der mittels DFT-Rechnung (B3LYP/6-31G*) erhaltenen Struktur des Sulfatkomplexes von BCP A in Angström

Atom	x	y	z
C	0,56052	3,68179	4,94969
C	1,71796	4,03544	5,64315
C	2,9701	3,71204	5,11829
C	3,02254	3,01279	3,90555
N	1,90762	2,64347	3,23679
N	1,35467	-2,98202	3,22897
C	2,25859	-2,10844	3,72109
C	2,94669	-2,34016	4,92597
C	2,68183	-3,52127	5,61895
C	1,12293	-4,13349	3,89796
C	1,76901	-4,44189	5,10201
N	-3,24727	0,32131	3,23702
C	-4,12927	1,09903	3,90357
C	-4,71648	0,69838	5,11065
C	-4,37221	-0,54922	5,63312
C	-3,48164	-1,37084	4,94227
C	-2,93987	-0,89546	3,73434
N	3,34963	0,64158	-3,13002
C	4,07407	1,54017	-3,82923
C	4,65425	1,23352	-5,06656
C	4,46791	-0,05109	-5,58064
C	3,74256	-0,99913	-4,85803
C	3,19588	-0,60979	-3,61967
N	-2,24305	2,58499	-3,10297
C	-1,0845	3,07634	-3,59879
C	-1,02708	3,74655	-4,83641
C	-2,21498	3,90468	-5,55119

Anhang

C	-3,38754	2,7672	-3,79452
C	-3,41844	3,42556	-5,0303
N	-1,13037	-3,22196	-3,11894
C	-0,71715	-4,29872	-3,81967
C	-1,27447	-4,6454	-5,05692
C	-2,29227	-3,83875	-5,5695
C	-2,74807	-2,73655	-4,84523
C	-2,13637	-2,46075	-3,6068
C	7,67409	-3,76518	-0,08613
C	8,72818	-3,24708	0,67977
C	10,0013	-3,82192	0,5524
C	10,20595	-4,8987	-0,31626
C	7,8642	-4,84152	-0,96388
C	9,14322	-5,40856	-1,06878
O	2,98529	-3,51317	-3,73811
C	2,36753	-2,82389	-2,87946
N	2,44493	-1,46282	-2,79151
O	5,4291	3,47924	-3,62581
C	4,39584	2,87627	-3,22053
N	3,6434	3,40609	-2,21132
O	1,52819	4,35779	-3,71988
C	1,24886	3,46973	-2,86714
N	0,03471	2,84935	-2,77832
O	-5,74124	2,98197	-3,57085
C	-4,70245	2,38064	-3,1775
N	-4,78156	1,45766	-2,17381
O	-5,72874	2,84125	3,70242
C	-4,62791	2,3773	3,28848
N	-3,96357	2,9973	2,27069
O	-2,88806	-3,74126	3,48876
C	-2,0824	-3,01551	2,8397
N	-2,04095	-1,6556	2,95405
O	0,40331	-6,38758	3,7062

Anhang

C	0,25786	-5,20263	3,28992
N	-0,61476	-4,93727	2,27527
O	4,69411	-0,6349	3,47097
C	3,6608	-0,30305	2,82339
N	2,46468	-0,9509	2,93882
O	5,33146	3,52661	3,70829
C	4,37879	2,80901	3,28895
N	4,58332	1,9326	2,26328
O	-1,7987	4,35364	3,51036
C	-1,5674	3,30229	2,8483
N	-0,40712	2,59067	2,95348
C	-1,31912	-6,09678	1,67036
C	-2,40578	-5,48692	0,76199
C	-3,53968	4,83158	0,77051
C	2,26915	3,0583	-1,78873
C	2,09633	3,91065	-0,50208
C	2,94376	5,18255	-0,75099
C	4,12017	4,67687	-1,6091
C	-2,52356	3,69024	0,52559
C	3,71988	0,82513	1,78463
C	1,50936	-3,49672	-1,79138
C	2,34613	-3,77024	-0,51174
C	3,01806	-5,14255	-0,76322
N	4,30584	-5,01728	-1,45878
C	1,97901	-5,90994	-1,60404
C	5,93764	1,91283	1,65269
C	-1,13849	-3,63368	1,79967
C	-1,9191	-4,0378	0,51879
C	-3,79337	0,43517	-1,76602
C	-4,4447	-0,15899	-0,48692
C	-5,96976	-0,05356	-0,73232
C	-6,11742	1,235	-1,56448
C	-4,61867	4,18247	1,65982

Anhang

C	4,46188	0,35668	0,50255
C	5,95866	0,66664	0,74501
C	-2,5704	2,80269	1,79981
N	6,66967	-0,45937	1,36197
C	5,44447	-5,59864	-0,97658
C	6,70824	-5,35858	-1,80463
O	5,47366	-6,2774	0,07765
C	7,88991	-0,87356	0,91419
C	8,47813	-2,0899	1,63413
O	8,49642	-0,32875	-0,04011
O	-4,54657	-0,828	-3,71683
C	-3,63987	-0,63985	-2,85871
N	-2,4981	-1,38545	-2,77615
O	0,2767	-6,44534	-3,61362
C	0,27691	-5,24804	-3,21146
N	1,11685	-4,86126	-2,20608
C	0,70043	2,98326	3,73676
H	2,00017	-0,9979	-1,97385
H	-0,14039	2,22747	-1,96238
H	-1,36902	-1,10792	2,38899
H	1,65295	-0,64358	2,37531
H	-0,26762	1,74019	2,38114
H	-1,87047	-1,23373	-1,96021
H	-0,42263	3,95032	5,30452
H	1,63991	4,57351	6,58228
H	3,89715	4,00852	5,58961
H	3,67458	-1,62417	5,27532
H	3,19761	-3,72573	6,55154
H	1,56709	-5,39418	5,57305
H	-5,44074	1,35024	5,57971
H	-4,80477	-0,8899	6,5682
H	-3,22345	-2,35736	5,29542
H	5,24991	1,98418	-5,56778

Anhang

H	4,89877	-0,32373	-6,53875
H	3,60802	-2,01147	-5,20678
H	-0,08461	4,13532	-5,1902
H	-2,19932	4,41586	-6,50849
H	-4,36915	3,56932	-5,52524
H	-0,92473	-5,5368	-5,55953
H	-2,74488	-4,07352	-6,52762
H	-3,55691	-2,11218	-5,19243
H	6,68649	-3,32188	0,00624
H	10,82954	-3,4228	1,13106
H	11,19408	-5,3411	-0,40647
H	9,30355	-6,25003	-1,73736
H	-0,59998	-6,70112	1,10451
H	-1,74041	-6,73262	2,452
H	-2,49255	-6,0457	-0,1715
H	-3,97092	5,19663	-0,16325
H	2,18096	1,99205	-1,58661
H	1,05125	4,13443	-0,28222
H	2,5002	3,35754	0,35133
H	3,29325	5,62657	0,18246
H	5,01402	4,48031	-1,00512
H	4,39995	5,38509	-2,39214
H	-1,51945	4,06104	0,31352
H	-2,83071	3,09117	-0,33534
H	2,71759	1,18122	1,56507
H	0,63323	-2,88462	-1,58309
H	1,67409	-3,83804	0,34915
H	3,0667	-2,97787	-0,30284
H	3,23978	-5,66313	0,16978
H	4,29732	-4,55619	-2,36326
H	2,44053	-6,51557	-2,38709
H	1,36453	-6,57687	-0,98761
H	6,09226	2,83862	1,08552

Anhang

H	6,70227	1,87219	2,43133
H	-0,32674	-2,94646	1,58092
H	-2,73762	-3,35135	0,29661
H	-1,23787	-4,00897	-0,3352
H	-2,8254	0,88803	-1,55743
H	-4,118	-1,18025	-0,28421
H	-4,16471	0,45297	0,37585
H	-6,52874	0,00949	0,20265
H	-6,3819	2,09744	-0,94091
H	-6,87784	1,14481	-2,34321
H	-5,48907	3,85511	1,07841
H	-4,97761	4,85846	2,43871
H	4,09252	0,93169	-0,35026
H	4,28288	-0,69613	0,27858
H	6,48511	0,87251	-0,18858
H	-2,37948	1,75798	1,5726
H	6,25091	-0,84091	2,20709
H	6,49797	-4,66102	-2,62663
H	6,99144	-6,31507	-2,26123
H	7,81646	-2,40928	2,44957
H	9,4272	-1,77889	2,08564
S	0,00239	-0,00188	0,08405
O	-0,38391	1,53436	-0,41082
O	-1,13494	-1,10082	-0,41631
O	1,5221	-0,43415	-0,42177
O	0,00698	-0,00481	1,77363
C	-7,11063	-4,75278	-0,07037
C	-8,13975	-4,3852	-0,94828
C	-9,26816	-5,21289	-1,04922
C	-9,35388	-6,3857	-0,29246
C	-7,18492	-5,92214	0,69967
C	-8,31715	-6,74087	0,57646
N	-3,7369	-5,53462	1,3785

Anhang

N	-6,50676	-1,22771	-1,43296
C	-4,70945	-6,37947	0,92988
C	-6,05514	-6,27765	1,65309
O	-4,54501	-7,17641	-0,02569
C	-7,5936	-1,91091	-0,96464
C	-8,01416	-3,1269	-1,792
O	-8,20832	-1,58782	0,07972
H	-6,23454	-4,11642	0,01875
H	-10,07869	-4,93541	-1,71768
H	-10,22948	-7,02291	-0,37937
H	-8,38253	-7,65571	1,15864
H	-3,85624	-4,98088	2,2236
H	-6,0974	-1,45373	-2,33413
H	-5,99852	-5,54023	2,4641
H	-6,25824	-7,25247	2,11132
H	-7,30423	-3,29268	-2,61348
H	-8,985	-2,8977	-2,24828
C	-0,56466	8,52986	-0,01905
C	0,27829	9,23989	-0,88533
C	0,15443	10,6356	-0,95378
C	-0,80049	11,29881	-0,17657
C	-1,52323	9,18093	0,77032
C	-1,63734	10,57609	0,67972
N	-2,92284	6,00116	1,40772
N	2,18227	6,24059	-1,42809
C	-3,16596	7,27094	0,9723
C	-2,40815	8,37732	1,71043
O	-3,93238	7,53729	0,01466
C	2,13625	7,51731	-0,94289
C	1,28496	8,49914	-1,75038
O	2,73409	7,87598	0,09959
H	-0,47343	7,44905	0,04418
H	0,80798	11,20029	-1,61309

Anhang

H	-0,89251	12,37955	-0,23822
H	-2,38365	11,09237	1,27698
H	-2,38979	5,81814	2,25488
H	1,77116	6,0086	-2,32681
H	-1,80678	7,9524	2,52454
H	-3,15233	9,04071	2,16595
H	0,76839	7,97441	-2,56524
H	1,96584	9,22259	-2,21555

Anhang

Tabelle 20: Kartesische Koordinaten der mittels DFT-Rechnung (B3LYP/6-31G*) erhaltenen Struktur des Sulfatkomplexes von BCP E in Angström

Atom	x	y	z
C	1,941556	-2,92966	4,641632
C	1,347887	-3,96345	5,347964
C	0,224976	-4,59397	4,825462
C	-0,269893	-4,13775	3,608313
N	0,283900	-3,13965	2,937839
N	-2,862380	1,327654	2,937968
C	-2,894084	0,085492	3,416742
C	-3,517458	-0,2117	4,639834
C	-4,119757	0,819512	5,342339
C	-3,453959	2,306527	3,60466
C	-4,102632	2,106719	4,818524
N	2,578633	1,815883	2,936878
C	3,721554	1,838043	3,60482
C	3,871028	2,496747	4,82052
C	2,763623	3,152491	5,345059
C	1,570046	3,147046	4,64128
C	1,517571	2,461856	3,416368
N	-1,895362	-2,78046	-2,92498
C	-1,754496	-3,88465	-3,6307
C	-2,309135	-4,04561	-4,89694
C	-3,035973	-2,97977	-5,41589
C	-3,198723	-1,81899	-4,674
C	-2,601423	-1,75485	-3,40342
N	3,353899	-0,24898	-2,92939
C	2,819376	-1,37396	-3,40687
C	3,173935	-1,85989	-4,67702
C	4,097106	-1,13834	-5,41964
C	4,239218	0,42524	-3,63574
C	4,656435	0,0245	-4,9014
N	-1,463962	3,029762	-2,92354

Anhang

C	-2,491678	3,458526	-3,62864
C	-2,355660	4,016448	-4,89629
C	-1,070055	4,110965	-5,41775
C	0,017609	3,672718	-4,67672
C	-0,223534	3,12663	-3,40433
O	-4,331334	0,584482	-3,5611
C	-3,510307	0,419434	-2,68079
N	-2,669268	-0,66308	-2,54139
O	-1,259940	-6,20831	-3,40339
C	-1,055657	-5,08758	-2,98103
N	-0,279584	-4,85967	-1,85627
O	1,657130	-4,04095	-3,56556
C	1,391314	-3,24835	-2,68385
N	1,908614	-1,97894	-2,54413
O	6,004984	2,014323	-3,40799
C	4,931621	1,632138	-2,9867
N	4,347652	2,188825	-1,86015
O	6,078018	1,565291	3,431377
C	4,994358	1,247818	2,980522
N	4,883714	0,434714	1,872053
O	-0,357823	4,549227	3,127623
C	-0,476376	3,514885	2,497443
N	0,361392	2,423891	2,619387
O	-4,390339	4,486264	3,43329
C	-3,576145	3,704392	2,980916
N	-2,814416	4,015442	1,874056
O	-3,761108	-2,58389	3,128147
C	-2,805947	-2,16828	2,498898
N	-2,281457	-0,89659	2,621069
O	-1,688026	-6,0399	3,438977
C	-1,418836	-4,94417	2,985661
N	-2,067329	-4,44246	1,876531
O	4,120990	-1,95428	3,13404

Anhang

C	3,283627	-1,34067	2,498827
N	1,920561	-1,52704	2,615199
C	-3,030107	5,322908	1,257829
C	-1,793573	5,546678	0,341157
C	5,701419	-1,21405	0,339217
C	0,397210	-3,6164	-1,52999
C	1,143953	-3,95027	-0,21647
C	1,480234	-5,46351	-0,33714
C	0,320669	-6,02667	-1,21299
C	4,182210	-0,96997	0,119685
C	-2,096445	-3,06	1,42554
C	-3,333309	1,463088	-1,52567
C	-3,997059	0,981289	-0,2136
C	-5,475623	1,446446	-0,33599
N	-6,327470	0,430478	-0,93202
C	-5,381704	2,735328	-1,20676
C	-3,089933	-5,28469	1,259555
C	-1,603116	3,348295	1,423478
C	-1,250078	4,107446	0,11947
C	2,933103	2,152013	-1,5322
C	2,849038	2,967101	-0,21956
C	3,991762	4,014884	-0,34039
C	5,058637	3,291892	-1,2167
C	6,124072	-0,02923	1,253951
C	-2,928988	-3,13488	0,12071
C	-3,900755	-4,32812	0,339147
C	3,701188	-0,28299	1,422861
N	-5,152203	-3,91098	0,948178
C	-7,171762	-0,31365	-0,13104
C	-7,869755	-1,50974	-0,87849
O	-7,366008	-0,07333	1,039792
C	-6,270018	-3,73432	0,15959
C	-7,472111	-3,04798	0,909366

Anhang

O	-6,340108	-4,07946	-1,0001
O	2,667079	3,45094	-3,56966
C	2,115202	2,825977	-2,6862
N	0,757145	2,640905	-2,54304
O	-4,749821	4,195328	-3,39727
C	-3,881862	3,456634	-2,97672
N	-4,071676	2,671107	-1,85147
C	1,374835	-2,54389	3,41576
H	-2,026031	-0,7191	-1,7005
H	1,636068	-1,39437	-1,70279
H	0,214437	1,556214	2,056633
H	-1,457321	-0,58901	2,057678
H	1,242249	-0,96401	2,054699
H	0,388185	2,114048	-1,70039
H	2,824639	-2,42837	5,00683
H	1,765576	-4,2815	6,292686
H	-0,256581	-5,42802	5,313352
H	-3,525416	-1,22671	5,006227
H	-4,609308	0,617353	6,284353
H	-4,586508	2,941093	5,303468
H	4,835100	2,498341	5,306497
H	2,831994	3,675195	6,288453
H	0,693988	3,659309	5,008305
H	-2,178806	-4,97657	-5,42613
H	-3,485254	-3,05369	-6,39626
H	-3,768155	-0,97934	-5,04133
H	2,731594	-2,77315	-5,04384
H	4,386760	-1,49161	-6,39915
H	5,396360	0,603579	-5,4316
H	-3,227854	4,367881	-5,425
H	1,028864	3,744393	-5,04605
H	-3,951277	5,321575	0,67344
H	-3,111985	6,103041	2,014343

Anhang

H	-2,076794	6,005181	-0,6038
H	6,238458	-1,19714	-0,60641
H	-0,288716	-2,77936	-1,38218
H	2,026258	-3,33994	-0,0771
H	0,485766	-3,78369	0,628176
H	1,499162	-5,93548	0,64274
H	-0,415036	-6,54226	-0,59473
H	0,691488	-6,73526	-1,95367
H	3,645742	-1,88538	-0,088
H	4,022516	-0,29699	-0,71585
H	-1,109389	-2,6526	1,228736
H	-2,265854	1,638701	-1,37642
H	-3,524937	1,467216	0,632319
H	-3,909384	-0,08837	-0,07558
H	-5,896545	1,662062	0,643685
H	-6,153034	0,155657	-1,88675
H	-6,181260	2,773412	-1,94664
H	-5,457753	3,627807	-0,58463
H	-2,626390	-6,08256	0,677772
H	-3,725971	-5,74469	2,015455
H	-1,744713	2,290164	1,225566
H	-0,189821	4,097592	-0,09112
H	-1,756791	3,634358	-0,71475
H	2,552472	1,139183	-1,38278
H	1,879264	3,426374	-0,08108
H	3,033349	2,314323	0,625839
H	4,391994	4,26705	0,639398
H	5,872926	2,91216	-0,59859
H	5,486917	3,967292	-1,95739
H	6,579969	0,769771	0,667625
H	6,842947	-0,34526	2,009537
H	-2,264450	-3,33445	-0,71292
H	-3,452798	-2,21286	-0,08968

Anhang

H	-4,150322	-4,80394	-0,60644
H	2,854643	0,367158	1,22394
H	-5,091497	-3,4981	1,870995
S	-0,000106	0,000594	-0,03947
O	1,260448	-0,53689	-0,48354
O	-0,164620	1,362487	-0,47965
O	-1,097020	-0,8215	-0,48245
O	0,000734	-0,00155	1,440513
N	-0,805434	6,416177	0,957449
N	3,537120	5,264521	-0,92824
C	-0,081439	7,290092	0,174472
C	1,115951	7,977858	0,931613
O	-0,335809	7,524428	-0,98713
C	3,336900	6,370768	-0,12344
C	2,648300	7,578821	-0,86037
O	3,661500	6,418288	1,041879
H	-0,482791	6,151764	1,880289
H	3,200091	5,254886	-1,87894
N	5,964866	-2,50342	0,955284
N	2,788910	-5,69453	-0,92626
C	6,359938	-3,56655	0,170604
C	6,359882	-4,94698	0,926916
O	6,689194	-3,46248	-0,99063
C	3,850199	-6,06142	-0,12094
C	5,238896	-6,07213	-0,86136
O	3,732669	-6,35273	1,048343
H	5,577510	-2,6513	1,879117
H	2,945954	-5,40356	-1,87904
O	-8,403342	-2,46635	0,015652
H	-7,156356	-1,96019	-1,58046
H	-8,708080	-1,10749	-1,45877
H	-7,081021	-2,3152	1,624506
H	-8,008002	-3,8194	1,472543

Anhang

O	2,082249	8,507919	0,043084
O	6,329323	-6,0488	0,038897
H	5,275759	-5,23436	-1,56937
H	5,313543	-7,00378	-1,43398
H	5,522663	-4,97062	1,635015
H	7,290656	-5,02262	1,499605
H	1,904267	7,193059	-1,56794
H	3,416000	8,112096	-1,43179
H	1,557707	7,260095	1,63533
H	0,717396	8,818865	1,510875
H	-0,910880	4,534721	-6,39932

6.4 Veröffentlichte Publikation zu Projekt A


Anion Binding of a Cyclopeptide-Derived Molecular Cage in Aqueous Solvent Mixtures
Julia Bartl and Stefan Kubik*^[a]

A molecular cage consisting of two cyclic hexapeptides with an alternating sequence of (2*S*,4*S*)-4-aminoproline and 6-aminopicolinic acid subunits, covalently linked *via* three diglycolic acid subunits, interacts with a variety of inorganic anions in acetonitrile/water. In the respective complexes, the anion resides in a cavity between the two cyclopeptide rings where it interacts with six converging NH groups. The cage binds sulfate anions in acetonitrile/water, 2:1 (v/v) with a log K_a of 6.7, ca. 2.5 orders of magnitude stronger than an analogous bis(cyclopeptide) with only one linker whose sulfate affinity log K_a

amounts to 4.3. The preorganization induced by the three linking units is thus beneficial for sulfate binding. In addition, these linkers cause the dissociation of the sulfate complex to have a substantial Gibbs free energy of activation ΔG^\ddagger of 68.9 kJ mol⁻¹ and they also seem to affect anion selectivity as illustrated by the different effects some anions produce on the ¹H NMR spectra of the triply and singly-linked bis(cyclopeptides). Such anion binding cages represent promising scaffolds to mimic natural anion receptors such as the sulfate-binding protein.

Introduction

Proteins often feature binding sites buried deeply into the folded chain that are not only shape-complementary to the substrate, or in the case of enzymes to the transition state of the catalyzed reaction, but also contain functional groups with which the substrate can interact. An excellent model for such systems are foldamers, for instance those developed by Huc,^[1] whose chain surrounds a cavity with a functionalized inner surface. Molecular cages or capsules derived from macrocyclic building blocks can also fully encapsulate the substrate but positioning binding sites inside their cavities is more difficult because the respective functional groups have to be arranged along concave molecular areas. A number of such receptors nevertheless exist.^[2] Prominent examples are the resorcinarene or calixpyrrole-derived capsules described by, respectively, Szumna^[3] and Ballester,^[4] or the temple-type cages described by Davis.^[5] In the area of anion recognition, polyazacryptands, bicyclic poly lactams, or strapped calixpyrroles feature three-dimensional cavities with converging hydrogen bond donors.^[6] In addition, a coordination cage has been developed by the Nitschke group with azaphosphatrane-derived ligands in which

the included anion can interact with converging P–H bonds.^[7] Flood furthermore described a molecular cage featuring triazole units as binding sites that has an exceptional chloride affinity.^[8] Like in protein complexes, substrate affinity and selectivity benefit in all of these receptors from the combined effects of shielding the bound substrate and holding it tight with appropriately positioned functional groups.

Another well preorganized building block for the construction of anion-binding cages with converging binding sites is the cyclic peptide **1** developed in our group, containing alternating L-proline and 6-aminopicolinic acid subunits (Figure 1).^[9] This cyclopeptide arranges the three peptide NH groups within a

[a] Dipl. Chem. J. Bartl, Prof. Dr. S. Kubik
Fachbereich Chemie – Organische Chemie
Technische Universität Kaiserslautern
Erwin-Schrödinger-Straße, 67663 Kaiserslautern (Germany)
E-mail: kubik@chemie.uni-kl.de

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cplu.202000255>

This article is part of a Special Collection on "Supramolecular Chemistry: Young Talents and their Mentors". More articles can be found under [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/toc/10.1002/\(ISSN\)2192-6506.Supramolecular-Chemistry](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/toc/10.1002/(ISSN)2192-6506.Supramolecular-Chemistry).

© 2020 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

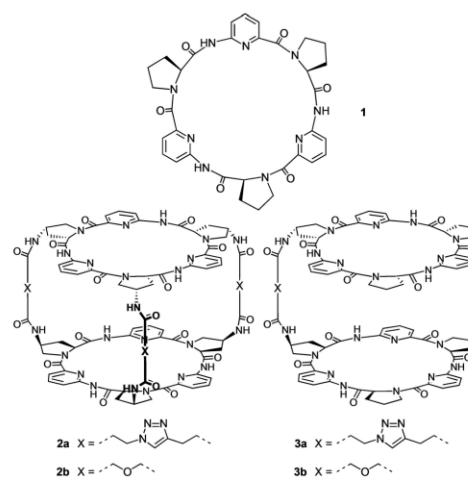


Figure 1. Structures of cyclopeptide **1** and of the triply and singly-linked bis(cyclopeptides) **2a,b** and **3a,b**.

shallow bowl-shaped cavity surrounded by the proline rings. It binds to inorganic anions such as halides and sulfate in aqueous solvent mixtures by forming 2:1 sandwich complexes in which the anion is positioned between the two cyclopeptide rings where it interacts with six converging NH groups. This binding mode represents an ideal basis for the synthesis of anion-binding molecular cages, which can be obtained simply by covalently linking the two rings.

The first version of such a cage was obtained some time ago by coupling a cyclic peptide with peripheral alkyne groups with one containing three azides under the conditions of the copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition.^[10] The properties of the respective bis(cyclopeptide) **2a** turned out to be disappointing, however, with sulfate affinity not being substantially higher than that of the analogous singly-linked analog **3a**. The reason for this unexpected low affinity was the structure of the linking units, which had to adopt energetically unfavorable conformations to allow both cyclopeptide rings to interact with the anion. Since we expected cages with shorter linkers to not have this disadvantage, we sought for strategies to access such compounds. We found in this context that a cyclopeptide triamine can be reacted with the active esters of various dicarboxylic acids to yield triply-linked bis(cyclopeptides) in which all components are connected through amide bonds. The characterization of the anion binding properties of the cage **2b** with diglycolic acid linkers moreover revealed that such cages bind to a number of different anions in the same aqueous solvent mixture that was also used in previous studies. The sulfate affinity of **2b** turned out to be higher than that of any other amide-linked bis(cyclopeptide) prepared so far, albeit not as high as that of bis(cyclopeptides) with disulfide bonds in the linking units.^[11] Calorimetric and EXSY NMR measurements provided information about thermodynamic and kinetic aspects of the complexes formed. The results of these investigations are summarized below.

Results and Discussion

Synthesis

The molecular cage **2a** was prepared previously by covalently linking two trisubstituted cyclopeptide precursors, one with

three alkyne groups and one with three azides, in the presence of a copper(I) catalyst.^[10] Three triazole rings were formed in this synthesis as part of relatively long linkers. Since this strategy offered few possibilities to vary the linker length, the preparation of cages with shorter linkers and hopefully better preorganized cyclopeptide subunits had to be based on a different approach. An obvious one involved the treatment of the cyclopeptide triamine **4** (Scheme 1) with appropriate dicarboxylic acids. The advantage of this strategy is its flexibility with respect to the linkers that can be introduced into the products. A challenge is to correctly form the required six bonds in a single step, but using suitable anions as templates could be helpful in this context.

Our initial attempt to test whether this approach indeed affords triply-linked bis(cyclopeptides) involved treating the free triamine **4** with bis(perfluorophenyl) 2,2'-(1,3-phenylene)diacetate **5c** (Scheme 1). The use of an active ester instead of a coupling reagent was chosen because product purification is easier in our experience when the only byproduct of the coupling reaction is pentafluorophenol. In addition, 2,2'-(1,3-phenylene)diacetic acid was identified in earlier work as the dicarboxylic acid which, among the linkers investigated at that time, induced the highest anion affinity in singly-linked bis(cyclopeptides).^[12] This dicarboxylic acid was therefore particularly attractive for the synthesis of the high-affinity cages targeted here.

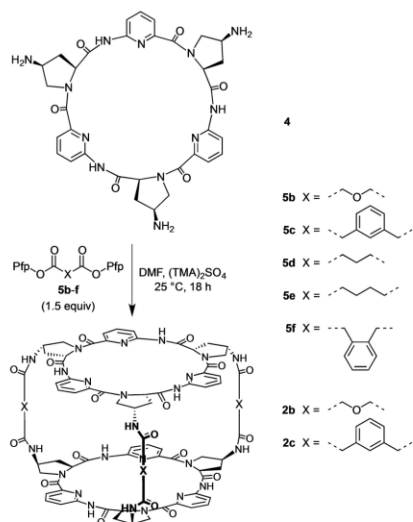
For solubility reasons, the reaction had to be performed in DMF. To assess whether template effects can be operative under these conditions, a qualitative NMR spectroscopic binding study was performed by evaluating the effects of the presence of a salt in DMF-*d*₇ on the ¹H NMR spectrum of the unsubstituted cyclic peptide **1**. This binding study demonstrated that the presence of tetramethylammonium sulfate (TMA)₄SO₄ induced substantial downfield shifts of the cyclopeptide NH signals and the signals of the proline H(α) protons (Figure S1 in the Supporting Information), which are characteristic for the interaction of **1** with anions.^[9,13] The fact that the addition of 0.5 equiv. (TMA)₄SO₄ was sufficient to produce the maximum effect, with an increase of the amount of the salt causing no further change the spectrum, indicated qualitatively that the formation of 2:1 complexes in which two cyclopeptide rings bind to one anion was the preferred binding mode also under these conditions, at least in the presence of strongly



Stefan Kubik: Stefan Kubik is professor of Organic Chemistry at the University of Kaiserslautern. He studied chemistry in Düsseldorf and London and obtained his Ph.D. from Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. He worked as a post-doc at M.I.T. with J. Rebek Jr. and afterward returned to Düsseldorf for his habilitation. He had the position of a substitute professor at Bergische Universität Wuppertal before moving to Kaiserslautern in 2004. His research interests encompass anion recognition in water and the development of scavengers for nerve agents.



Julia Bartl: Julia Bartl studied chemistry at the University of Kaiserslautern. Her diploma degree was awarded with the Steinhöfer Prize of the Department of Chemistry in 2015. She performed her doctoral studies, which were funded through a scholarship of the Carl Zeiss foundation, under the supervision of Stefan Kubik. In her research, she focused on the recognition of anions in aqueous media by supramolecular receptors. She expects to complete her Ph.D. in summer this year.



Scheme 1. General strategy employed for the synthesis of triply-linked bis(cyclopeptides) from the triamine **4** and the bis(pentafluorophenyl) esters **5b–f** (Pfp = pentafluorophenyl, TMA = tetramethylammonium).

coordinating sulfate anions. It thus appeared likely that the presence of a sulfate salt during cage synthesis would have a positive effect on product formation.

The MALDI-TOF mass spectrum of the product mixture (positive mode) obtained when a solution of **5c** in DMF was slowly added to a mixture of **4** and $(\text{TMA})_2\text{SO}_4$ indeed contained only peaks at the m/z ratios of the lithium and sodium adducts of the expected product **2c**, with the lithium ions resulting from the LiOH added prior to the reaction to convert the trihydrochloride of **4** into the free triamine (Figure S2a). The only other products in this reaction were polymeric according to HPLC chromatography, which could apparently not be detected by mass spectrometry. When the same reaction was performed in the absence of $(\text{TMA})_2\text{SO}_4$, a more complex reaction mixture resulted, which according to its mass spectrum contained also substantial amounts of incorrectly formed coupling products (Figure S2b). This experiment thus confirmed that the anionic template played a crucial role in product formation.

After these promising initial results, substantial work was invested in preparing **2c** on a preparative scale. While the coupling reaction itself turned out to work also when it was performed at the mM scale, work-up was extremely difficult and never afforded the product in analytically pure form, neither as the empty cage nor as an anion complex. After many unsuccessful attempts, we therefore considered other dicarboxylic acids as linkers. In this context, the four bis(pentafluorophenyl) esters **5b**, **5d**, **5e**, and **5f** were reacted with **4** in preliminary screening experiments under the conditions used for the attempted synthesis of **2c** and the product mixtures

analyzed by MALDI-TOF MS and HPLC. In all mixtures, the corresponding triply-linked bis(cyclopeptides) could be detected by mass spectrometry (Figure S3), indicating that all of the tested dicarboxylic acids were capable of producing cages. Since the HPLC chromatograms were inconclusive, not allowing to assess which linker afforded the product in the highest yield, we subsequently concentrated on the use of diglycolic acid. The rationale behind this decision was that (i) diglycolic acid was one of the shortest linkers among those tested and (ii) the accessibility of *gauche* conformations in this dicarboxylic acid due to the presence of the central oxygen atom was expected to be beneficial for the formation and the eventual binding properties of the corresponding cage **2b**. Insight into the structure of **2b** was obtained from molecular modeling studies. These studies were based on the reported crystal structure of the iodide complex of **1**,^[13] to which the additional substituents and linking units were attached *in silico*. This structure was then optimized by first using the MMFF force field implemented in Spartan 18 and then by performing a DFT calculation (B3LYP/6-31G^{*}). The result is depicted in Figure 2. This calculation indicated that the three linkers in **2b** can bridge the two cyclopeptide rings without strongly affecting their experimentally found conformations and arrangement in the sandwich complex of **1**. The three linkers are also short enough to prevent major structural changes of the cage that would have a negative impact on preorganization.

The cage **2b** was synthesized by employing the same approach that was used for the synthesis of **2c**. This time, the work-up was unproblematic, just requiring two chromatographic steps to obtain the sodium sulfate complex of **2b** in analytically pure form. This complex was soluble in methanol/water and acetonitrile/water mixtures. Its ¹H NMR spectrum in CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v), depicted in Figure 3a, contained the signal of the proline H(α) protons at 7.16 ppm, significantly upfield from the H(α) signal in the spectra of analogous uncomplexed cyclopeptides, which can normally be found at 5–6 ppm.^[9,13] The high chemical shift of the H(α) signal was a clear indication that the sulfate anion resided inside the cavity of the cage close to the H(α) protons arranged along the inner surface

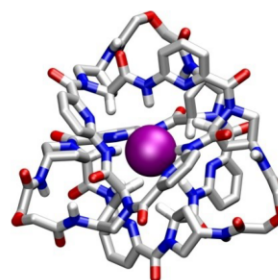


Figure 2. Calculated structure of the iodide complex of **2b**. All but the NH and H(α) protons are omitted for reasons of clarity. The calculations were performed by using the MMFF force field followed by a DFT optimization (B3LYP/6-31G^{*}) of the obtained structure by using Spartan 18 (Wavefunction, Inc.).

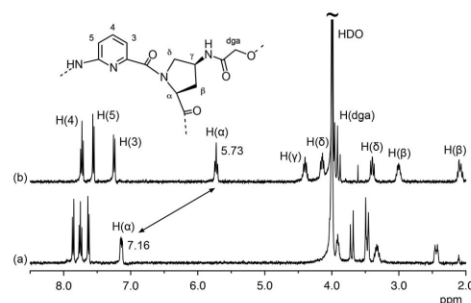


Figure 3. Sections of the ^1H NMR spectra between 8.5 and 2.0 ppm of the sulfate complex (a) and of the anion-free form of **2b** (b) in $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2:1 (v/v). The peak assignment is shown in the inset. Note that the chemical shift of the H(α) signal differs in $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2:1 (v/v) and $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$, 1:1 (v/v).

of the cavity (Figure 2). This interpretation was supported by the ESI MS spectrum, which showed a single peak with an m/z ratio and isotope pattern consistent with the expected doubly negatively charged complex between **2b** and a sulfate anion (Figure S4).

While we could perform qualitative binding studies with the initially isolated sulfate complex (*vide infra*), the quantification of anion affinity required the isolation of **2b** in its uncomplexed form. Preliminary experiments showed that although the sulfate anion could be removed by the addition of various barium salts to a solution of **2b** in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$, 1:1 (v/v), the anions of these salts typically ended up bound to the cage. We therefore had to find a barium salt whose counterion showed no propensity to interact with **2b**. The choice eventually fell on barium triflimide since we expected the large hydrophobic triflimide anion to be an unsuitable guest. The ^1H NMR spectrum of a solution of the sulfate complex of **2b** in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$, 1:1 (v/v) indeed changed substantially upon the addition of 1.1 equiv. of barium triflimide, exhibiting the proline H(α) signal now at 6.18 ppm (Figure S5), which is close to the typical chemical shift of these protons in uncomplexed cyclopeptides. The shifts of the aromatic bis(cyclopeptide) signals were also consistent with decomplexation. No signals in the ESI MS spectrum of this mixture were detected that could be assigned to triflimide adducts, supporting the assumption that these anions did not bind to the empty cage (Figure S6). Based on these results, the decomplexation of the sulfate complex of **2b** was performed on a larger scale by adding a solution of barium triflimide in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 4:1 (v/v) to a solution of the sulfate complex of **2b** in the same solvent. After work-up and chromatographic purification, anion-free **2b** could thus be isolated in analytically pure form and in amounts sufficient for the quantification of anion affinity. The ^1H NMR spectrum of uncomplexed **2b** is depicted in Figure 3b to illustrate the difference to the NMR spectrum of the sulfate complex.

Qualitative Binding Studies

A characteristic feature of our anion-binding cyclopeptides is that they not only bind to anions in aqueous media but that complex formation is even promoted by the presence of water because it benefits from the desolvation of the areas of the cyclopeptide rings that approach each other in the sandwich complexes.^[14] For this reason, we typically chose aqueous solvent mixtures for the binding studies whose exact composition is determined by receptor solubility. While the sulfate complex of **2b** was well soluble in water/methanol, 1:1 (v/v), a solvent mixture in which the anion binding properties of many of the previously investigated bis(cyclopeptides) were characterized,^[10,12,15] the uncomplexed receptor did not dissolve in this medium. Fortunately, the solubility in acetonitrile/water, 2:1 (v/v), in which some bis(cyclopeptides) were also characterized,^[11,12] turned out to be high enough, which is why we chose this solvent for the binding studies.

The substrate scope of **2b** was screened by adding 1 equiv. of various sodium salts to a 1 mM solution of **2b** in $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2:1 (v/v) and recording the ^1H NMR spectra of these solutions. The series of spectra obtained for chloride, bromide, iodide, nitrate, perchlorate, selenate, sulfate, and hydrogenphosphate is depicted in Figure 4. Accordingly, every anion produced a different NMR spectrum, demonstrating that each interacted with **2b** in a slightly different fashion. Almost every signal in the original spectrum of **2b** was affected by complex formation, with the most informative changes being the shift of the H(α) signal, which differed for every anion, and the signal pattern of the diglycolic acid linkers that also changed upon complex formation.

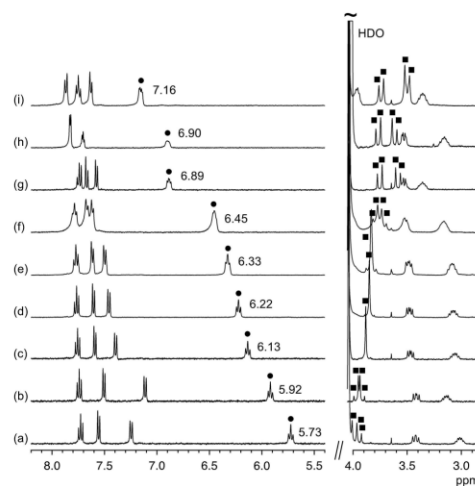


Figure 4. Sections of the ^1H NMR spectra between 8.2 and 5.4 ppm and 2.8 and 4.0 ppm of **2b** (1 mM) in $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2:1 (v/v) in the absence (a) and in the presence of 1 equiv. of Na_2HPO_4 (b), NaCl (c), NaNO_3 (d), NaBr (e), NaReO_4 (f), Na_2SeO_4 (g), NaI (h), and Na_2SO_4 (i). The signals of the proline H(α) protons and the linker protons are marked with circles and squares, respectively.

An analogous binding study could also be performed in methanol/water by starting from the sulfate complex of **2b**. In this experiment, a 1 mM solution of this complex in CD₃OD/D₂O, 1:1 (v/v) was treated in an NMR tube with 1.1 equiv. of barium triflimide to precipitate barium sulfate and obtain the empty cage. After 1 h, 1 equiv. of a sodium salt was added and the ¹H NMR spectrum of the resulting solution recorded. The results obtained in this manner were essentially the same as in the binding study in acetonitrile/water (Figure S7) with only one major difference: the spectrum resulting after the addition of Na₂HPO₄ was strikingly similar to the spectrum of the original sulfate complex. We attributed this result to the even lower solubility product of Ba₃(PO₄)₂ in comparison with BaSO₄ ($\log K_{sp}(\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2) = 3.4 \times 10^{-23} \text{ mol}^5 \text{ L}^{-5}$ vs. $\log K_{sp}(\text{BaSO}_4) = 1.1 \times 10^{-10} \text{ mol}^2 \text{ L}^{-2}$ in water at 25 °C).^[16] Thus, the addition of Na₂HPO₄ caused the BaSO₄ that was still present in the NMR tube to dissolve, allowing the thus released sulfate anions to bind again to **2b**.

To obtain information how the presence of the three linkers in **2b** affects anion binding in comparison to a singly-linked bis(cyclopeptide), a qualitative binding study was also performed by using the analog of **2b**, bis(cyclopeptide) **3b**. The ¹H NMR spectrum of this bis(cyclopeptide) was more complex because it lacks a C₃ axis. The signals were sufficiently well separated, however, to allow an assignment. The resonances most strongly affected by anion binding were again those of the proline H(α) protons (Figure S8). The corresponding signals shifted to a similar extent as observed for **2b** in the presence of sulfate, iodide, and selenate. Of the other anions, only bromide induced a small shift while only negligible effects were observed in the presence of the other anions.

These NMR spectroscopic investigations thus demonstrated the ability of **2b** to interact with a range of different anions. The shifts in the H(α) signals reflected the direct effects of the anions on the resonances of the corresponding protons, while the changes in the signal pattern of the diglycolic acid CH₂ groups presumably illustrate the influence of complex formation on the conformational flexibility of the cage. The extent to which the NMR spectra changed depended in part on the strength of the respective interactions. In previous investigations we saw a correlation, for example, between the anion-induced shift of the H(α) signal and the stability of the complexes with halides and nitrate.^[9] Furthermore, dihydrogenphosphate, which produced the smallest effect on the ¹H NMR spectrum of **2b**, does not bind well to our bis(cyclopeptides) because protonated anions experience repulsive and thus destabilizing interactions when included into a cavity only containing hydrogen bond donors.^[17,18] Other parameters such as the exact structure of the complexes formed, and the charge, charge density, and structure of the anions also characteristically affect the proton resonances of **2b**, however, so that no correlation between the spectral changes and binding strength should be made for the diverse range of anions used in the binding study in the absence of quantitative information about complex stability.^[19] That some anions, especially perchlorate, produced different effects on the ¹H NMR spectra of **2b** and **3b** nevertheless qualitatively indicated that the higher level of preorganization of the two subunits in **2b** induced a different anion selectivity with respect to the less preorganized analog **3b**.

Thermodynamics of Complex Formation

Quantitative information about the anion affinity of **2b** in acetonitrile/water 2:1, (v/v) was obtained by using isothermal titration calorimetry (ITC) (Figure S9). In this context, only sulfate and iodide were considered as guests because these anions are typically bound strongest by our bis(cyclopeptides),^[9] and allowed estimating whether the different properties of these anion, one being a strongly coordinating oxoanion and the other a weaker coordinating halide, had characteristic effects on the thermodynamics of binding. In addition, reference data was available about the sulfate and iodide affinity of other bis(cyclopeptides) in the same solvent mixture so that a comparison could be made with the behavior of known systems.^[11,12,14,18] For comparison, the complexation of the same anions by **3b** was also investigated to assess the extent to which the three linkers in **2b** improved anion affinity with respect to the singly-linked bis(cyclopeptide). Unfortunately, it turned out that the interactions of **3b** with iodide in CH₃CN/H₂O, 2:1 (v/v) were almost athermic, preventing the use of ITC to characterize this complex. Its stability constant therefore had to be determined by using an NMR titration (Figure S10). The results of these measurements are summarized in Table 1.

The stoichiometry factors observed in the ITC titrations indicated that sulfate and iodide were bound by **2b** and **3b** in the form of 1:1 complexes, as expected. Both anions were bound stronger by the triply-linked bis(cyclopeptide) **2b**. In the case of the iodide complex, the complex stability increased by 1.5 orders of magnitude when going from the singly to the triply-linked bis(cyclopeptide), while the sulfate complex was even ca. 2.5 orders of magnitude more stable. The increase of the number of linkers between the cyclopeptide rings thus caused a larger improvement in anion affinity than previously observed for bis(cyclopeptide) **2a**, which only had a ca. one order of magnitude higher sulfate affinity in CH₃OH/H₂O, 1:1 (v/v) than the singly-linked analog **3a**.^[10] The introduction of shorter linkers thus proved to be beneficial. Sulfate was more strongly bound by **2b** likely because of its higher charge with respect to iodide and its more strongly coordinating nature.

In spite of the positive effect of diglycolic acid on the anion affinity of **2b**, the iodide and sulfate affinity of the singly-linked **3b** in CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v) was lower than that of other

Table 1. Association constants $\log K_a$, complexation enthalpies and entropies of the sulfate and iodide complexes of bis(cyclopeptides) **2b** and **3b**, as well as stoichiometry factors n of the respective complexes in CH₃CN/H₂O, 2:1 (v/v).^[a]

receptor	anion	$\log K_a$	ΔH	$T\Delta S$	n
2b	iodide	4.5 ± 0.1	13.5 ± 0.2	38.9 ± 0.4	0.79 ± 0.02
	sulfate	6.7 ± 0.1	22.2 ± 0.3	60.5 ± 0.5	0.91 ± 0.04
3b	iodide	3.0 ± 0.1 ^[b]			
	sulfate	4.3 ± 0.1	16.2 ± 0.6	40.8 ± 0.5	1.08 ± 0.02

[a] The anions were introduced as their respective sodium salts; ΔH and $T\Delta S$ are given in kJ mol⁻¹; the measurements were performed at 298 K; the ITC results are means of three independent measurements with the standard deviations specified. [b] Determined by NMR titration in CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v) at 298 K.

analogous bis(cyclopeptides). A derivative with a 2,2'-(1,3-phenylene)diacetate-derived linker, *i.e.* the singly-linked analog of **2c**, had affinities $\log K_a$ in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 2:1 (v/v) of 4.0 for iodide and 5.8 for sulfate, for example.^[12,20] Accordingly, diglycolic acid was still not the best linker although among the known bis(cyclopeptides) with amide groups connecting the subunits, it produced the highest so far observed sulfate affinity when introduced three times between the two rings as in **2b**. Further fine-tuning of the linker is therefore necessary, especially when trying to reach the still unsurpassed anion affinity of bis(cyclopeptides) with disulfide bonds in the linkers. A doubly-linked derivative of these bis(cyclopeptides) had a sulfate affinity of 8.7 in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 2:1 (v/v), for example.^[11,14]

The thermodynamics of anion binding provided information why the diglycolic acid linker might not be optimal. Iodide and sulfate complexation of both **2b** and **3b** was endothermic and only driven by large favorable entropic terms. In itself, the endothermicity of anion binding in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 2:1 (v/v) was not surprising since many other bis(cyclopeptides) also complexed iodide or sulfate anions in this solvent mixture in endothermic or slightly exothermic reactions.^[11,12,14,18] This enthalpic signature was previously attributed to the preferential solvation of anions by water in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ mixtures,^[21] which required complex formation to compensate a large enthalpic term associated with anion desolvation.^[18] The comparison of the data in Table 1 with reported results showed, however, that sulfate and iodide binding of **2b** and **3b** was consistently more endothermic than that of analogous receptors. The reason could be that the diglycolic acid linkers either produced strain in the respective complexes and/or prevented the cyclopeptide rings in **2b** and **3b** from interacting as efficiently with the anions as in bis(cyclopeptides) with other linkers. It could therefore be that the decision to use the shortest available linker for the synthesis of the targeted triply-linked bis(cyclopeptides) may not have been the best one. Clearly, the right balance between linker length and flexibility still needs to be identified.

Kinetics of Complex Formation

To obtain information about the kinetics of anion exchange, the effects of sulfate and the halides on the ^1H NMR spectrum of **2b** were investigated when adding them in substoichiometric amounts. In the case of sulfate, the spectra obtained when the solution contained 0.25 and 0.50 equiv. of sodium sulfate exhibited two signals sets (Figure 5), the one of the free receptor and the one of the sulfate complex, showing that complex formation was slow on the NMR time-scale. The signal set of the complex increased the more of the salt was present, with only 1 equiv. leading to the complete disappearance of the signals of the empty cage, consistent with the high stability of the sulfate complex of **2b**.

This slow exchange process allowed determining the first-order rate constant of complex dissociation by using 2D EXSY NMR spectroscopy.^[22] To this end, NOESY NMR spectra of a solution of **2b** containing 0.5 equiv. of Na_2SO_4 in $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2:1 (v/v) were recorded at different mixing times to estimate

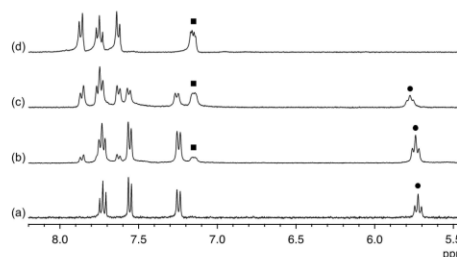


Figure 5. Sections of the ^1H NMR spectra between 8.2 and 5.4 ppm of **2b** (1 mM) in $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2:1 (v/v) in the absence (a) and in the presence of 0.25 (b), 0.50 (c), and 1.00 (d) equiv. of Na_2SO_4 . The H(α) signals of the empty cage and of the sulfate complex are marked with circles and squares, respectively.

under which conditions the volumes of the cross and diagonal peaks of the exchanging H(α) protons were largest. Subsequently, the first-order magnetization rate constants k_{in}^* and k_{out}^* were calculated from the spectrum with the optimum mixing time τ_m of 0.25 s by using the program EXSYCalc (Figure S11).^[23] A first-order rate constant k_{out} of 5.1 s^{-1} was thus obtained that translated into a Gibbs free energy of activation ΔG^\ddagger of 68.9 kJ mol^{-1} according to the Eyring equation. This energy term likely reflected the conformational changes **2b** had to undergo to allow the sulfate anion to leave the cavity. It can thus be associated with the contribution of *constrictive binding* to the kinetics of the binding equilibrium, a term that was originally introduced by Cram to describe the behavior of carcerands.^[24] The k_{out} of the sulfate complex of **2b** is comparable to that previously determined for **2a**. Shortening the linker units therefore did not substantially affect the rate with which these triply-linked bis(cyclopeptides) release the sulfate anion. Similar rate constants have also been observed for other cage-type receptors.^[25,26]

The exchange of the weaker bound iodide anion proceeded significantly faster than that of sulfate because the addition of 0.5 equiv. of the anion to the receptor solution only caused a broadening but not a splitting of the receptor signals (Figure S12). Accordingly, EXSY NMR spectroscopy could not be used in this case to determine the rate of guest exchange. The sharp signals in the spectra of the samples containing NaBr and NaCl showed that, unsurprisingly, the complexation equilibria of these smaller anions were even faster.

Conclusion

The shortening of the linkers of the previously described anion-binding cage **2a** had a beneficial effect on the preorganization of the two cyclopeptide rings as reflected in the substantially larger anion affinity of **2b** with respect to the singly-linked analog **3b**. This preorganization in combination with the arrangement of binding sites within the cage created a well-suited environment for accommodating a range of anions. The diglycolic acid-derived linkers in **2b** were, however, still not

optimal as reflected in the less favorable enthalpic terms associated with sulfate and iodide complexation of **2b** and **3b** as compared to bis(cyclopeptides) with longer, more flexible linkers. Another disadvantage of **2b** was its solubility, which was not sufficiently high to allow binding studies in media more competitive than acetonitrile/water, 2:1 (v/v). More work is therefore required to develop a mimic of the sulfate-binding protein. Based on the recently developed strategy to improve water solubility^[18] and the possibility to access a wide range of bis(cyclopeptides) with the approach introduced here, we are optimistic that this goal can eventually be reached. Given the wide range of anions that can potentially be bound with such receptors, it can moreover be expected that they will provide deep insight into principles that govern anion binding in water.

Mentoring Statement

This contribution summarizes parts of the Ph.D. research of Julia Bartl. I acted as her mentor by providing Julia with the means and freedom to pursue her ideas and by being available for help when needed. Accordingly, the results reflect her and not my achievements.

Acknowledgements

J.B. thanks the Carl Zeiss foundation for a PhD fellowship, Sabrina I. Knospe and Manuela A. Zouatom Kamdam for their help in some investigations, and Mike Lembach for measuring ESI MS spectra even when the department was essentially shut down during the COVID-19 crisis.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: anion recognition · cyclopeptides · host-guest interactions · molecular cages · supramolecular chemistry

- [1] Y. Ferrand, I. Huc, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 970–977.
- [2] a) S. Kubik, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *319*, 1–34; b) L. Adriaenssens, P. Ballester, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3261–3277.
- [3] a) B. Kuberski, A. Szumna, *Chem. Commun.* **2009**, 1959–1961; b) A. Szumna, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12381–12388; c) A. Szumna, *Chem. Commun.* **2009**, 4191–4193; H. Jędrzejewska, A. Szumna, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4412–4421.
- [4] a) P. Ballester, G. Gil-Ramírez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10455–10459; b) G. Gil-Ramírez, M. Chas, P. Ballester, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2520–2521; c) M. Chas, P. Ballester, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 186–191.
- [5] a) A. P. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3629–3638; b) B. Sookcharoenpinyo, E. Klein, Y. Ferrand, B. Walker, P. R. Brotherhood, C. Ke, M. P. Crump, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4586–4590; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4664–4668; c) T. J. Mooibroek, J. M. Casas-Solvas, R. L. Harniman, C. M. Renney, T. S. Carter, M. P. Crump, A. P. Davis, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 69–74; d) P. Rios, T. S. Carter, T. J. Mooibroek, M. P. Crump, M. Lisbjerg, M. Pittelkow, N. T. Supekar, G.-J. Boons, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3387–3392; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 3448–3453; R. A. Tromans, T. S. Carter, L. Chabanne, M. P. Crump, H. Li, J. V. Matlock, M. G. Orchard, A. P. Davis, *Nat. Chem.* **2019**, *11*, 52–56.
- [6] a) J. M. Llinares, D. Powell, K. Bowman-James, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 57–75; b) E. García-España, P. Díaz, J. M. Llinares, A. Bianchi, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2952–2986; c) S. O. Kang, J. M. Llinares, V. W. Day, K. Bowman-James, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3980–4003; d) P. Mateus, N. Bernier, R. Delgado, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 1726–1747; e) K. Dabrowa, F. Ulatowski, D. Lichosyt, J. Jurczak, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 5927–5943; f) S. Peng, Q. He, G. I. Vargas-Zúñiga, L. Qin, I. Hwang, S. K. Kim, N. J. Heo, C.-H. Lee, R. Dutta, J. L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 865–907.
- [7] a) D. Zhang, T. K. Ronson, J. Mosquera, A. Martínez, L. Guy, J. R. Nitschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6574–6577; b) D. Zhang, T. K. Ronson, J. Mosquera, A. Martínez, J. R. Nitschke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 3717–3721; *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 3779–3783.
- [8] Y. Liu, W. Z. Zhao, C.-H. Chen, A. H. Flood, *Science* **2019**, *365*, 159–161.
- [9] S. Kubik, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2870–2878.
- [10] T. Fiehn, R. Goddard, R. W. Seidel, S. Kubik, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7241–7255.
- [11] a) S. Otto, S. Kubik, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7804–7805; b) Z. Rodríguez-Docampo, E. Eugenieva-Ilieva, C. Reyheller, A. M. Belanguier, S. Kubik, S. Otto, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9798–9800.
- [12] C. Reyheller, B. P. Hay, S. Kubik, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 2095–2102.
- [13] S. Kubik, R. Goddard, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2648–2651; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2722–2725.
- [14] Z. Rodríguez-Docampo, S. I. Pasco, S. Kubik, S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11206–11210.
- [15] S. Kubik, R. Kirchner, D. Nolting, J. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12752–12760.
- [16] J. G. Speight, *Lange's Handbook of Chemistry*, 16th ed., McGraw-Hill: New York, 2005.
- [17] A. Schaly, R. Belda, E. García-España, S. Kubik, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 6238–6241.
- [18] F. Sommer, Y. Marcus, S. Kubik, *ACS Omega* **2017**, *2*, 3669–3680.
- [19] That the extent to which a receptor signal shifts in the NMR spectrum in upon complex formation does not necessarily correlate with binding strength was demonstrated in a related study by Sindelar, for example, who showed that different anions produced upfield shifts in the ¹H NMR spectrum of the signal of the bambus[6]uril methine protons, which increase in the order BF₄⁻ < ClO₄⁻ < NO₃⁻ < ReO₄⁻ < Cl⁻ < Br⁻ < I⁻. Complex stability, however, increased in the following order: Cl⁻ < ReO₄⁻ < Br⁻ < PF₆⁻ < NO₃⁻ < BF₄⁻ < I⁻ < ClO₄⁻. V. Havel, V. Sindelar, *ChemPlusChem* **2015**, *80*, 1601–1606.
- [20] Note that the ITC titrations in CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v) were performed in ref. [12] by using potassium salts, while sodium salts were used here. A comparative study performed with receptor **3b** showed, however, that the counterion had little influence on the thermodynamics of binding. See also refs. [13] and [18].
- [21] a) Y. Marcus, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1989**, *85*, 3019–3032; b) Y. Marcus, *J. Chem. Thermodyn.* **2007**, *39*, 1338–1345.
- [22] C. L. Perrin, T. J. Dwyer, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 935–967.
- [23] EXSYCalc, Version 1.0, Mestrelab Research, free download available from www.mestrelab.com.
- [24] D. J. Cram, M. T. Blanda, K. Paek, C. B. Knobler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7765–7773.
- [25] M. D. Pluth, K. N. Raymond, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 161–171.
- [26] a) M. Yamanaka, A. Shivanyuk, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2939–2943; b) L. C. Palmer, J. Rebek, Jr., *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3051–3059; c) J. Nakazawa, Y. Sakae, M. Aida, Y. Naruta, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9448–9455; d) B.-Y. Wang, S. Rieth, J. D. Badjic, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7250–7252.

Manuscript received: March 31, 2020
Revised manuscript received: May 5, 2020
Accepted manuscript online: May 5, 2020

ChemPlusChem

Supporting Information

Anion Binding of a Cyclopeptide-Derived Molecular Cage in Aqueous Solvent Mixtures

Julia Bartl and Stefan Kubik*© 2020 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made. This article is part of a Special Collection on "Supramolecular Chemistry: Young Talents and their Mentors". More articles can be found under .

Synthetic Procedures

General Details. Analyses were carried out as follows: ATR-IR: Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR-Spektrometer with Universal ATR Sampling Accessory Unit; Elemental analysis: Elementar vario Micro cube; ESI-MS: Bruker Esquire 3000 Plus and Esquire 6000; GC-HRMS: Waters GCT Premier Micromass MS Technologies, DB5-MS column, Agilent 7890A; ITC, Microcal VP-ITC; NMR: Bruker AVANCE™ III 400 and 600 (peak assignments were confirmed by using H,H-COSY, HSQC 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; CD_3CN , $\delta^{\text{H}} = 1.94$ ppm, $\delta^{\text{C}} = 1.32$ ppm); J values are given in Hz, trifluoroacetic acid was used as an external standard for the ^{19}F NMR spectra with $\delta^{\text{F}}(\text{TFA}) = -76.55$ ppm; MALDI-TOF-MS: Bruker Ultraflex TOF/TOF; Melting points: Müller SPM-X 300; Precision balance: Kern ABT 100-5M; centrifuge: Eppendorf Centrifuge 5702 R.

The following abbreviations are used: Apa, 6-aminopicolinic acid; Pro, L-proline; Apro (4*S*,2*S*)-4-aminoproline; Dga, diglycolic acid; DIPEA, *N,N'*-ethyldiisopropylamine; Pfp, pentafluorophenol; TBTU, *O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate.

Materials. If necessary, solvents were dried according to standard procedures prior to use. DMF p.a. was purchased and used without further purification. TBTU, DIPEA, Pfp, and barium triflimide were commercially available. For RP column chromatography, POLYGOPREP 60-50 C8 (40–63 μm) by Macherey-Nagel was used.

Syntheses.

General procedure for the synthesis of the active esters 5b-f. The respective dicarboxylic acid (1 equiv.) and pentafluorophenol (2.4 equiv.) were dissolved in dichloromethane (15 mL/mmol) and treated with a solution of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (2.4 equiv.) and DMAP (10 mol%) in dichloromethane (5 mL/mmol). The resulting mixture was stirred for 18 h at 25 °C. Afterward, the organic phase was washed twice with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified

by column chromatography [SiO₂, ethyl acetate/hexane, 1:10 (v/v)].

Bis(perfluorophenyl)-2,2'-oxydiacetate (5b). Yield: 580 mg (1.24 mmol, 62%) colorless solid; mp.: 106-107 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.69 (s, 4H, CH₂) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 165.7 (CO), 141.2 (dm, ¹J(C,F) = 252 Hz, PfpC(3)), 140.0 (dm, ¹J(C,F) = 255 Hz, PfpC(2)), 138.1 (dm, ¹J(C,F) = 256 Hz, PfpC(4)), 124.3 (m, PfpC(1)), 67.5 (CH₂) ppm; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -151.2 (d, 4 F, ³J = 15.1 Hz, PfpF(2,6)), -155.6 (t, 2 F, ³J = 20.7 Hz, PfpF(4)), -160.4 (t, 4 F, ³J = 18.8 Hz, PfpF(3,5)) ppm; IR (ATR): 1804 (m), 1788 (m), 1514 (s), 1509 (s), 1107 (m), 985 (s), 959 (s) cm⁻¹; GC-HRMS (EI+): calculated for [M-C₆F₅O]⁺ = 283.0030, found: 283.0030; CHN calculated for C₁₆H₄F₁₀O₅ (M.W.: 466.18): C, 41.22%; H, 0.86%; found: C, 41.33%; H, 1.08%.

Bis(perfluorophenyl)-2,2'-(1,3-phenylene)diacetate (5c). Yield: 447 mg (850 μmol, 85%) colorless solid; mp.: 90-91 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.33-7.43 (m, 4 H, H(1) + H(2) + H(3) + H(4)); 3.99 (s, 4 H, PhCH₂) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 167.4 (CO), 141.1 (dm, ¹J(C,F) = 252 Hz, PfpC(3)), 139.7 (dm, ¹J(C,F) = 254 Hz, PfpC(2)), 138.0 (dm, ¹J(C,F) = 250 Hz, PfpC(4)), 132.9 (C(2)), 130.3 (C(1)), 129.6 (C(4)), 128.9 (C(3)), 125.2 (m, PfpC(1)), 40.2 (PhCH₂) ppm; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -151.4 (d, 4 F, ³J = 18.8 Hz, PfpF(2,6)), -156.4 (t, 2 F, ³J = 22.6 Hz, PfpF(4)), -161.0 (t, 4 F, ³J = 18.4 Hz, PfpF(3,5)) ppm; IR (ATR): 1771 (w), 1514 (s), 1509 (s), 1102 (w), 986 (m) cm⁻¹; GC-HRMS (EI+): calculated for [M-C₆F₅O]⁺: 343.0394, found: 343.0402; CHN calculated for C₂₂H₈F₁₀O₄ (M.W.: 526.28): C, 50.21%; H, 1.53%; found: C, 50.45%; H, 1.69%.

Bis(perfluorophenyl)glutarate (5d). Yield: 823 mg (1.77 mmol, 89%) colorless solid; mp.: 69-70 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.86 (t, 4 H, ³J = 8.0 Hz, H(2)); 2.24 (q, 2 H, ³J = 8.0 Hz, H(1)) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 168.7 (CO), 141.2 (dm, ¹J(C,F) = 252 Hz, PfpC(3)), 139.8 (dm, ¹J(C,F) = 254 Hz, PfpC(2)), 138.1 (dm, ¹J(C,F) = 256 Hz, PfpC(4)), 125.0 (m, PfpC(1)), 31.9 (C(2)), 19.8 (C(1)) ppm; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -151.7 (d, 4 F, ³J = 15.1 Hz, PfpF(2,6)), -156.7 (t, 2 F, ³J = 20.7 Hz, PfpF(4)), -161.1 (t, 4 F, ³J = 18.8 Hz, PfpF(3,5)) ppm; IR (ATR): 1772 (w), 1507 (s), 988 (s) cm⁻¹; GC-HRMS (EI+): calculated for [M-C₆F₅O]⁺ = 281.0237, found: 281.0251; CHN calculated for C₁₇H₆F₁₀O₄ (M.W.: 464.21): C, 43.98%; H, 1.30%; found: C, 44.06%; H, 1.28%.

Bis(perfluorophenyl)adipate (5e). Yield: 760 mg (1.59 mmol, 80%) colorless solid; mp.: 98-99 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.74-2.77 (m, 4 H, H(2)), 1.90-1.93 (m, 4 H, H(1)) ppm; ¹³C NMR

(101 MHz, CDCl₃): δ = 169.1 (CO), 141.3 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 250$ Hz, PfpC(3)), 139.7 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 254$ Hz, PfpC(2)), 138.0 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 255$ Hz, PfpC(4)), 125.1 (m, PfpC(1)), 33.0 (C(2)), 24.0 (C(1)) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -151.8 (d, 4 F, $^3J = 18.8$ Hz, PfpF(2,6)), -156.9 (t, 2 F, $^3J = 18.8$ Hz, PfpF(4)), -161.2 (t, 4 F, $^3J = 18.8$ Hz, PfpF(3,5)) ppm; IR (ATR): 2974 (w), 1778 (m), 1515 (s), 1093 (m), 1077 (m), 1102 (w), 985 (s) cm⁻¹; GC-HRMS (EI+): calculated for [M-C₆F₅O]⁺ = 295.0394, found: 295.0379; CHN calculated for C₁₈H₈F₁₀O₄ (M.W.: 478.24): C, 45.21%; H, 1.69%; found: C, 45.29%; H, 1.72%.

Bis(perfluorophenyl)-2,2'-(1,2-phenylene)diacetate (5f). Yield: 890 mg (1.69 mol, 85%) colorless solid; mp.: 86-87 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.33-7.43 (m, 4 H, H(1) + H(2) + H(3) + H(4)), 4.01 (s, 4 H, PhCH₂) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 167.2 (CO), 141.2 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 252$ Hz, PfpC(3)), 139.8 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 254$ Hz, PfpC(2)), 138.0 (dm, $^1J(\text{C},\text{F}) = 253$ Hz, PfpC(4)), 131.5 (C(1)), 131.4 (C(2)), 128.9 (C(3)), 125.1 (m, PfpC(1)), 37.8 (PhCH₂) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl₃): δ = -151.7 (d, 4 F, $^3J = 15.1$ Hz, PfpF(2,6)), -156.4 (t, 2 F, $^3J = 22.6$ Hz, PfpF(4)), -161.1 (t, 4 F, $^3J = 20.7$ Hz, PfpF(3,5)) ppm; IR (ATR): 1773 (m), 1510 (s), 1342 (m), 1104 (s), 1084 (s), 982 (m) cm⁻¹; GC-HRMS (EI+): calculated for [M-C₆F₅O]⁺ = 343.0394, found: 343.0412; CHN calculated for C₂₂H₈F₁₀O₄ (M.W.: 526.28): C, 50.21%; H, 1.53%; found: C, 50.18%; H, 1.58%.

Bis(cyclopeptide) 2b. The synthesis started from the Cbz-protected version of the cyclopeptide triamine **4**, whose synthesis has been described elsewhere.^[1] The unprotected cyclopeptide **4** was generated by dissolving this precursor (100 mg, 91 μmol) in dichloromethane/methanol, 1:1 (v/v) (50 mL). After the addition of 10% Pd/C (35 mg), Pd(OH)₂/C (35 mg) and 1 M aqueous HCl (300 μL , 300 μmol) the reaction mixture was stirred for 4 d under an atmosphere of hydrogen. The catalysts were removed by filtration over celite and the filtrate was evaporated to dryness. The thereby isolated trihydrochloride of **4** was suspended in methanol (50 mL) and treated with LiOH·H₂O (13.2 mg, 328 μmol). The mixture was stirred for 18 h at 25 °C and the solvent was removed *in vacuo* to yield the free amine. The thus obtained colorless solid was used in the next step without further purification. Yield: 63.3 mg (91 μmol , quant.).

Triamine **4** (63.3 mg, 91.0 μmol) was dissolved in DMF (120 mL). NMe₄SO₄ (11.1 mg, 45.5 μmol) was added and the solution was stirred for 20 min 25 °C. Afterward, a solution of **5b** (64.2 mg, 137

μmol) in DMF (50 mL) was added dropwise over a period of 5 h. Stirring was continued for 18 h, followed by removal of the solvent in vacuo. The residue was purified by column chromatography [SiO₂, dichloromethane/methanol, 1:1 (v/v)] followed by RP-8 column chromatography. As an eluent in this step, methanol/water, 1:5 (v/v) containing 0.05 mass% of Na₂SO₄ was initially used. This solvent composition was gradually changed over methanol/water, 1:2 (v/v) to methanol/water, 1:1 (v/v). The fractions containing pure **2b** were freeze dried. The crude product was then dissolved in dichloromethane/methanol, 1:1 (v/v) and the thus obtained suspension was centrifuged to remove the residual Na₂SO₄. The supernatant solution was evaporated to dryness and the thus obtained sulfate complex of **2b** redissolved in water/methanol, 4:1 (v/v). Barium triflimide (1.5 equiv) was added, which caused the precipitation of anion-free **2b** and Ba₂SO₄. The mixture was centrifuged and the supernatant solution was discarded. Dichloromethane/methanol, 1:1 (v/v) (5 mL) was added to dissolve **2b**, the mixture was again centrifuged to separate Ba₂SO₄ and the supernatant solution was collected and evaporated to afford analytically pure product. Yield: 12.3 mg (7.3 μmol , 16%) colorless solid; mp.: >300 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v)): δ = 7.73 (t, ³J = 8.0 Hz, 6 H, ApaH(4)), 7.56 (d, ³J = 8.0 Hz, 6 H, ApaH(5)), 7.25 (d, ³J = 8.0 Hz, 6 H, ApaH(3)), 5.70-5.75 (m, 6 H, AproH(α)), 4.36-4.44 (m, 6 H, AproH(γ)), 4.12-4.17 (m, 6 H, AproH(δ)), 3.88-3.96 (m, 12 H, DgaCH₂), 3.37-3.42 (m, 6 H, 6 AproH(δ)), 2.97-3.04 (m, 6 H, AproH(β)), 2.05-2.13 (m, 6 H, AproH(β)) ppm; ¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v)): δ = 173.0 (AproCO), 171.9 (DgaCO), 168.2 (ApaCO), 151.7 (ApaC(6)), 149.5 (ApaC(2)), 140.9 (ApaC(4)), 122.0 (ApaC(5)), 117.8 (ApaC(3)), 72.9 (DgaCH₂), 62.1 (AproC(α)), 52.8 (AproC(δ)), 47.4 (AproC(γ)), 37.6 (AproC(β)) ppm; IR (ATR): 3156 (br), 2991 (w), 2889 (w), 1674 (m), 1601 (m), 1581 (s), 1494, (s), 1439 (s), 1378 (s), 1231 (m), 1199 (s), 1119 (m), 810 (m) cm⁻¹; MS (ESI-TOF, negative mode) *m/z* (%): 891.1 [M+SO₄]²⁻ (100%); CHN calculated for C₇₈H₇₈N₂₄O₂₁·10 H₂O (M.W.: 1867.56): C, 50.16%; H, 5.29%; N, 18.00%; found: C, 49.94%; H, 5.41%; N, 17.96%.

Bis(cyclopeptide) 3b. The synthesis started from the Cbz-protected version of a cyclopeptide with one 4-aminoproline residue, whose synthesis has been described elsewhere.^[1] The corresponding unprotected monoamine was obtained by dissolving this cyclopeptide (110 mg, 137 μmol) in dichloromethane/methanol 1:1 (v/v) (50 mL), followed by the addition of 10% Pd/C (15.0 mg),

Pd(OH)₂/C (15.0 mg) and 1 M aqueous HCl (150 μL, 150 μmol). The reaction mixture was stirred for 4 d at 25 °C under an atmosphere of hydrogen, the catalysts were removed by filtration over celite, and the filtrate was evaporated to dryness. The thus obtained colorless solid was used in the next step without further purification. Yield: 91.3 mg (137 μmol, quant.).

This monoamine (91.3 mg, 137 μmol) and diglycolic acid (9.19 mg, 68.5 μmol) were dissolved in DMF (120 mL) followed by the addition of TBTU (52.8 mg, 164 μmol) and DIPEA (70.0 μL, 411 μmol). The reaction mixture was stirred for 48 h at 25 °C. Afterward, the solvent was removed *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography [SiO₂, chloroform/methanol, 3:1 (v/v)] and RP-8 column chromatography. As an eluent in this step, 1,4-dioxane/water, 1:10 (v/v) was initially used. This solvent composition was gradually changed over 1,4-dioxane/water, 1:5 (v/v) to 1,4-dioxane/water, 1:2 (v/v). The fractions containing pure **3b** were collected and evaporated to dryness. The residue was dissolved in dichloromethane/methanol, 1:1 (v/v) (2 mL), the product was precipitated by adding diethyl ether, centrifuged, and dried. Yield: 58.2 mg (35.3 μmol, 52%) colorless solid; mp.: >300 °C; ¹H NMR (600 MHz, CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v)): δ = 7.69-7.73 (m, 6 H, ApaH(4)), 7.47-7.52 (m, 6 H, ApaH(5)), 7.17-7.26 (m, 6 H, ApaH(3)), 5.70-5.72 (m, 2 H, AproH(α)), 5.58-5.62 (m, 4 H, ProH(α)), 4.36-4.38 (m, 2 H, AproH(γ)), 3.88-3.91 (m, 2 H, AproH(δ)), 3.72-3.78 (m, 4 H, DgaCH₂), 3.63-3.67 (m, 10 H, 2 AproH(δ) + 8 ProH(δ)), 2.80-2.84 (m, 2 H, AproH(β)), 2.53-2.58 (m, 4 H, ProH(β)), 1.97-2.03 (m, 6 H, 4 ProH(β) + 2 AproH(β)), 1.81-1.88 (m, 8 H, ProH(γ)) ppm; ¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v)): δ = 172.8 + 172.7 (ProCO), 172.4 (AproCO), 171.5 (DgaCO), 168.3 + 168.2 (ApaCO), 152.6 + 152.1 (ApaC(6)), 149.6 + 149.5 + 149.4 (ApaC(2)), 140.7 + 140.6 + 140.5 (ApaC(4)), 121.7 + 121.6 + 121.5 (ApaC(5)), 117.7 + 117.6 + 117.5 (ApaC(3)), 70.8 (DgaCH₂), 63.2 + 63.1 (ProC(α)), 61.9 (AproC(α)), 53.3 (AproC(δ)), 49.7 (ProC(δ)), 47.2 (AproC(γ)), 38.0 (AproC(β)), 33.5 + 33.4 (ProC(β)), 23.4 + 23.3 (ProC(γ)) ppm; IR (ATR): 3225 (br), 2980 (w), 2880 (w), 1770 (m), 1625 (m), 1572 (s), 1464, (s), 1399 (s), 1296 (m), 1155 (s), 1084 (m), 760 (m) cm⁻¹; MS (ESI-TOF, negative mode) *m/z* (%): 750.2 [M+2Cl]²⁻ (100%), 1429.5 [M-H]⁻ (4%), 1465.5 [M+Cl]⁻ (9%); CHN calculated for C₇₀H₇₀N₂₀O₁₅·12 H₂O (M.W.: 1647.62): C, 51.03%; H, 5.75%; N, 17.00%; found: C, 50.88%; H, 5.45%; N, 16.88%.

ITC measurements. The solvents used in the ITC titrations were of HPLC grade. Receptors and guests were weighed by 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. The concentrations of the receptors and substrates are summarized in Table S1. A standard ITC experiment involved the titration of a solution of the salt into a solution of the receptor at 25 °C by using 38 injections of 6 μL , separated by an interval of 180 s, with the exception of the first injection, which was 2 μL . 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 optimization of the raw thermogram with NITPIC^[2] 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 Receptor and Salt Solutions Used in the ITC Measurements.

receptor	salt	c(receptor) / mM	c(salt) / mM
2b	NaI	0.35	7.00
2b	Na ₂ SO ₄	0.10	2.00
3b	Na ₂ SO ₄	0.25	5.00

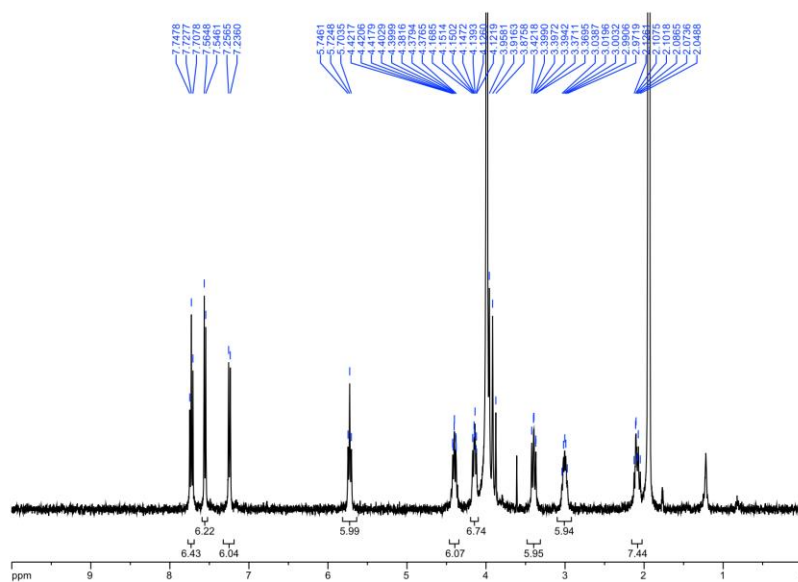
NMR titration. The titration was performed on a Bruker AvanceTM III 400 spectrometer with 256 scans, at 400 MHz and 22 °C. Acetonitrile-*d*₃ and D₂O were used as purchased. Receptor **3b** and NaI were weighed by using an analytical precision balance and used to prepare stock solutions in CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v) with the following concentrations: **3b**, 1.25 mM; NaI, 25 mM.

Eleven NMR tubes were prepared, each containing 200 μL of the stock solution of **3b**. No guest solution was added to the first NMR tube. To each of the other tubes a certain amount of the guest solution was added by starting with 20 μL and progressively increasing the amount added in steps of 20 μL until the last tube contained 200 μL . The total volume in each NMR tube was made up to 500 μL , the samples were thoroughly shaken, and their spectra were recorded. In this way, the concentration of **3b** was maintained at 0.5 mM throughout the titration, whereas the concentration of NaI varied between 0 and 20 equiv. The changes in the chemical shifts for the proline H(α) and the aminoproline H(γ) protons were monitored and used to generate binding isotherms that were fitted to a 1:1 complex equilibrium by using a routine implemented in ProFit 7.0.14 (Quantum Soft).

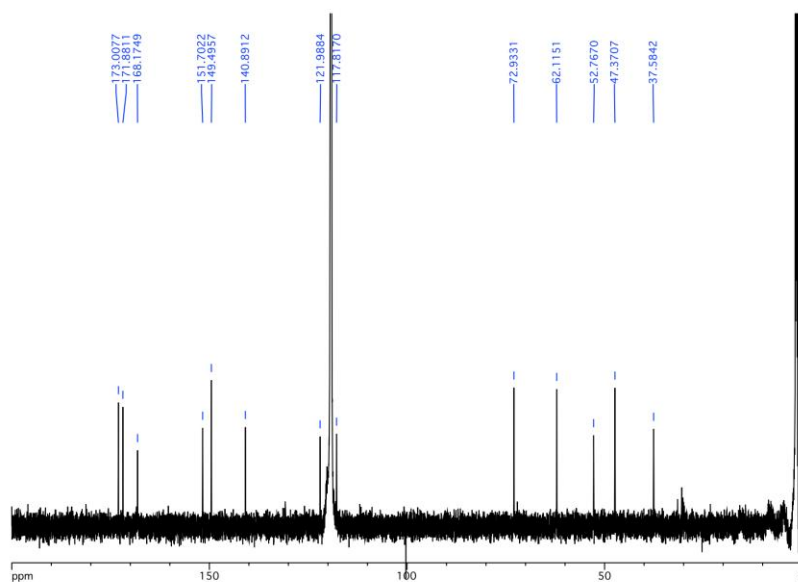
EXSY NMR Spectroscopy. The EXSY NMR measurements were performed on a Bruker Avance™ III 600 spectrometer at 600 MHz and 22 °C. Acetonitrile-*d*₃ and D₂O were used as purchased. Receptor **2b** and Na₂SO₄ were weighed by using an analytical precision balance. To a solution of **2b** (1 mM) in CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v) in an NMR tube 0.5 equiv of Na₂SO₄ were added, the sample thoroughly shaken and the spectrum recorded. ¹H-¹H-EXSY spectra were acquired by using the NOESY pulse sequence with mixing times (τ_m) of 0.03, 0.06, 0.09, 0.15, 0.25, and 0.5 s to determine under which conditions the volumes of the crosspeaks of the H(α) exchange signals were largest. At the thus determined optimal mixing time of 0.25 s, the first-order magnetization rate constants k_{in}^* and k_{out}^* were calculated from the volumes of the cross and diagonal peaks of the respective exchange signals, normalized by the volumes of the diagonal peaks at zero mixing time by using the program EXSYCalc.^[5]

NMR and MS Spectra of 2b

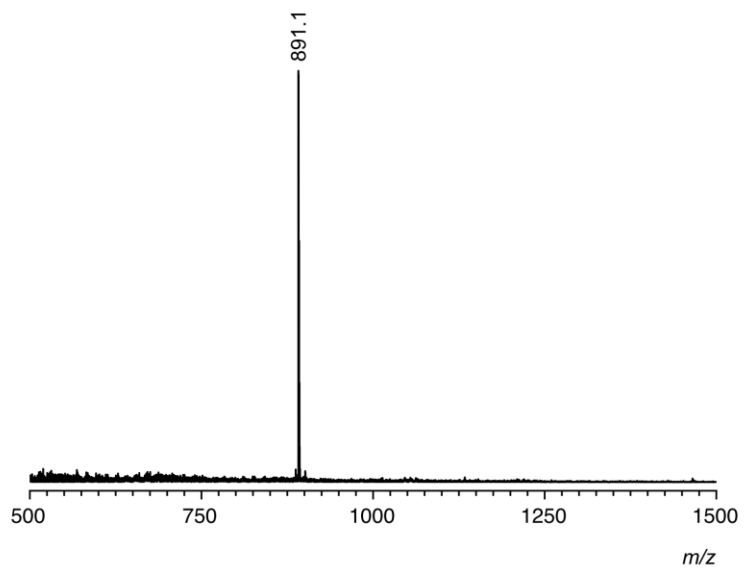
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v))



¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v))



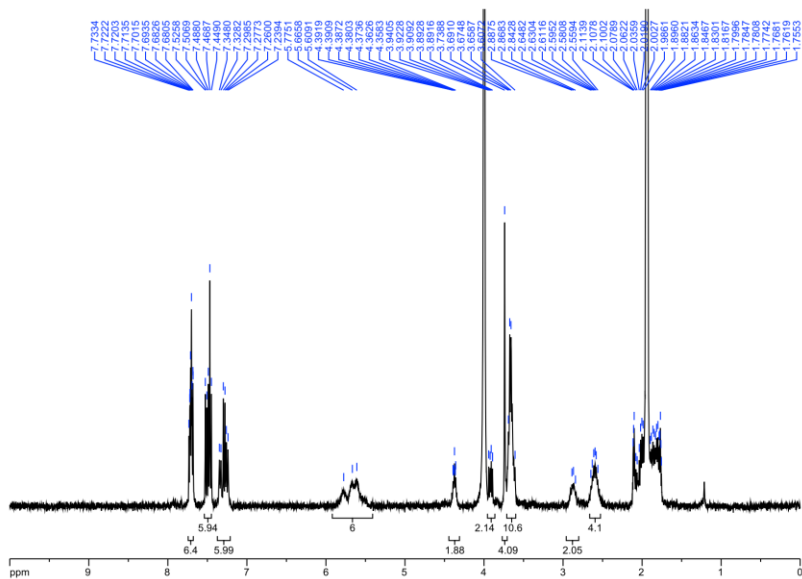
ESI-TOF MS (negative mode)



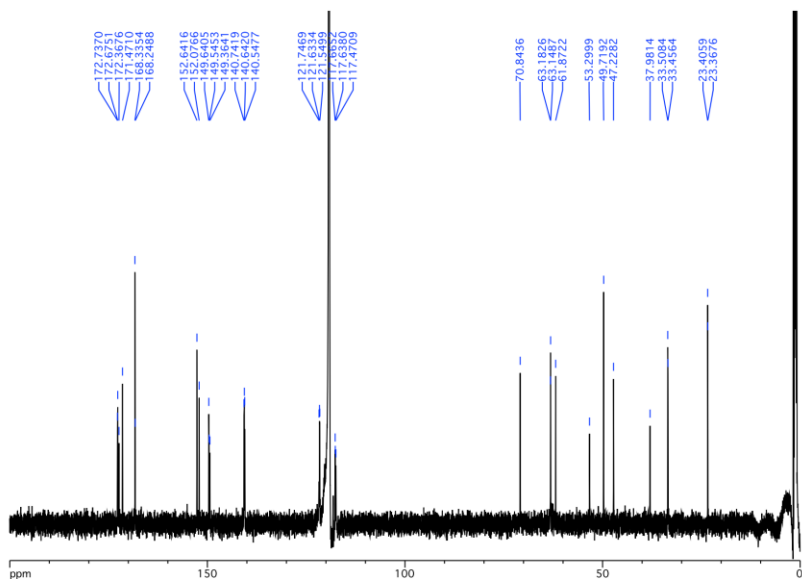
		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M+SO_4]^{2-}$	$C_{78}H_{78}N_{24}O_{21} + SO_4^{2-}$	891.3	891.1

NMR and MS Spectra of 3b

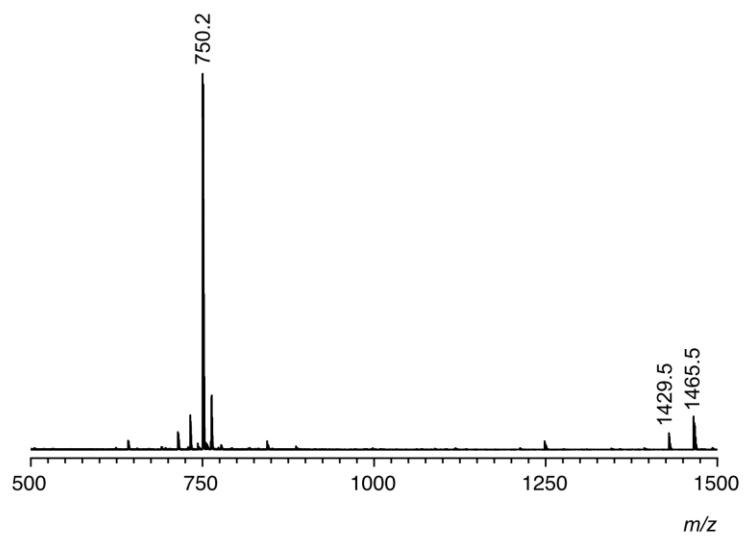
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v))



¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v))



ESI-TOF MS (negative mode)



		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M+2Cl]^{2-}$	$C_{70}H_{70}N_{20}O_{15} + 2 Cl^{-}$	750.2	750.2
$[M-H]^{-}$	$C_{70}H_{70}N_{20}O_{15} - H^{+}$	1429.5	1429.5
$[M+Cl]^{-}$	$C_{70}H_{70}N_{20}O_{15} + Cl^{-}$	1465.5	1465.5

Figures

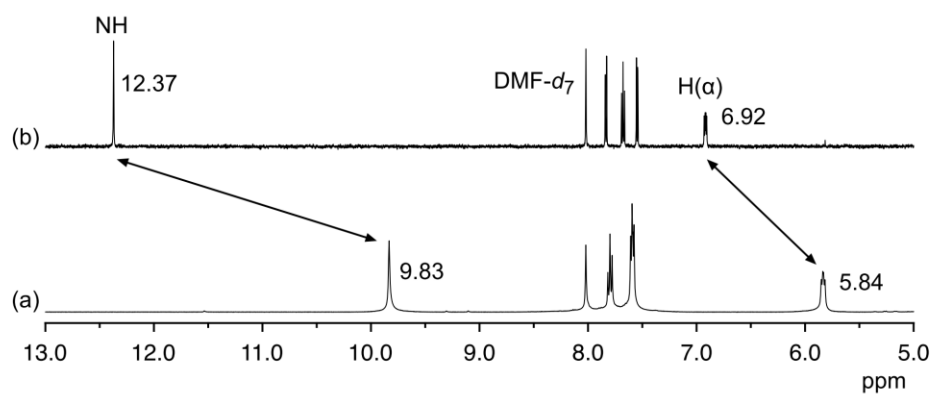


Figure S1: Sections of the ¹H NMR spectra between 13.0 and 5.0 ppm of **1** in DMF-*d*₇ in the absence (a) and in the presence of 0.5 equiv of tetramethylammonium sulfate. The signals of the NH and H(α) protons of **1** are marked to illustrate the effect of the salt on their chemical shifts.

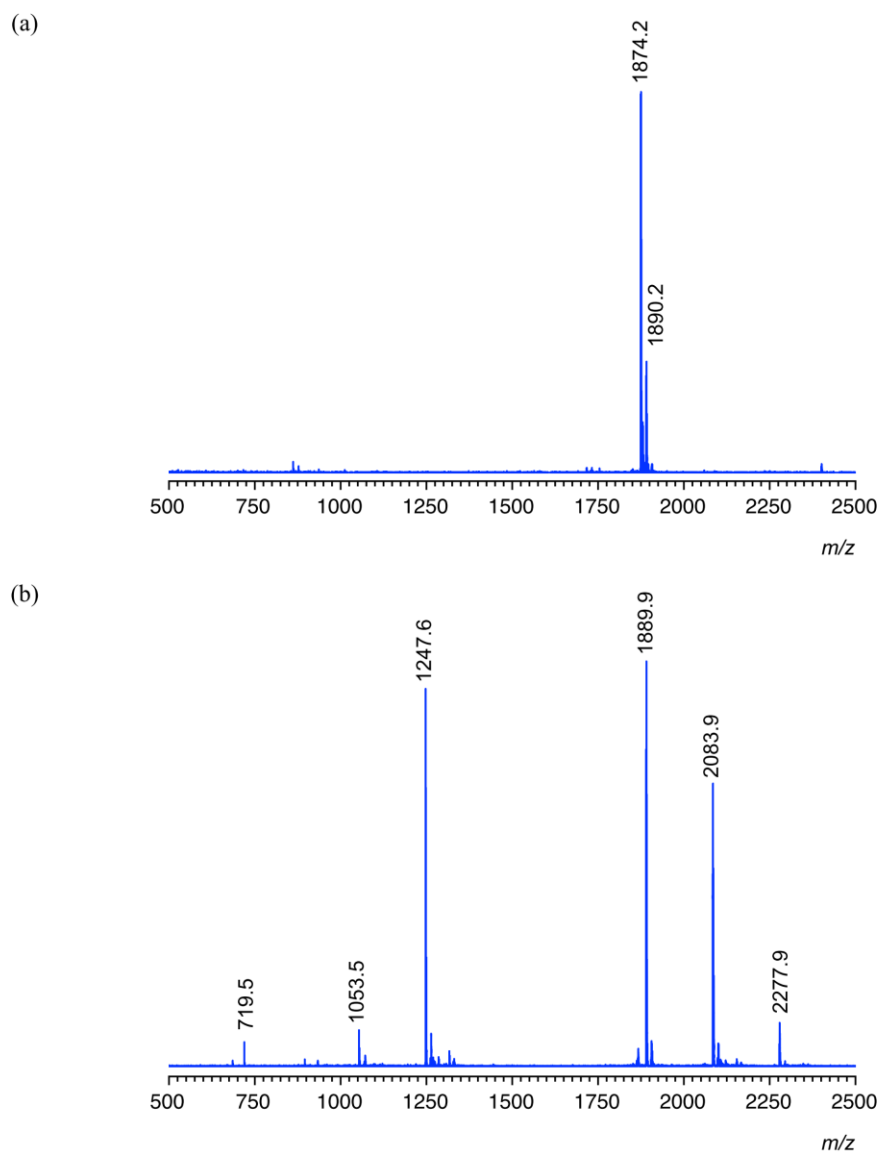
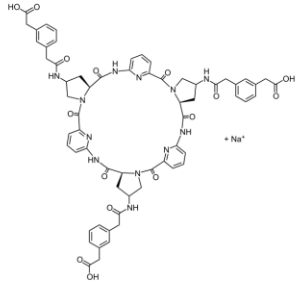
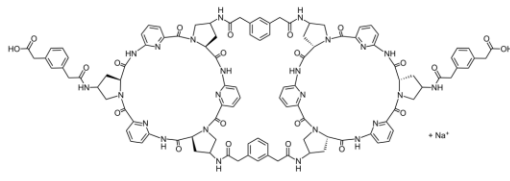
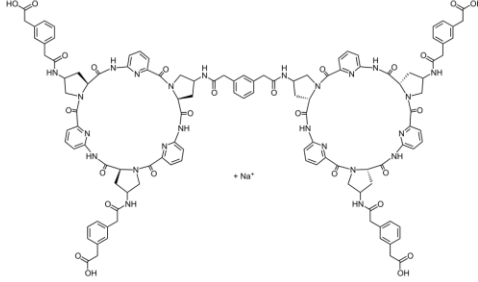
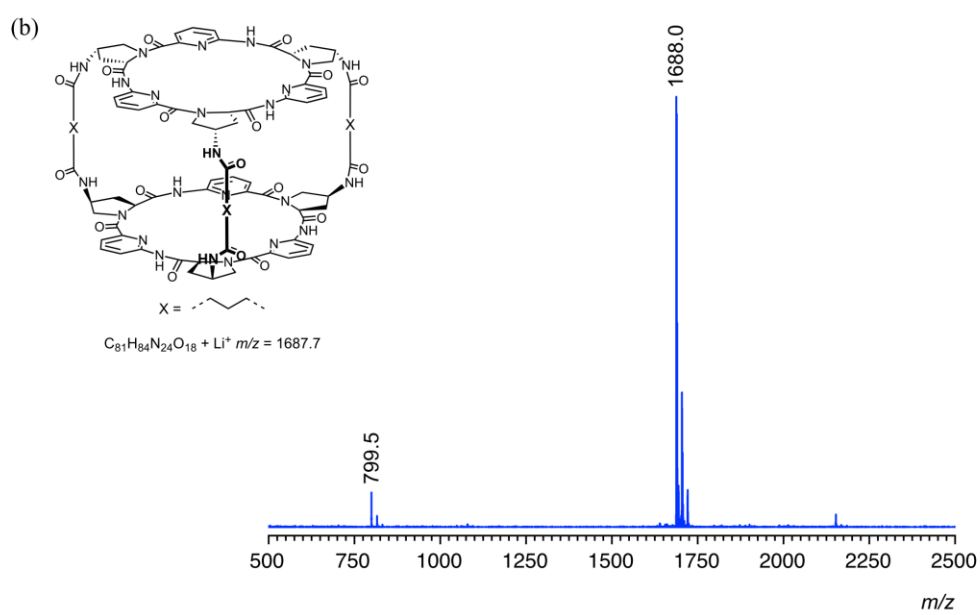
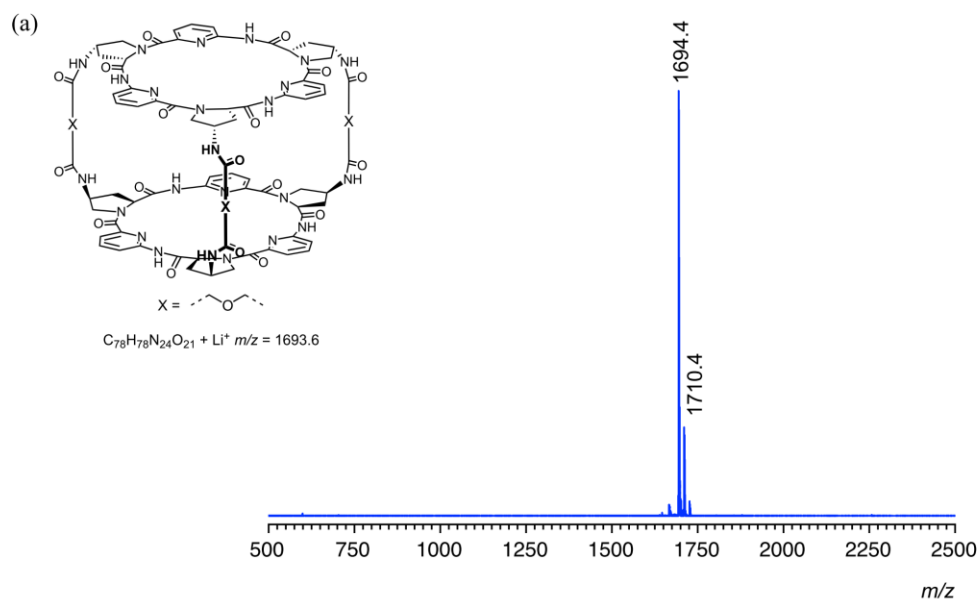


Figure S2: MALDI-TOF mass spectra in the positive mode of the product mixture resulted from treating **4** in DMF with 1.5 equiv of the bis(pentafluorophenol) ester **5c** in the presence (a) and in the absence of 0.5 equiv of tetramethylammonium sulfate. The assignments of the observed peaks to the compositions of the respective ions are listed in the following table.

<i>m/z</i> exp.	assignment	composition	<i>m/z</i> calcd.
1874.2	2c + Li ⁺	C ₉₆ H ₉₀ N ₂₄ O ₁₈ + Li ⁺	1873.7
1247.6	 + Na ⁺	C ₆₃ H ₆₀ N ₁₂ O ₁₅ + Na ⁺	1247.2
1889.9	2c + Na ⁺	C ₉₆ H ₉₀ N ₂₄ O ₁₈ + Na ⁺	1889.7
2083.9	 + Na ⁺	C ₁₀₆ H ₁₀₀ N ₂₄ O ₂₂ + Na ⁺	2083.7
2277.9	 + Na ⁺	C ₁₁₆ H ₁₁₀ N ₂₄ O ₂₆ + Na ⁺	2277.8



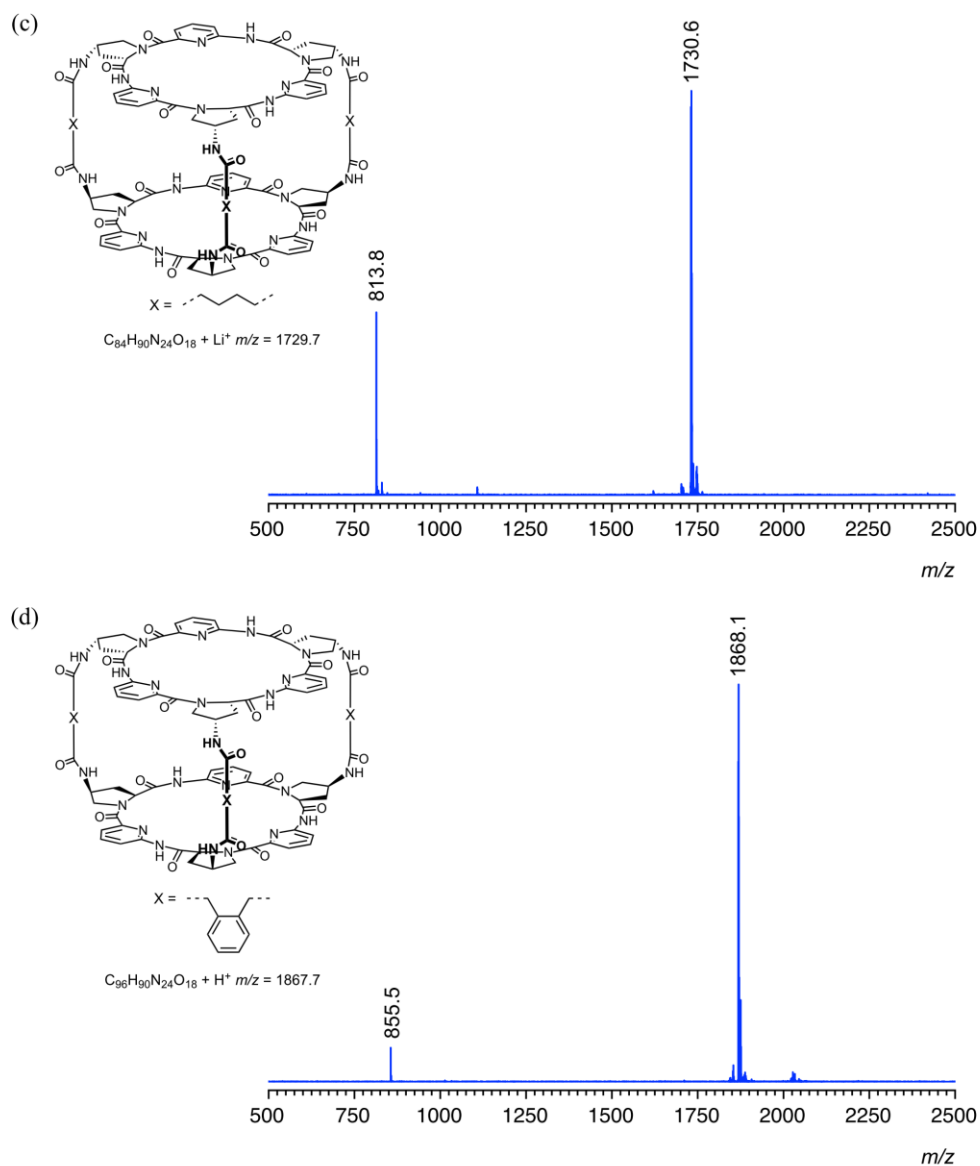


Figure S3: MALDI-TOF mass spectra in the positive mode of the product mixture resulted from treating **4** in DMF with 1.5 equiv of the bis(pentafluorophenol) esters **5b** (a), **5d** (b), **5e** (c), and **5f** (d) in the presence of 0.5 equiv of tetramethylammonium sulfate. The assignment of the observed major peak to the composition of the respective ion is included into each spectrum.

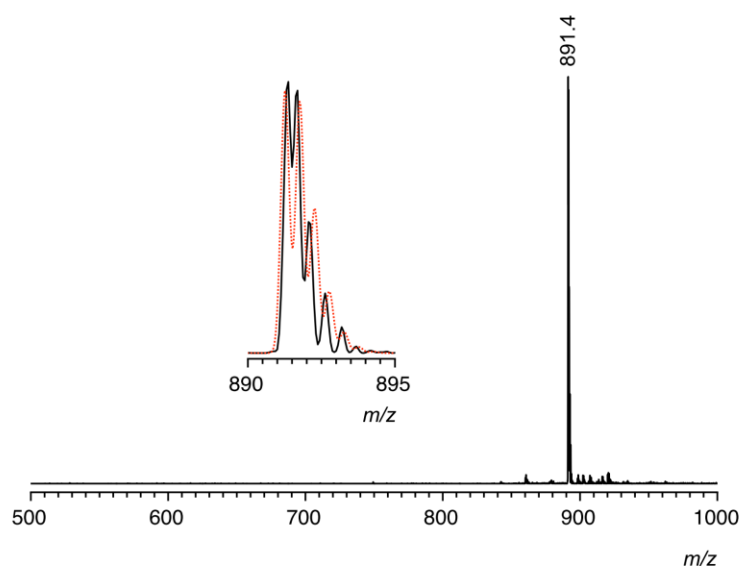


Figure S4: ESI-TOF mass spectrum in the negative mode of the sulfate complex of **2b** in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 1:1 (v/v). The inset shows an enlarged section of the spectrum in the region containing the major peak to illustrate its isotope pattern. The red dotted line shows the calculated spectrum for an ion with the composition of **2b** + SO_4^{2-} ($\text{C}_{78}\text{H}_{78}\text{N}_{24}\text{O}_{21}$ + SO_4^{2-} m/z (calcd.) = 891.3).

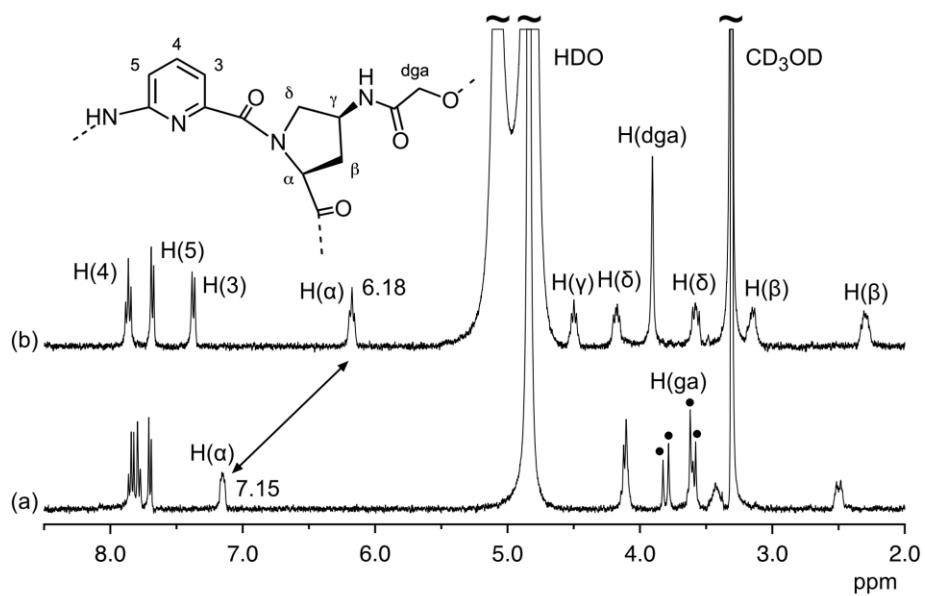


Figure S5: Sections of the ^1H NMR spectra between 8.5 and 2.0 ppm of the sulfate complex of **2b** before (a) and after (b) the addition of 1.1 equiv of barium triflimide (b) in $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$, 1:1 (v/v). The peak assignment is shown in the structure.

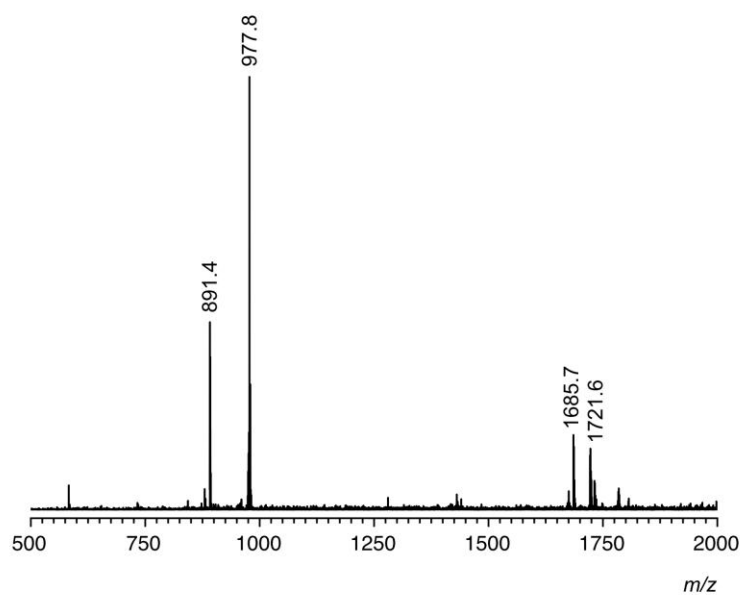


Figure S6: ESI-TOF mass spectrum in the negative mode of the sulfate complex of **2b** after the addition of 1.1 equiv of barium triflimide in CH₃OH/H₂O, 1:1 (v/v). The assignments of the observed peaks to the compositions of the respective ions are listed in the following table.

<i>m/z</i> exp.	assignment	composition	<i>m/z</i> calcd.
891.4	2b + SO ₄ ²⁻	C ₇₈ H ₇₈ N ₂₄ O ₂₁ + SO ₄ ²⁻	891.3
977.8	[Ba(triflimide) ₃] ⁻	Ba ²⁺ + 3(C ₂ F ₆ NO ₄ S ₂) ⁻	977.7
1685.7	2b -H ⁺	C ₇₈ H ₇₇ N ₂₄ O ₂₁ ⁻	1685.6
1721.6	2b + Cl ⁻	C ₇₈ H ₇₈ N ₂₄ O ₂₁ + Cl ⁻	1721.6

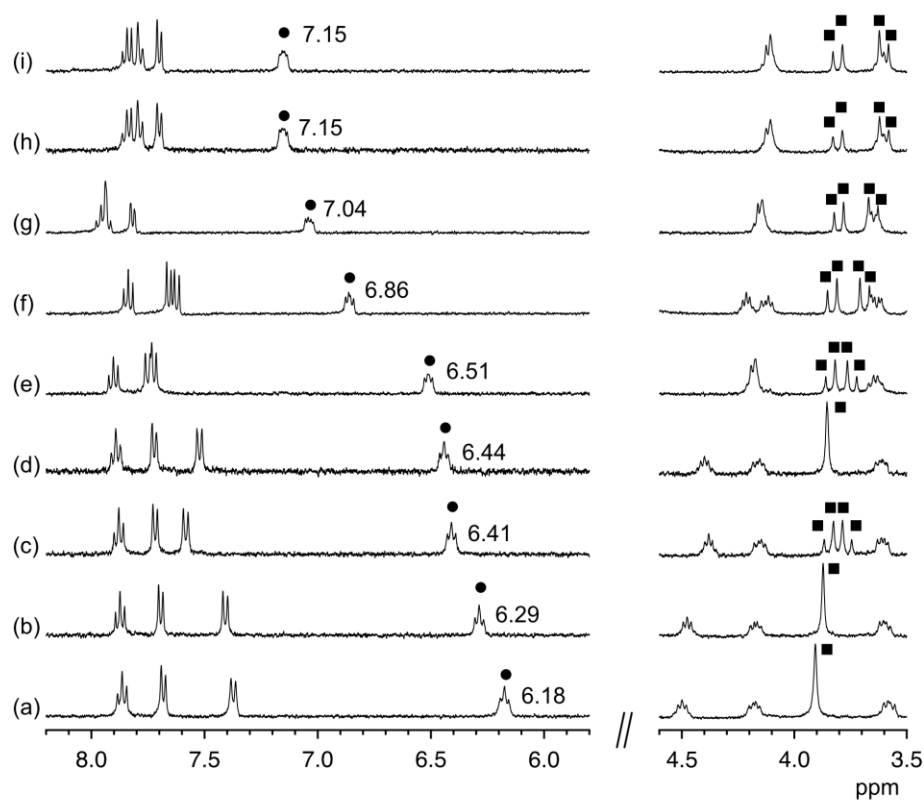


Figure S7: Sections of the ¹H NMR spectra between 8.2 and 5.8 ppm and between 4.6 and 3.5 ppm of the sulfate complex of **2b** (i) in CD₃OD/D₂O, 1:1 (v/v), of the sulfate complex after the addition of 1.1 equiv of barium triflimide (a), and of this solution after the addition of 1.0 equiv of either NaCl (b), NaNO₃ (c), NaBr (d), NaReO₄ (e), Na₂SeO₄ (f), NaI (g), or Na₂HPO₄ (h). The signals of the proline H(α) protons and the linker protons are marked with circles and squares, respectively.

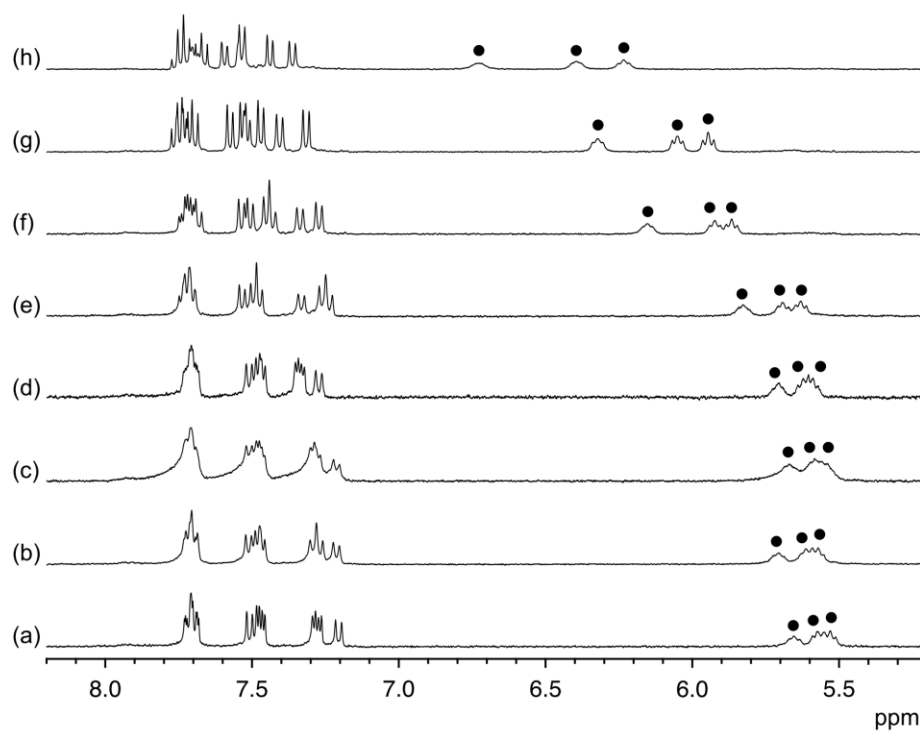
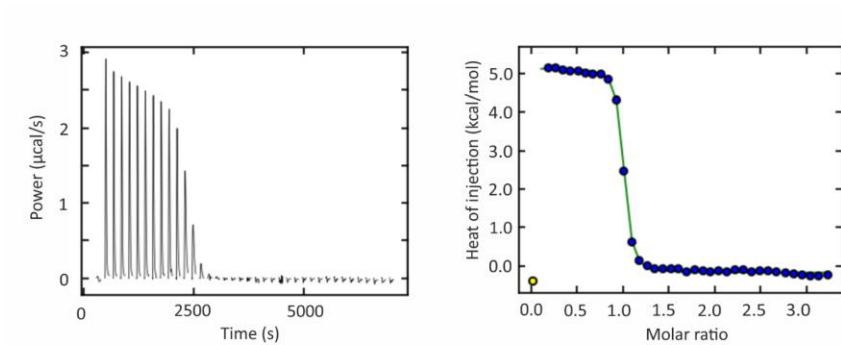
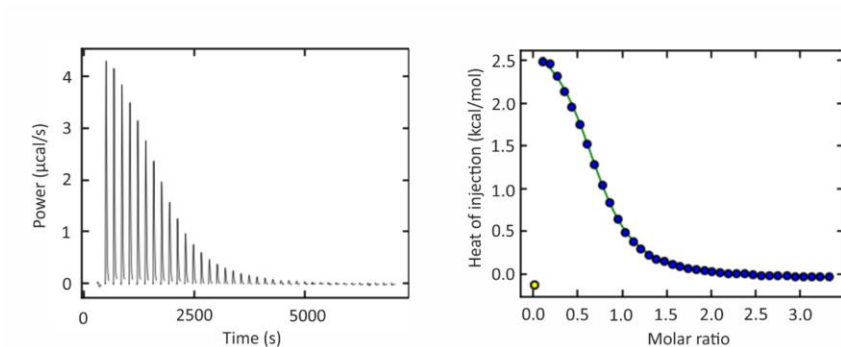


Figure S8: Sections of the ^1H NMR spectra between 8.2 and 5.2 ppm of **3b** (1 mM) in $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2:1 (v/v). In the absence (a) and in the presence of 1 equiv of NaCl (b), NaNO_3 (c), NaReO_4 (d), NaBr (e), Na_2SeO_4 (f), NaI (g), and Na_2SO_4 (h). The signals of the proline $\text{H}(\alpha)$ protons are marked with circles.

(a) Titration of **2b** with Na₂SO₄



(b) Titration of **2b** with NaI



(c) Titration of **3b** with Na₂SO₄

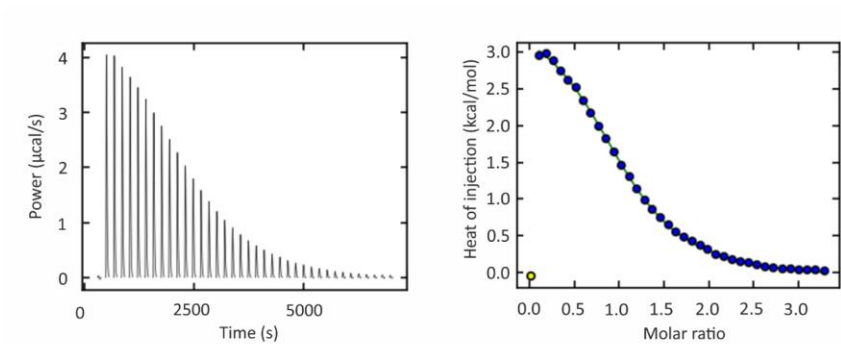


Figure S9: Selected thermograms and binding isotherms observed in the ITC measurements for the investigated complexes of **2b** and **3b**.

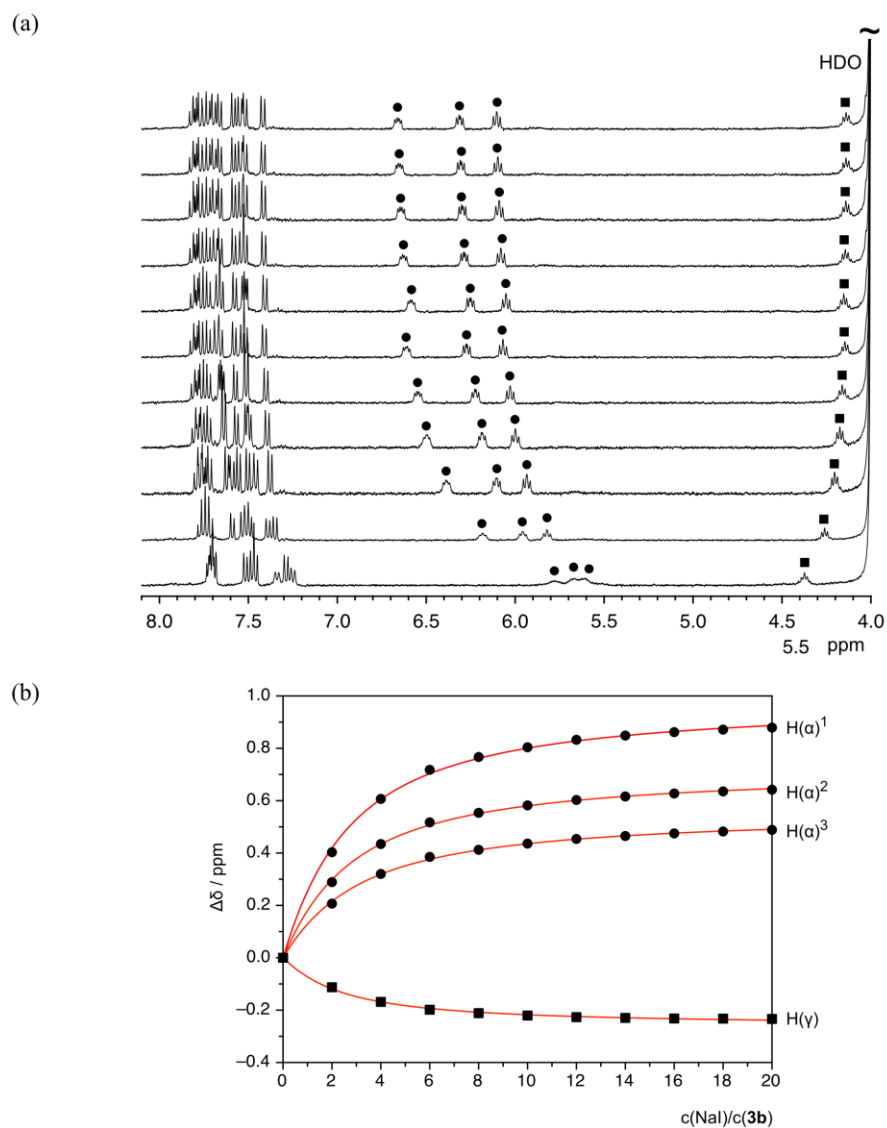


Figure S10: ^1H NMR spectra of **3b** $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2:1 (v/v) containing between 0 equiv (bottom) and 20 equiv (top) of NaI in steps of 2 equiv (a). The progressive shifts of the H(α) (circles) and H(γ) (squares) signals were recorded and used to construct the binding isotherms in (b) that allowed calculating the stability constant of the respective complex by fitting them to a 1:1 complexation equilibrium. The dots in the graphs represent the experimental results and the lines show the isotherms calculated for thus determined stability constant.

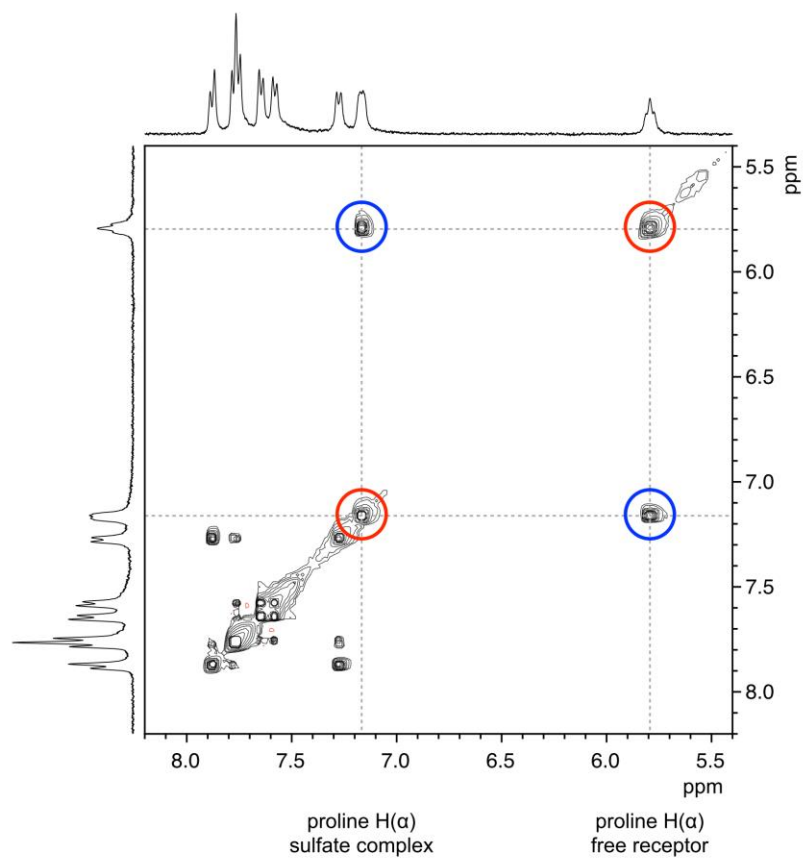


Figure S11: NOESY NMR spectrum of **2b** (1 mM) in CD₃CN/D₂O, 2:1 (v/v) containing 0.5 equiv of Na₂SO₄, which was used to determine the first-order magnetization rate constants (mixing time 0.25 s). The diagonal exchange peaks used for the calculation are marked with red and blue circles, respectively.

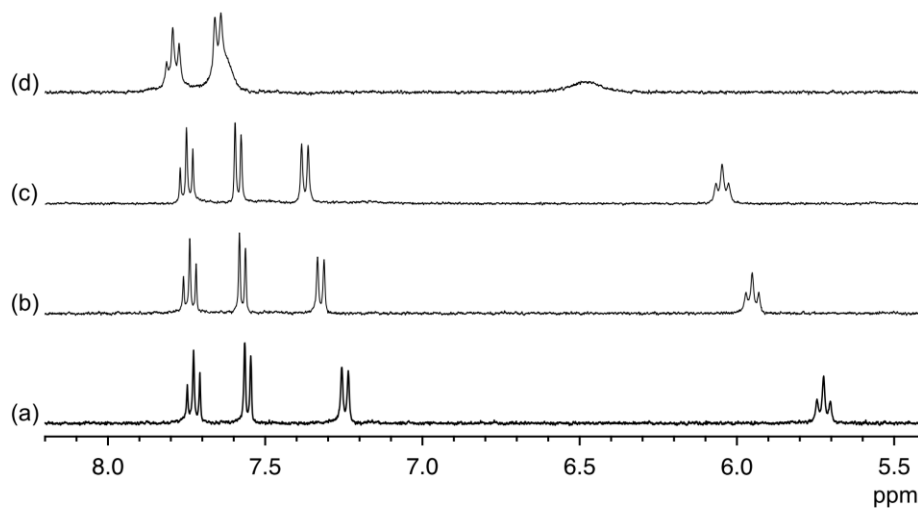


Figure S12: Sections of the ^1H NMR spectra between 8.2 and 5.4 ppm of **2b** (1 mM) in $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 2:1 (v/v). In the absence (a) and in the presence of 0.5 equiv of NaCl (b), NaBr (c), and NaI (d).

References

- [1] T. Fiehn, R. Goddard, R. W. Seidel, S. Kubik, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7241–7255.
- [2] S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C. A. Brautigam, P. Schuck, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5066–5073.
- [3] J. C. D. Houtman, P. H. Brown, B. Bowden, H. Yamaguchi, E. Appella, L. E. Samelson, P. Schuck, *Protein Sci.* **2007**, *16*, 30–42.
- [4] <http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedphat/download.htm>.
- [5] EXSYCalc, Version 1.0, Mestrelab Research, free download available from www.mestrelab.com.

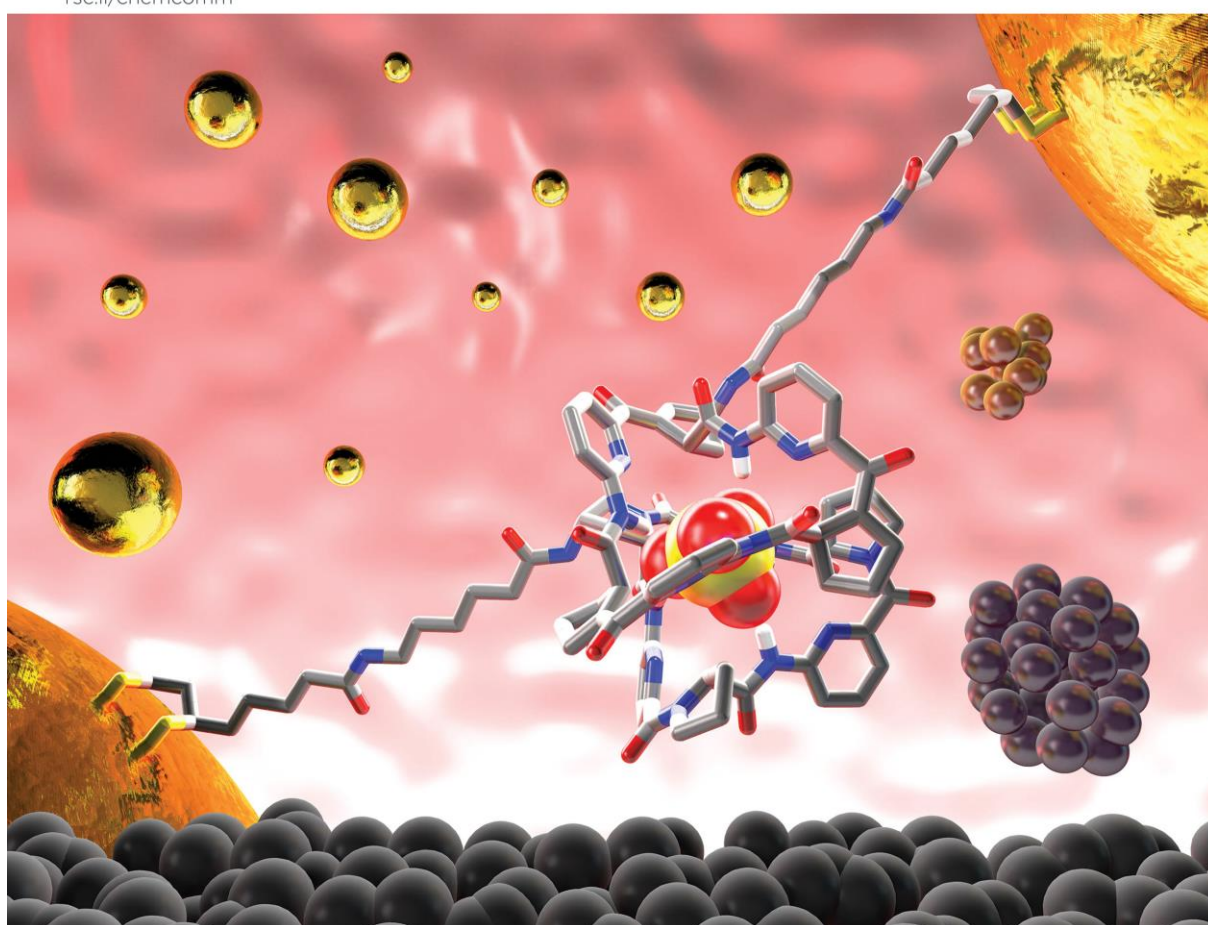
6.5 Veröffentlichte Publikation zu Projekt B

Volume 56
Number 72
16 September 2020
Pages 10381-10578

ChemComm

Chemical Communications

rsc.li/chemcomm



ISSN 1359-7345

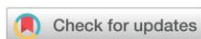


ROYAL SOCIETY
OF CHEMISTRY

COMMUNICATION

Stefan Kubik *et al.*

Selective sensing of sulfate anions in water with
cyclopeptide-decorated gold nanoparticles



Selective sensing of sulfate anions in water with cyclopeptide-decorated gold nanoparticles†

 Julia Bartl,^a Lena Reinke,^a Marcus Koch^b and Stefan Kubik^b *^a

 Cite this: *Chem. Commun.*, 2020, 56, 10457

 Received 12th July 2020,
Accepted 21st August 2020

DOI: 10.1039/d0cc04796a

rsc.li/chemcomm

The interaction of cyclopeptides bound to the surface of mixed monolayer-protected gold nanoparticles with sulfate anions causes the crosslinking and concomitant precipitation of the nanoparticles from aqueous solutions even in presence of an excess of competing anions, thus allowing the naked eye detection of sulfate in water.

Optical probes are useful tools to assess the quality of water. Acid–base indicators allow the rapid determination of the pH, for instance, while probes relying on supramolecular principles can be used to detect organic compounds, or inorganic cations or anions.¹ Especially when it comes to anions there are a number of relevant analytes.² Examples are phosphate and nitrate, which are responsible for the eutrophication of rivers and lakes, toxic anions such as cyanide, chromate, or arsenate, radioactive perchlorate anions, and also perchlorate, sulfate and others.³ Probes for these anions can be based on receptors whose binding to the substrate triggers a change in the optical properties of an attached chromophore (direct sensing) or a non-covalently bound dye (indirect sensing).^{1d} A challenge when designing such probes is that they have to overcome the intrinsic difficulties associated with the recognition of inorganic anions in water,⁴ but existing optical probes demonstrate that anion sensing in water is possible.^{2c}

Optical probes can also be based on polymeric materials or nanoparticles.^{5,6} These systems potentially benefit from the fact that binding takes place not in water but in an environment characterised also by the polymeric matrix or the nanoparticle ligands. Other advantages are the modular synthesis that facilitates structural variations and the relatively easy integration into devices. Gold nanoparticles (AuNPs) are a particularly

attractive basis for such probes because they can be decorated with a wide variety of recognition units and because sensing can rely on their intensive colour.⁶ Analytes inducing AuNP crosslinking, for example, either cause the decolourisation of the solution due to nanoparticle precipitation, or the shift of the characteristic surface plasmon resonance (SPR) band in the UV-vis spectrum. This concept, illustrated in Fig. 1a, has been used to detect metal ions,^{7a} carboxylic acids,^{7b} amino acids,^{7c–e} peptides,^{7e,f} proteins,^{7g,h} and nucleic acids^{7i,j} but not often to sense inorganic anions.

Examples are AuNPs with surface-bound amide groups that aggregated in dichloromethane in the presence of various oxoanions, especially H_2PO_4^- ,⁸ or those with imidazolium groups that responded to the presence of PF_6^- anions.⁹ Kim *et al.* found that the cyanide-induced dissociation of the copper(II)–phenanthroline complex induced the aggregation of an ATP-stabilised AuNP,¹⁰ and the Mirkin group showed that nitrite anions mediated the covalent crosslinking of appropriately functionalised AuNPs.¹¹ A calix[4]pyrrole-decorated AuNP was furthermore shown by the Sessler group to aggregate in dichloromethane in the presence of a bis(imidazolium) ion and halides, especially chloride and fluoride.¹²

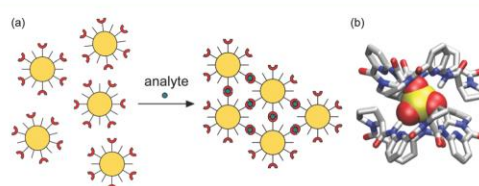


Fig. 1 Illustration of the analyte-induced crosslinking of gold nanoparticles with surface-bound receptors of which two units are required for analyte recognition (a). To illustrate the binding mode of the receptor used in this work, the structure of the 2:1 cyclopeptide/sulfate complex, which was calculated on the basis of the crystal structure of the respective iodide complex, is depicted in (b).^{14c} Protons except those on nitrogen atoms are omitted for reasons of clarity.

^a Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie – Organische Chemie, Erwin-Schrödinger-Straße, 67663 Kaiserslautern, Germany.
E-mail: kubik@chemie.uni-kl.de

^b INM – Leibniz Institute for New Materials, Campus D2 2, 66123 Saarbrücken, Germany

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthetic details, NMR, and mass spectra of compounds 1–5, nanoparticle synthesis, characterisation, and results of the binding studies. See DOI: 10.1039/d0cc04796a

Note that other strategies to detect anions by surface-modified AuNPs exist. Anion binding can alternatively be sensed electrochemically,^{13a} by the effects of anion binding on the optical properties of a surface-bound chromophore,^{13b} or indirectly by the release of a nanoparticle-bound dye.^{13c,d}

We expected the anion-binding cyclopeptide developed some time ago in our group to also represent a useful building block for AuNP-based optical probes because its propensity to form sandwich complexes in aqueous media, with the anion bound between two cyclopeptide rings, should allow it to induce AuNP crosslinking (Fig. 1b).¹⁴ Complex formation moreover proceeds cooperatively (the formation of the 2:1 complex from the 1:1 complex has a significantly larger K_a than the formation of the 1:1 complex) so that 2:1 complexes dominate even if the anion is present in excess. Here we show that immobilising the cyclopeptide onto AuNPs together with solubilising triethylene glycol units indeed affords AuNPs that precipitate from water upon the addition of a sulfate salt, thus allowing the detection of this strongly hydrated and therefore difficult to bind anion with the naked eye.¹⁵

Nanoparticle synthesis was based on a modified Turkevich method that involved rapidly adding a hot aqueous solution of tetrachloroauric(III) acid to aqueous sodium citrate at 100 °C.¹⁶ The resulting citrate-protected AuNPs were initially treated with ligand **1**, containing a triethylene glycol unit linked to (*R*)-lipoic acid *via* an amide group, which was prepared in a four-step synthesis (Fig. 2). We chose lipoic acid as the anchor group because of the simpler synthesis (no deprotection is required prior to immobilisation as in the case of thiols), the small tendency of lipoic acid-derived ligands to migrate on the AuNP surface, and the higher stability of the corresponding AuNPs with respect to thiol-containing ones.¹⁷ The resulting AuNPs **NP^{TEG}** did not contain citrate after purification and dispersed freely in water. They had an average diameter of 10.2 ± 1.8 nm according to transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 3a), consistent with the maximum of the SPR band in the UV-vis spectrum at 523 nm (Fig. S1, ESI†).

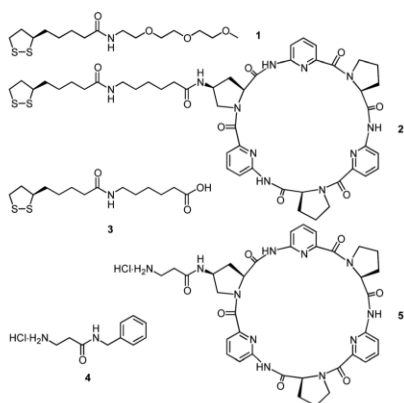


Fig. 2 Molecular structures of ligands **1–3** and compounds **4** and **5**.

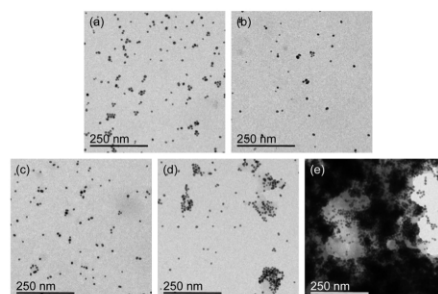


Fig. 3 Transmission electron microscopic images of nanoparticles **NP^{TEG}** (a), **NP^{Bn}** (b), and **NP^{CP}** in the absence of anions (c) and of **NP^{CP}** 5 min (d) and 30 min (e) after the addition of Na_2SO_4 .

The simultaneous immobilisation of **1** and the cyclopeptide-containing ligand **2** was attempted in a similar manner. Ligand **2** contained the known anion-binding cyclopeptide¹⁸ linked to (*R*)-lipoic acid *via* a C_6 spacer unit to ensure a sufficient distance of the receptor from the AuNP surface and to thus allow two cyclopeptides on different particles to simultaneously interact with an anion. An excess of **1** was used to reduce the probability of the formation of AuNPs in which receptors residing on the same nanoparticle engage in analyte binding. The number of cyclopeptide residues should still be high enough to ensure that AuNP crosslinking benefits from multivalent interactions. The NMR spectroscopic characterisation of the obtained AuNPs unfortunately showed that they contained no cyclopeptide or only a small amount. One reason for the lack of reaction of **2** with the AuNP could have been the low solubility of the cyclopeptide-containing ligand in the aqueous medium in which the exchange reaction was performed, but the presence of co-solvents such as methanol or DMF did not improve the outcome. We therefore chose another strategy to access the mixed monolayer-protected nanoparticle.

In this approach, a mixed monolayer-protected AuNP **NP^{COOH}** containing a mixture of ligands **1** and the carboxylic acid **3** was initially prepared. **NP^{COOH}** was then treated as described previously for the synthesis of other systems¹⁹ with an amine and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) as the coupling reagent to obtain the corresponding functionalised AuNP. To test the feasibility of this approach, **NP^{COOH}** was first reacted with the benzylamine derivative **4** (Fig. 2). Signals in the aromatic region of the ^1H NMR spectrum of the purified product **NP^{Bn}** demonstrated that the coupling reaction indeed yielded the desired mixed product. Relating the integrals of the signals to those of ligand **1** furthermore showed that the ratio of **1** and the functionalised ligand amounted to ca. 2:1 (Fig. S2a, ESI†). Considering that a 9:1 ratio of **1** and **3** was used in the synthesis of **NP^{COOH}**, the degree of functionalisation of **NP^{Bn}** was higher than expected, suggesting that **3** had a larger tendency to react with the citrate-protected AuNP than **1**. No further variation of the reaction conditions was nevertheless performed but we instead tested whether the

cyclopeptide-derived amine **5** could also be coupled with NP^{COOH} . Gratifyingly, the treatment of NP^{COOH} with an excess of **5** in the presence of EDC afforded the AuNP NP^{CP} with surface-bound TEG and cyclopeptide residues in the expected 2:1 ratio as a water-soluble and stable product. The average diameters of NP^{Bn} and NP^{CP} were similar to those of NP^{TEG} as were the wavelengths of the absorption maxima of the SPR bands (Fig. 3b, c, Fig. S2 and S3, ESI†).

With two AuNPs in hand, one containing a receptor known to interact with anions in water, especially sulfate and iodide, and one lacking specific receptor units, we evaluated their response to potential analytes. To this end, a series of NP^{CP} solutions were prepared in water. Increasing amounts of the sodium salts of various anions (Cl^- , Br^- , I^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , HAsO_4^{2-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, NO_3^-) were added, and their effects on the colour of the solutions inspected. No effects were observed during the initial additions until a salt concentration of 2.5 mM was reached, when the solution containing sodium sulfate became turbid (Fig. 4a). When left standing, the AuNPs in this solution settled at the bottom of the vial as a black precipitate, while the supernatant solution remained light purple (Fig. 4b). No changes were visible at the same salt concentration in the other solutions, even when they were kept overnight. Under the same conditions, NP^{Bn} reacted to none of the tested anions (Fig. 4c), showing that the receptors immobilised on the surface of NP^{CP} were responsible for the response to an anion for which these cyclopeptides are known to have a pronounced affinity.¹⁴

To determine the minimum sulfate concentration required to induce a colour change, UV-vis spectra were recorded of a series of solutions containing NP^{CP} and varying concentrations of Na_2SO_4 (0–12.5 mM). An AuNP concentration of 0.25 mg mL^{-1} was chosen to ensure that the absorption of the solution without salt at the wavelength of the SPR band was < 1 . Spectral changes were observed in this experiment only when the Na_2SO_4 concentration was at least 2 mM (Fig. S4a, ESI†), with higher sulfate concentrations mainly causing the rate but not

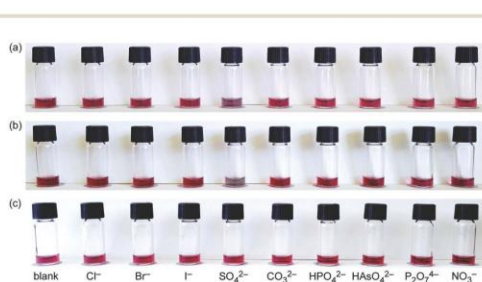


Fig. 4 Photographs of the series of experiments used to qualitatively assess the response of NP^{CP} and NP^{Bn} to the presence of various anions. The image in (a) was taken 5 min after the addition of the anions specified below the vials to NP^{CP} and the image in (b) 30 min after the salt addition. The image in (c) shows the response of NP^{Bn} to the same anions after 30 min. The amount of AuNP was 0.25 mg mL^{-1} and the salt concentrations were 2.5 mM in the samples. All salts were used as sodium salts.

the extent of precipitation to increase. The solution with the sulfate concentration that just induced precipitation thus afforded a spectrum after 30 min that was similar to the one obtained after 5 min at a 5 mM sulfate concentration (Fig. S4b, ESI†). Accordingly, the extent of precipitation did not shift continuously when increasing the analyte concentration but exhibited a relatively sharp transition from the non-associated to the associated state once a certain limiting concentration was surpassed, which is the hallmark of systems whose final state is stabilized by multiple cooperative interactions.²⁰

No changes in the UV-vis spectrum were observed when the solution contained 2.5 mM NaI instead of Na_2SO_4 (Fig. S5, ESI†). This lack of response to iodide was unexpected because the immobilised cyclopeptide normally also possesses affinity for this anion in water.¹⁴ Some cyclopeptide derivatives even have a similar affinity for iodide in water as for sulfate.^{14b} In aqueous solvent mixtures containing, for example, methanol as the organic component, sulfate affinity of the cyclopeptides is, however, always substantially higher than iodide affinity and the high sulfate selectivity of NP^{CP} could therefore be due to a reduced permittivity of the environment close to the nanoparticle surface with respect to that of water.

The Na_2SO_4 addition mainly affected the intensity of the SPR band but not the absorption wavelength, showing that the anion caused nanoparticle precipitation rather than the formation of soluble aggregates. TEM images supported this assumption. In the absence of sulfate anions, individual nanoparticles of NP^{CP} were dispersed in solution (Fig. 3c). The addition of sodium sulfate induced aggregation, initially leading to smaller aggregates comprising 20–60 nanoparticles (Fig. 3d and Fig. S6a, ESI†). After 30 min, large globular aggregates dominated with only a few AuNPs left that did not participate in the interaction (Fig. 3e and Fig. S6b, ESI†). These images thus demonstrated that the cyclopeptides indeed induced the expected nanoparticle crosslinking.

To test whether NP^{CP} responded to sulfate also in the presence of an excess of competing anions, a solution of the AuNPs was prepared in which NaCl and Na_2HPO_4 were present at concentrations of 23 mM each. This solution did not differ in colour from a solution of NP^{CP} in water, showing that both salts did not induce nanoparticle aggregation even at concentrations substantially higher than in the other binding study. A distinct colour change was observed, however, when sodium sulfate was additionally present at a concentration of 2.3 mM (Fig. 5). A ten times higher concentration of chloride and hydrogen phosphate anions thus did not interfere in the interaction of NP^{CP} with sulfate anions.

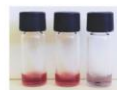


Fig. 5 Photograph of the solutions of the competition experiment. The left vial only contains NP^{CP} (0.25 mg mL^{-1}) the centre vial additionally contains NaCl and Na_2HPO_4 (23.3 mM each), and the right vial NaCl (23.3 mM), Na_2HPO_4 (23.3 mM), and Na_2SO_4 (2.3 mM).

Our investigations thus demonstrated that immobilising receptors on the surface of nanoparticles known to form complexes in which two receptor units have to come together to interact with an anion represents a promising strategy to achieve anion detection in water. The advantage of this approach is that the selectivity of anion detection can be tuned by the nature of the receptor. Sensing also benefits from the multiple interactions of the receptor units, which act cooperatively and thus cause nanoparticle precipitation to occur at a certain analyte concentration. The easily discernible change of the AuNP aggregation state thus not only provides evidence that the analyte is present but also that its concentration exceeds a certain value. In the case of NP^{CP}, this concentration amounts to ca. 2 mM (when using 0.25 mg mL⁻¹ of NP^{CP}), which is close to the threshold concentration at which mineral water is considered to be sulfate-rich and thus slightly bitter tasting (>200 mg L⁻¹ or >2.1 mM).²¹ In terms of selectivity and sensitivity, NP^{CP} is therefore useful for practical applications and we expect that its properties can further be fine-tuned by varying the content or the structure of the cyclopeptide-containing ligand or the nature of the ligand that mediates water solubility.

We thank Dr Disha Mungalpara and Dr Fabian Sommer for help in early experiments. This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KU 925/10-1). The generous support is greatly appreciated.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Notes and references

- (a) E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 687–699; (b) M. T. Albelda, J. C. Frías, E. García-España and H.-J. Schneider, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 3859–3877; (c) J. Wu, B. Kwon, W. Liu, E. V. Anslyn, P. Wang and J. S. Kim, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 7893–7943; (d) L. You, D. Zha and E. V. Anslyn, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 7840–7892; (e) H. Sharma, N. Kaur, A. Singh, A. Kuwar and N. Singh, *J. Mater. Chem. C*, 2016, **4**, 5154–5194; (f) D. Wu, A. C. Sedgwick, T. Gunnlaugsson, E. U. Akkaya, J. Yoon and T. D. James, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 7105–7123.
- (a) R. Martínez-Mañez and F. Sancenón, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 4419–4476; (b) N. H. Evans and P. D. Beer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 11716–11754; (c) P. A. Gale and C. Caltagirone, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 4212–4227; (d) N. Busschaert, C. Caltagirone, W. Van Rossom and P. A. Gale, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 8038–8155; (e) P. A. Gale, E. N. W. Howe and X. Wu, *Chem.*, 2016, **1**, 351–422; (f) P. Molina, F. Zapata and A. Caballero, *Chem. Rev.*, 2017, **117**, 9907–9972; (g) L. Chen, S. N. Berry, X. Wu, E. N. W. Howe and P. A. Gale, *Chem.*, 2020, **6**, 61–141.
- (a) I. Ravikumar and P. Ghosh, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 3077–3098; (b) M. Cametti and K. Rissanen, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 2016–2038; (c) C. Warwick, A. Guerreiro and A. Soares, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **41**, 1–11; (d) R. Dutta and P. Ghosh, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 9070–9084.
- (a) S. Kubik, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 3648–3663; (b) E. A. Kataev and C. Müller, *Tetrahedron*, 2014, **70**, 137–167; (c) M. J. Langton, C. J. Serpell and P. D. Beer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2016, **55**, 1974–1987.
- H. N. Kim, Z. Guo, W. Zhu, J. Yoon and H. Tian, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 79–93.
- (a) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 4128–4158; (b) A. Verma and V. M. Rotello, *Chem. Commun.*, 2005, 303–312; (c) G. Zhang, *Nanotechnol. Rev.*, 2013, **2**, 269–288; (d) C. Wang and C. Yu, *Rev. Anal. Chem.*, 2013, **32**, 1–14; (e) C. Pezzato, S. Maiti, J. L.-Y. Chen, A. Cazzolaro, C. Gobbo and L. J. Prins, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 9922–9931.
- (a) G. Sener, L. Uzun and A. Denizli, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 18395–18400; (b) S. Sistach, K. Rahme, N. Pérignon, J.-D. Marty, N. Lauth-de Viguierie, F. Gauffre and C. Mingotaud, *Chem. Mater.*, 2008, **20**, 1221–1223; (c) H. M. Zakaria, A. Shah, M. Konieczny, J. A. Hoffmann, A. J. Nijdam and M. E. Reeves, *Langmuir*, 2013, **29**, 7661–7673; (d) M. Doyen, J. Goole, K. Bartik and G. Bruylants, *J. Colloid Interface Sci.*, 2016, **464**, 160–166; (e) A. Martínez and P. Scrimin, *Biopolymers*, 2018, **109**, e23111; (f) S. Zhang, J. Wang, L. Han, C. Li, W. Wang and Z. Yuan, *Sens. Actuators, B*, 2010, **147**, 687–690; (g) M. Retout, H. Valkenier, E. Triffaux, T. Doneux, K. Bartik and G. Bruylants, *ACS Sens.*, 2016, **1**, 929–933; (h) M. J. Eibling, C. M. MacDermid, Z. Qian, C. J. Lanci, S.-J. Park and J. G. Saven, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 17811–17823; (i) R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger and C. A. Mirkin, *Science*, 1997, **277**, 1078–1081; (j) C. S. Thaxton, D. G. Georganopoulou and C. A. Mirkin, *Clin. Chim. Acta*, 2006, **363**, 120–126.
- S. Watanabe, M. Sonobe, M. Arai, Y. Tazume, T. Matsuo, T. Nakamura and K. Yoshida, *Chem. Commun.*, 2002, 2866–2867.
- H. Itoh, K. Naka and Y. Chujo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 3026–3027.
- M. H. Kim, S. Kim, H. H. Jang, S. Yi, S. H. Seo and M. S. Han, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 4712–4716.
- W. L. Daniel, M. S. Han, J.-S. Lee and C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 6362–6363.
- A. Aydogan, G. Lee, C.-H. Lee and J. L. Sessler, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 2368–2376.
- (a) A. Labande, J. Ruiz and D. Astruc, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 1782–1789; (b) P. D. Beer, D. P. Cormode and J. J. Davis, *Chem. Commun.*, 2004, 414–415; (c) J. Massue, S. J. Quinn and T. Gunnlaugsson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6900–6901; (d) P. Sokkalingam, S.-J. Hong, A. Aydogan, J. L. Sessler and C.-H. Lee, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 5860–5867.
- (a) S. Kubik, *Acc. Chem. Res.*, 2017, **50**, 2870–2878; (b) F. Sommer, Y. Marcus and S. Kubik, *ACS Omega*, 2017, **2**, 3669–3680; (c) S. Kubik, R. Goddard, R. Kirchner, D. Nolting and J. Seidel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 2648–2651.
- For the optical sensing of sulfate anions in water using boehmite-based nanoparticles, see: E. Delgado-Pinar, C. Rotger, A. Costa, M. N. Piña, H. R. Jiménez, J. Alarcón and E. García-España, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 2609–2611.
- I. Ojea-Jiménez, N. G. Bastús and V. Puentes, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 15752–15757.
- (a) K. Susumu, E. Oh, J. B. Delehanty, J. B. Blanco-Canosa, B. Johnson, V. Jain, W. J. Herve, W. R. Algar, K. Boeneman, P. Dawson and I. L. Medintz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 9480–9496; (b) B. C. Mei, K. Susumu, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, T. J. Mountziaris and H. Mattoussi, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 4949–4958; (c) E. Oh, J. B. Delehanty, C. A. Klug, K. Susumu, W. R. Algar, R. Goswami and I. L. Medintz, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 1956–1959.
- (a) S. Kubik, R. Kirchner, D. Nolting and J. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 12752–12760; (b) T. Fiehn, R. Goddard, R. W. Seidel and S. Kubik, *Chem. – Eur. J.*, 2010, **16**, 7241–7255.
- (a) S. Roux, B. Garcia, J.-L. Bridot, M. Salomé, C. Marquette, L. Lemelle, P. Gillet, L. Blum, P. Perriat and O. Tillement, *Langmuir*, 2005, **21**, 2526–2536; (b) D. Bartzczak and A. G. Kanaras, *Langmuir*, 2011, **27**, 10119–10123.
- (a) C. A. Hunter and H. L. Anderson, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 7488–7499; (b) C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kokschi, J. Darnedde, C. Graf, E.-W. Knapp and R. Haag, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 10472–10498.
- M. van der Aa, *Environ. Geol.*, 2003, **44**, 554–563.

Electronic Supplementary Material (ESI) for Chemical Communications.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

Chem. Commun.

Selective sensing of sulfate anions in water with cyclopeptide-decorated gold nanoparticles

Julia Bartl,^a Lena Reinke,^a Marcus Koch^b and Stefan Kubik ^{*,a}

^a *Fachbereich Chemie - Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße, 67663 Kaiserslautern, Germany.*

^b *INM - Leibniz Institute for New Materials, Campus D2 2, 66123 Saarbrücken, Germany.*

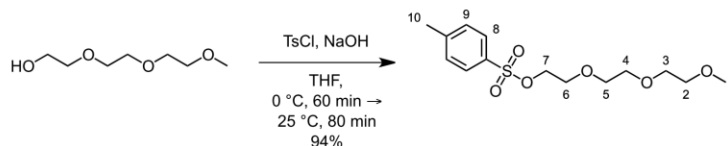
CONTENT

Syntheses of Compounds 1-5	S2
NMR and Mass Spectra of Compounds 1-5	S10
Nanoparticle Synthesis and Characterisation	S20
Binding Studies	S26
References	S30

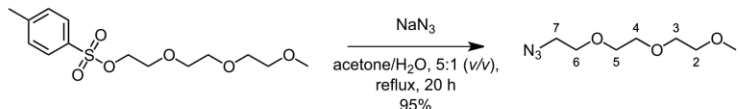
Syntheses of Compounds 1-5

General details. Solvents were dried according to standard procedures prior to use if necessary. Starting materials and reagents were commercially available and were used without further purification. Analyses were carried out as follows: ATR-IR, Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR-Spectrometer with Universal ATR Sampling Accessory Unit; Centrifuge, Eppendorf Centrifuge 5702 R; Centrifugal Concentrators, Vivaspin® 15R (MWCO 5000 Da) Sartorius; elemental analysis, Elementar vario Micro cube; ESI-MS, Bruker Esquire 3000 Plus and Esquire 6000; NMR, Bruker AVANCE™ III 400 and 600 (peak assignments were confirmed by using H,H-COSY, HSQC and HMQC spectra, ¹H and ¹³C NMR spectra were referenced to the residual solvent signals (CDCl₃: δ^H = 7.26 ppm, δ^C = 77.2 ppm; DMSO-*d*₆: δ^H = 2.50 ppm, δ^C = 39.52 ppm, MeOD-*d*₄: δ^H = 3.31 ppm, δ^C = 49.00 ppm); MALDI-TOF-MS, Bruker Ultraflex TOF/TOF; melting points, Müller SPM-X 300; precision balance, Kern ABT 100-5M; preparative chromatography, silica gel 60 A (0.06-0.20 mm) Acros Organics; preparative HPLC, Dionex UltiMate 3000; column, ThermoFisher BetaBasic-18, 250 × 21.2 mm, 5 μm particle size; temperature, 25 °C; flow, 10 mL/min; eluent, water/acetonitrile with the following gradient: 0-5 min, 10% acetonitrile; 5-31 min, linear increase of organic to 90%; 31-40 min, 90% acetonitrile; 40-41 min, linear decrease to 10% organic; 41-42 min, 10% acetonitrile; size exclusion chromatography, Sephadex® LH-20 and G-10 GE Healthcare; reversed-phase chromatography, RP-8 POLYGOPREP® 60-50 C8 (40–63 μm) Macherey Nagel; TEM, JEOL JEM-2100 LaB6 Transmission Electron Microscope equipped with a Gatan Orius SC1000 CCD camera; UV-vis, Varian Cary 100.

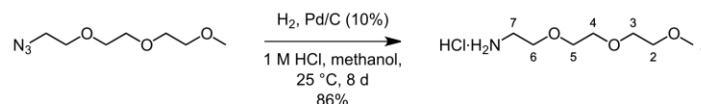
The following abbreviations are used: Ala, β-alanine; Apa, 6-aminopicolinic acid; Pro, L-proline; Apro (4*S*,2*S*)-4-aminoproline; AuNP, gold nanoparticle; TBTU, *O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tetramethyluronium tetrafluoroborate; EDC, *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride; DIPEA, ethyldiisopropylamine; sulfo-NHS, *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt.

2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate¹

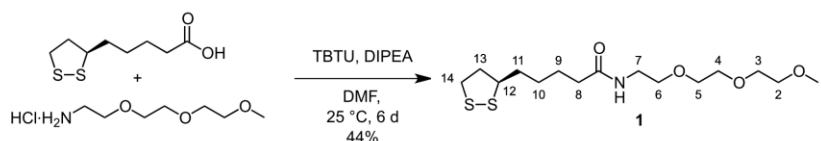
Triethylene glycol monomethylether (8.21 g, 50.0 mmol) was dissolved in THF (15 mL) and the resulting solution cooled to 0 °C. A solution of NaOH (3.86 g, 96.5 mmol) in water (16 mL) was added dropwise under stirring followed by a solution of *p*-tosyl chloride (12.4 g, 65.0 mmol) in THF (18 mL). The reaction mixture was stirred for 60 min at 0 °C and further 80 min at 25 °C. Afterwards, the solution was diluted with diethyl ether (125 mL) and 1 M NaOH (40 mL) and the aqueous phase was separated. The organic phase was washed with water (2 × 50 mL) dried over MgSO₄ and concentrated in vacuo. Yield: 15.0 g (47.1 mmol, 94%) colourless oil; ¹H NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 7.78 (m, 2H, H⁸), 7.33 (m, 2H, H⁹), 4.15 (t, 2H, ³J = 4.0 Hz, H⁷), 3.67 (t, 2H, ³J = 4.0 Hz, H⁶), 3.51-3.61 (m, 8H, H², H³, H⁴, H⁵), 3.36 (s, 3H, H¹), 2.44 (s, 3H, H¹⁰) ppm.

1-Azido-2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethane¹

2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (7.96 g, 25.0 mmol) and sodium azide (2.44 g, 37.5 mmol) were dissolved in acetone (30 mL) and water (6 mL). The mixture was heated to reflux for 20 h. Afterwards, the acetone was removed *in vacuo* and the remaining solution was diluted with water (20 mL). The reaction mixture was extracted with diethyl ether (4 × 20 mL), the combined organic phases were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Yield: 4.51 g (23.8 mmol, 95%) colourless oil; ¹H NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 3.64-3.68 (m, 8H, H², H³, H⁴, H⁵), 3.53-3.57 (m, 2H, H⁶), 3.37-3.39 (m, 5H, H¹, H⁷) ppm.

2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)ethanamine Hydrochloride

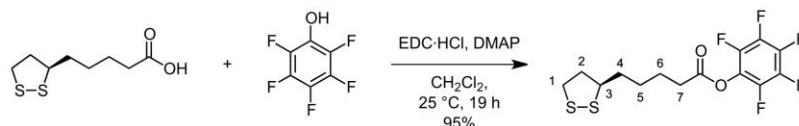
1-Azido-2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethane (5.67 g, 30.0 mmol) was dissolved in methanol (100 mL). A suspension of Pd/C (570 mg, 10 weight%) in water (5 mL) and 1 M aqueous HCl (33.0 mL, 33.0 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 8 d at 25 °C under an atmosphere of hydrogen. Afterwards, the catalyst was removed by filtering the reaction mixture through celite, and the filtrate was evaporated to dryness. Yield: 5.17 g (25.9 mmol, 86%) pale yellow oil; ¹H NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 6.31 (s, 2H, NH), 3.77 (t, 2H, ³J = 4.0 Hz, H²), 3.61-3.68 (m, 6H, H³, H⁴, H⁵), 3.35-3.39 (m, 5H, H¹, H⁶), 3.05-3.15 (m, 2H, H⁷) ppm.

Ligand 1

(*R*)-Lipoic acid (4.12 g, 20.0 mmol) and 1-azido-2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethane (5.17 g, 25.9 mmol) were dissolved in DMF (50 mL). TBTU (8.31 g, 25.9 mmol) and DIPEA (13.2 mL, 77.7 mmol) were added and the reaction mixture was stirred for 6 d at 25 °C. Afterwards, the solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified chromatographically over silica (EtOAc/petroleum ether, 2:1 (v/v) → acetone). The thus obtained crude product was further purified by preparative HPLC. Pure fractions were collected and evaporated to dryness. Yield: 3.11 g (8.84 mmol, 44%) pale yellow oil; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = 57.2$ ($c = 1$, methanol), ¹H NMR (400 MHz, 25 °C, MeOD-*d*₄): δ = 3.52-3.65 (m, 11H, H², H³, H⁴, H⁵, H⁶, H¹²), 3.34-3.36 (m, 5H, H¹, H⁷), 3.07-3.21 (m, 2H, H¹⁴), 2.43-2.50 (m, 1H, H¹³), 2.21 (t, 2H, ³J = 8.0 Hz, H⁸), 1.85-1.93 (m, 1H, H¹³), 1.60-1.72 (m, 4H, H⁹, H¹¹), 1.39-1.53 (m, 2H, H¹⁰) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, 25 °C, MeOD-*d*₄): δ = 176.1 (CO), 72.9 (C²), 71.6 + 71.4 + 71.2 + 70.6 (C³ + C⁴ + C⁵ + C⁶), 59.1 (C¹), 57.6 (C⁷), 41.3 (C¹²), 40.4 (C¹⁴), 39.4 (C¹³), 36.8 (C⁸), 35.8 (C¹¹), 29.9 (C⁹), 26.7 (C¹⁰) ppm; MS (MALDI-TOF) *m/z* (%): 352.3 [M+H]⁺ (100%), 374.3 [M+Na]⁺ (7%); IR (ATR): 311 (w), 2923 (m), 2863 (m), 1646 (s), 1095 (s), 850 (w) cm⁻¹; CHN

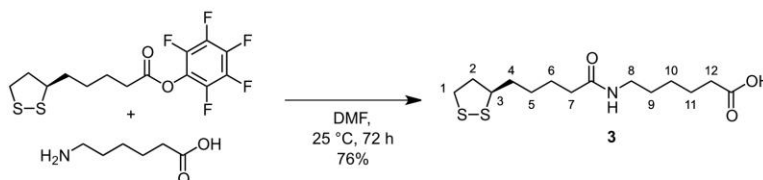
calculated for $C_{15}H_{29}NO_4S_2 \cdot 0.75H_2O$: C, 49.35%, H, 8.42%, N, 3.84%, S, 17.57%, found: C, 49.24%, H, 8.09%, N, 3.68%, S, 17.39 %.

(R)-Perfluorophenyl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate



(*R*)-Lipoic acid (2.06 g, 10.0 mmol) and pentafluorophenol (2.02 g, 11.0 mmol) were dissolved in dichloromethane (40 mL). A solution of EDC·HCl (2.11 g, 11.0 mmol) and DMAP (122 mg, 1.00 mmol) in dichloromethane (20 mL) was added dropwise under stirring. The reaction mixture was stirred for 19 h at 25 °C. The solution was washed with water (3 × 20 mL). The organic phase was dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. Yield: 3.55 g (9.53 mmol, 95%) yellow oil; 1H NMR (400 MHz, 25 °C, $CDCl_3$): δ = 3.56-3.62 (m, 1H, H^3), 3.10-3.23 (m, 2H, H^1), 2.69 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, H^7), 2.44-2.51 (m, 1H, H^2), 1.88-1.97 (m, 1H, H^2), 1.69-1.86 (m, 4H, H^4 , H^6), 1.51-1.65 (m, 2H, H^5) ppm.

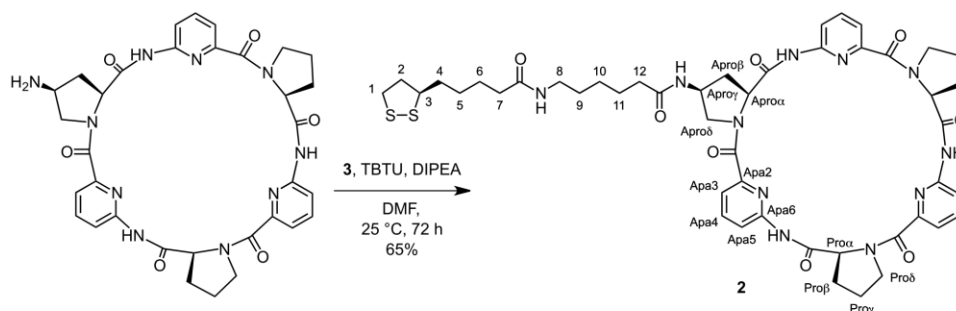
Ligand 3



6-Aminohexanoic acid (1.19 g, 9.07 mmol) and (*R*)-perfluorophenyl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate (3.71 g, 9.98 mmol) were dissolved in DMF (40 mL). The mixture was stirred for 72 h at 25 °C. The solvent was removed *in vacuo*, the residue was dissolved in dichloromethane (50 mL) and washed with 1 M aqueous HCl (2 × 30 mL) and water (30 mL). The organic phase was dried over $MgSO_4$, the solvent was removed *in vacuo* and the residue was triturated with diethyl ether. The resulting solid was filtered, washed with diethyl ether, and dried. Yield: 2.21 g (6.92 mmol, 76%) pale yellow solid; mp: 79 °C; specific rotation: $[\alpha]_D^{24} = 66.0$ ($c = 0.5$, methanol); 1H NMR (400 MHz, 25 °C, $DMSO-d_6$): δ = 7.76 (t, 1H, $^3J = 5.3$ Hz, NH), 3.56-3.61 (m, 1H, H^3), 3.09-3.19 (m, 2H, H^1), 2.97-

3.02 (m, 2H, H⁸), 2.36-2.44 (m, 1H, H²), 2.18 (t, 2H, ³J = 7.4 Hz, H¹²), 2.03 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, H⁷), 1.83-1.89 (m, 1H, H²), 1.21-1.68 (m, 12H, H⁴, H⁵, H⁶, H⁹, H¹⁰, H¹¹) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, 25 °C, DMSO-*d*₆): δ = 174.6 (COOH), 171.9 (CONH), 56.2 (C³), 38.3 (C¹), 38.2 (C²), 35.3 (C¹²), 34.2 (C⁷), 33.7 (C⁴), 29.0 (C⁹), 28.4 (C⁵), 26.0 (C¹⁰), 25.2 (C⁶), 24.3 (C¹¹) ppm; MS (ESI-TOF, negative mode) *m/z* (%): 318.1 [M-H]⁻ (100%), 354.0 [M+Cl]⁻ (14%), 637.1 [M₂-H]⁻ (31%); IR (ATR): 3299 (w), 2919 (w), 2869 (w), 2852 (w), 1694 (m), 1632 (s), 1534 (s), 1269 (w), 941 (w) cm⁻¹; CHN calculated for C₁₄H₂₅NO₃S₂: C, 52.63%, H, 7.89%, N, 4.38%, S, 20.07%, found: C, 52.46%, H, 7.87%, N, 4.66%, S, 19.69 %.

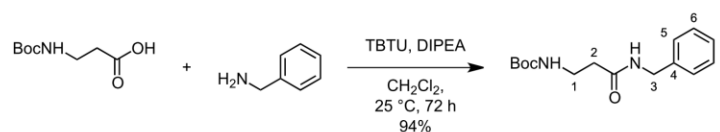
Ligand 2



The synthesis started from the Cbz-protected version of a known cyclopeptide containing one (4*S*,2*S*)-4-aminoproline residue.² The unprotected cyclopeptide was obtained by dissolving the protected form (196 mg, 245 μmol) in dichloromethane/methanol, 1:1 (v/v) (50 mL). 10% Pd/C (25.0 mg) and Pd(OH)₂/C (25.0 mg) were added followed by 1 M aqueous HCl (270 μL, 270 μmol). The reaction mixture was stirred for 4 d at 25 °C under an atmosphere of hydrogen, the catalysts were removed by filtering the mixture through celite, and the filtrate was evaporated to dryness. The thus obtained colourless solid was used in the next step without further purification. This monoamine and **3** (118 mg, 368 μmol) were dissolved in DMF (15 mL). TBTU (118 mg, 368 μmol) and DIPEA (125 μL, 735 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 72 h at 25 °C. Afterwards, the solvent was removed *in vacuo*. The residue was purified by RP-8 column chromatography. Initially, methanol/water, 1:5 (v/v) was used as the eluent. The solvent composition was gradually changed to methanol/water, 1:2 (v/v) and finally to methanol/water, 2:1 (v/v) with which the product eluted. The

fractions containing pure **2** were collected and evaporated to dryness. The residue was dissolved in methanol (5 mL) and the product was precipitated by adding diethyl ether. The solid was centrifuged and dried. Yield: 154 mg (159 μ mol, 65%) pale yellow solid; mp: 202 °C; specific rotation: $[\alpha]_D^{26} = -241.7$ ($c = 0.25$, methanol); $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, 25 °C, MeOD- d_4): $\delta = 7.75$ -7.82 (m, 3H, ApaH⁴), 7.54-7.59 (m, 3H, ApaH³), 7.32-7.43 (m, 3H, ApaH⁵), 5.79-5.83 (m, 1H, AproH ^{α}), 5.61-5.69 (m, 2H, ProH ^{α}), 4.47-4.49 (m, 1H, AproH ^{γ}), 4.02-4.05 (m, 1H, AproH ^{δ}), 3.80-3.84 (m, 2H, ProH ^{δ}), 3.74-3.79 (m, 2H, ProH ^{δ}), 3.69-3.72 (m, 1H, AproH ^{δ}), 3.55-3.59 (m, 1H, H³), 3.14-3.18 (m, 1H, H¹), 3.08-3.11 (m, 1H, H¹), 3.04-3.07 (m, 2H, H⁸), 2.89-2.93 (m, 1H, AproH ^{β}), 2.66-2.69 (m, 2H, ProH ^{β}), 2.42-2.48 (m, 1H, H²), 2.19 (t, 2H, $^3J = 6.0$ Hz, H¹²), 2.06-2.17 (m, 5H, AproH ^{β} + ProH ^{β} + H⁷), 1.99-2.04 (m, 2H, ProH ^{γ}), 1.91-1.97 (m, 2H, ProH ^{γ}), 1.86-1.90 (m, 1H, H²), 1.69-1.74 (m, 1H, H⁴), 1.57-1.66 (m, 3H, H⁴, H⁵), 1.36-1.48 (m, 4H, H⁶, H¹¹), 1.30-1.33 (m, 2H, H⁹), 1.16-1.20 (m, 2H, H¹⁰) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, 25 °C, MeOD- d_4): $\delta = 176.7$ (C¹²CO), 176.3 (C⁷CO), 173.0 (ProCO), 168.8 (ApaCO), 153.2 + 153.1 + 152.5 (ApaC⁶), 150.1 + 150.0 (ApaC²), 140.6 (ApaC⁴), 121.8 (ApaC³), 117.6 + 117.5 (ApaC⁵), 63.5 + 63.4 (ProC ^{α}), 62.2 (AproC ^{α}), 57.7 (C³), 53.5 (AproC ^{δ}), 50.0 + 49.9 (ProC ^{δ}), 48.0 (AproC ^{γ}), 41.3 (C²), 40.1 (C⁸), 39.3 (C¹), 38.8 (AproC ^{β}), 36.9 (C¹²), 36.8 (C⁷), 35.5 (C⁴), 33.9 (ProC ^{β}), 29.8 (C¹¹), 29.7 (C⁹), 27.2 (C¹⁰), 26.7 (C⁶), 26.4 (C⁵), 23.7 + 23.6 (ProC ^{γ}) ppm; IR (ATR): 3270 (w), 2933 (w), 2869 (w), 1704 (w), 1625 (m), 1572 (s), 1532 (s), 1464 (s), 1418 (s), 1398 (s), 1298 (m), 1155 (m), 759 (m) cm^{-1} ; MS (ESI-TOF, negative mode) m/z (%): 966.4 [M-H]⁻ (27%), 1002.4 [M+Cl]⁻ (100%); CHN calculated for C₄₇H₅₇N₁₁O₈S₂·2H₂O: C, 56.22%, H, 6.12%, N, 15.34%, S, 6.39%, found: C, 56.14%, H, 6.08%, N, 15.29%, S, 6.61%.

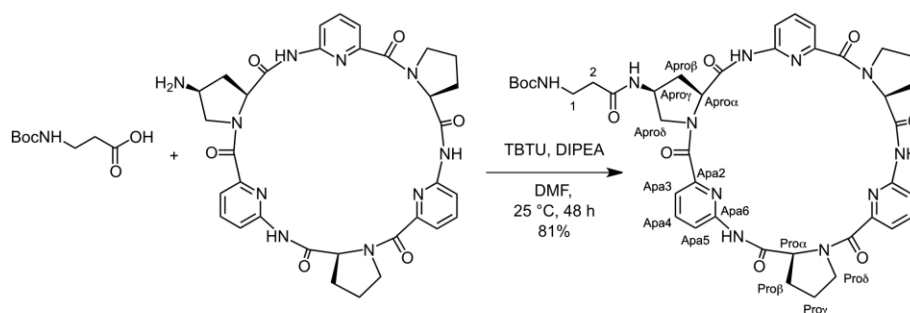
Boc-Protected Precursor of **4**



Boc- β -Alanine (568 mg, 3.00 mmol) and benzylamine (328 μ L, 3.00 mmol) were dissolved in dichloromethane (10 mL). TBTU (1.16 g, 3.60 mmol) and DIPEA (1.53 mL, 9.00 mmol) were added and the reaction mixture was stirred for 72 h at 25 °C. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography (SiO₂, ethyl acetate/hexane, 4:1 (v/v)). Yield: 787

mg (2.83 mmol, 94%) colourless solid; ^1H NMR (600 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 7.32-7.24 (m, 5H, PhH), 6.27 (s, b, 1H, NH), 5.22 (s, b, 1H, NH), 4.41 (d, 2H, 3J = 5.5 Hz, H^3), 3.39 (t, 2H, 3J = 6.0 Hz, H^1), 2.42 (t, 2H, 3J = 5.9 Hz, H^2), 1.40 (s, 9H, BocH) ppm; ^{13}C NMR (151 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ = 171.5 (BnNHCO), 156.3 (BocCO), 138.2 (C^4), 128.8 (C^7), 127.9 (C^6), 127.7 (C^5), 79.5 (BocC), 43.7 (C^3), 36.9 (C^1), 36.4 (C^2), 28.5 (Boc CH_3) ppm; MS (ESI-TOF, positive mode) m/z (%): 301.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (16%), 579.3 $[\text{M}_2+\text{Na}]^+$ (100%); CHN calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 64.73%, H, 7.97%, N, 10.06%, found: C, 64.68%, H, 7.98%, N, 10.06%.

Boc-Protected Precursor of 5



The synthesis started from the Cbz-protected version of a known cyclopeptide containing one (4*S*,2*S*)-4-aminoproline residue.² The unprotected cyclopeptide was obtained by dissolving the protected form (81 mg, 101 μmol) in dichloromethane/methanol, 1:1 (v/v) (50 mL). 10% Pd/C (15.0 mg) and Pd(OH)₂/C (15.0 mg) were added followed by 1 M aqueous HCl (110 μL , 110 μmol). The reaction mixture was stirred for 4 d at 25 °C under an atmosphere of hydrogen, the catalysts were removed by filtering the mixture through celite, and the filtrate was evaporated to dryness. The thus obtained colourless solid was used in the next step without further purification. It was dissolved together with Boc- β -alanine (21.0 mg, 101 μmol) in DMF (10 mL). TBTU (38.9 mg, 121 μmol) and DIPEA (51.5 μL , 303 μmol) were added and the reaction mixture was stirred for 48 h at 25 °C. Afterwards, the solvent was removed *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (SiO_2 , dichloromethane/acetone, 10:1 (v/v) \rightarrow dichloromethane/methanol, 10:1 (v/v) \rightarrow 8:1 (v/v) \rightarrow 5:1 (v/v)). The fractions containing pure product were collected and evaporated to dryness. The residue was dissolved in methanol (5 mL), the product was precipitated by adding diethyl ether, separated by

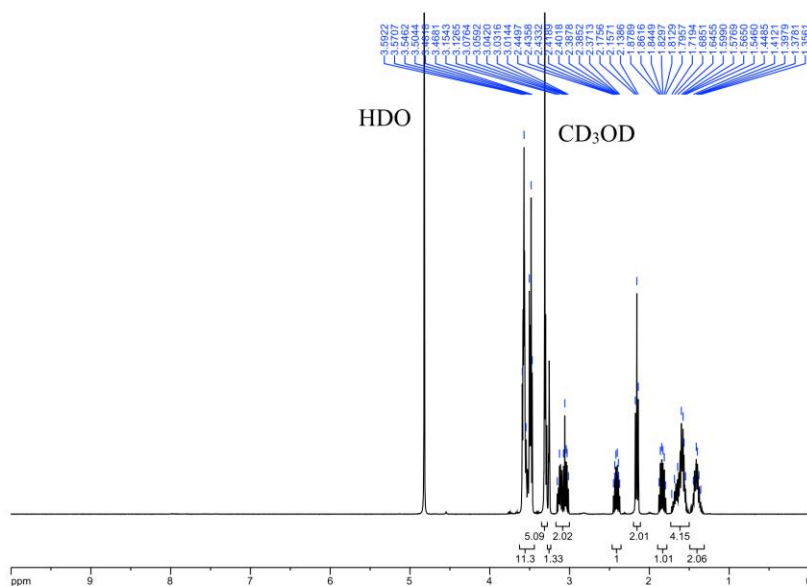
centrifugation and dried. Yield: 69 mg (82 μ mol, 81%) colourless solid; mp: 241 °C; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -359.3$ ($c = 0.5$, methanol); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 25 °C, MeOD- d_4): $\delta = 7.72$ -7.78 (m, 3H, ApaH⁴), 7.57-7.59 (m, 3H, ApaH³), 7.41 (t, 3H, $^3J = 8.0$ Hz, ApaH⁵), 5.90-6.00 (m, 3H, AproH ^{α} + ProH ^{α}), 4.39-4.42 (m, 1H, AproH ^{γ}), 4.04-4.08 (m, 1H, AproH ^{δ}), 3.71-3.84 (m, 4H, ProH ^{δ}), 3.59-3.64 (m, 1H, AproH ^{δ}), 3.19 (t, 2H, $^3J = 6.0$ Hz, H¹), 2.95-3.02 (m, 1H, AproH ^{β}), 2.65-2.69 (m, 2H, ProH ^{β}), 2.22-2.27 (m, 2H, H²), 2.00-2.11 (m, 3H, ProH ^{β} + AproH ^{β}), 1.87-1.96 (m, 4H, ProH ^{γ}), 1.37 (s, 9H, BocH) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, 25 °C, MeOD- d_4): $\delta = 174.1$ (AlaCO), 172.8 + 172.7 (ProCO), 172.2 + 168.7 + 168.5 (ApaCO), 158.2 (BocCO), 153.2 + 153.1 + 152.8 (ApaC⁶), 150.4 + 150.3 + 150.2 (ApaC²), 140.4 + 140.4 + 140.3 (ApaC⁴), 121.8 + 121.7 (ApaC³), 117.6 + 117.4 + 117.4 (ApaC⁵), 80.1 (BocC), 63.7 + 63.6 (ProH ^{α}), 62.5 (AproH ^{α}), 53.6 (AproH ^{δ}), 49.6 (ProH ^{δ}), 48.1 (AproH ^{γ}), 38.5 (AproH ^{β}), 37.9 (C²), 37.3 (C¹), 33.8 (ProH ^{β}), 28.7 (BocCH₃), 23.7 + 23.6 (ProH ^{γ}) ppm; IR (ATR): 3256 (w), 3030 (w), 2979 (w), 2880 (w), 1700 (m), 1627 (m), 1572 (s), 1527 (s), 1465 (m), 1424 (w), 1399 (m), 1296 (w), 1158 (w), 760 (w) cm^{-1} ; MS (MALDI-TOF) m/z (%): 738.2 [M-Boc+H]⁺ (9%), 860.3 [M+Na]⁺ (100%), 876.4 [M+K]⁺ (9%); CHN calculated for C₄₁H₄₇N₁₁O₉·2.5H₂O: C, 55.77%, H, 5.94%, N, 17.45%, found: C, 55.88%, H, 5.74%, N, 17.35%.

Boc-Deprotection of the Precursors of 4 and 5

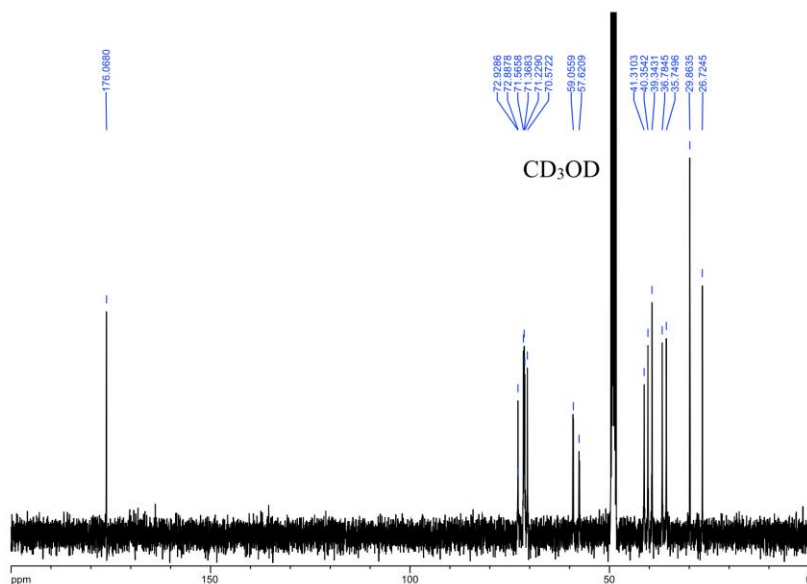
A solution of the Boc-protected amine in 1,4-dioxane (20 mL/mmol) is cooled to 0 °C and a 6 N solution of HCl in 1,4-dioxane (10 mL/mmol) is added dropwise. The reaction mixture is stirred for 20 min at 0 °C and for 2 h at 25 °C. Afterwards, the solvent is removed *in vacuo* and the remaining residue directly used for the nanoparticle functionalisation without further purification.

NMR and Mass Spectra of 1

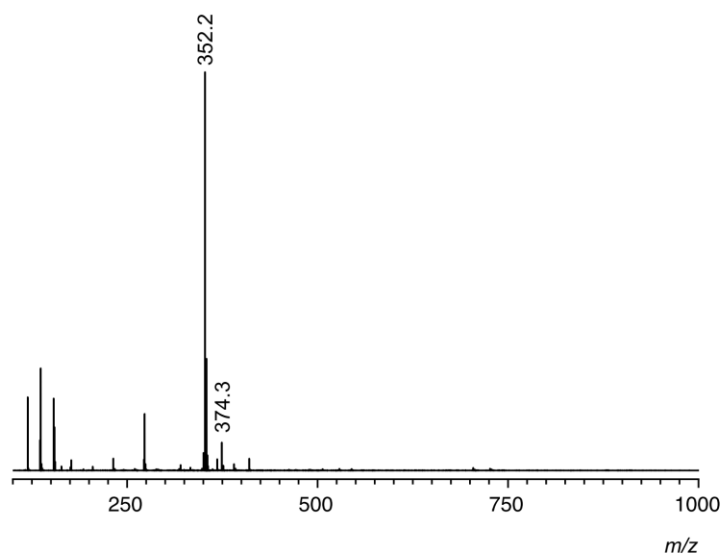
^1H NMR (400 MHz, methanol- d_4)



^{13}C NMR (101 MHz, methanol- d_4)



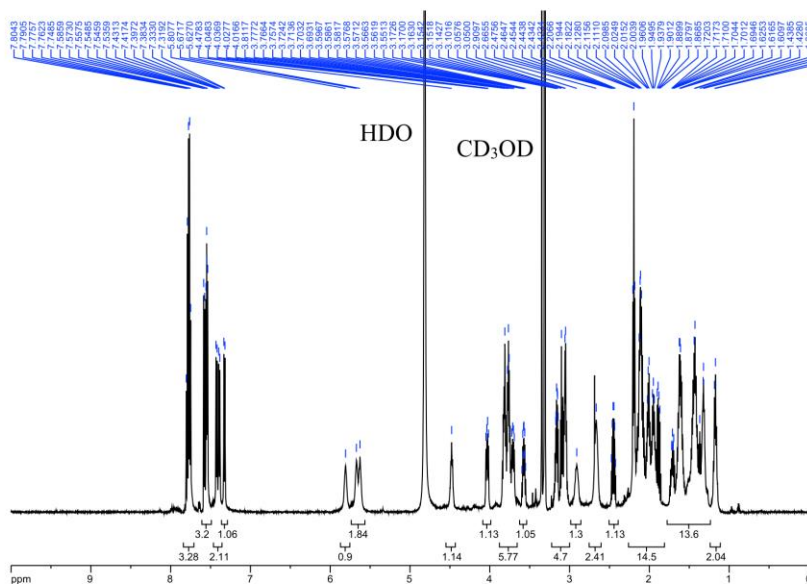
MALDI-TOF MS (positive mode)



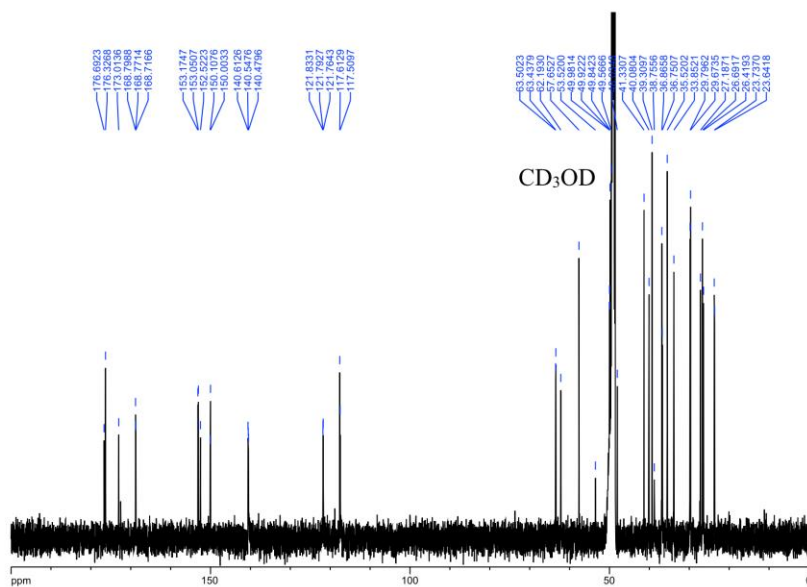
		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M+H]^+$	$C_{15}H_{29}NO_4S_2 + H^+$	352.2	352.3
$[M+Na]^+$	$C_{15}H_{29}NO_4S_2 + Na^+$	374.1	374.3

NMR and Mass Spectra of 2

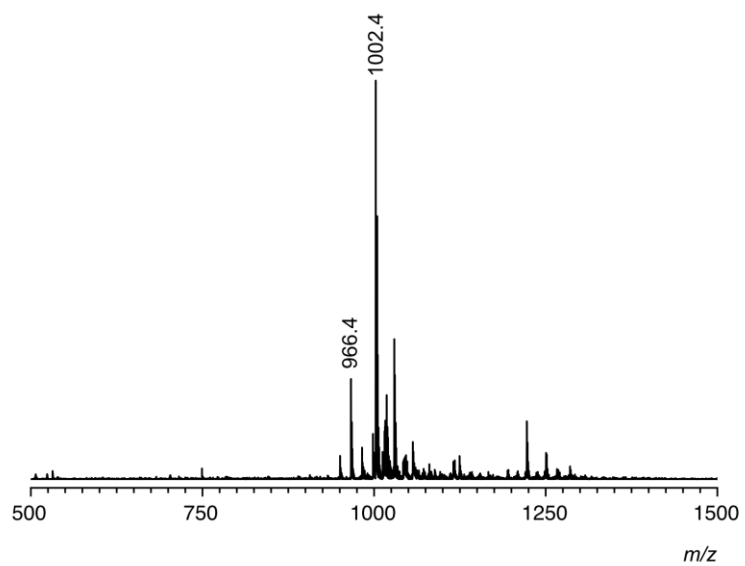
^1H NMR (400 MHz, methanol- d_4)



^{13}C NMR (101 MHz, methanol- d_4)



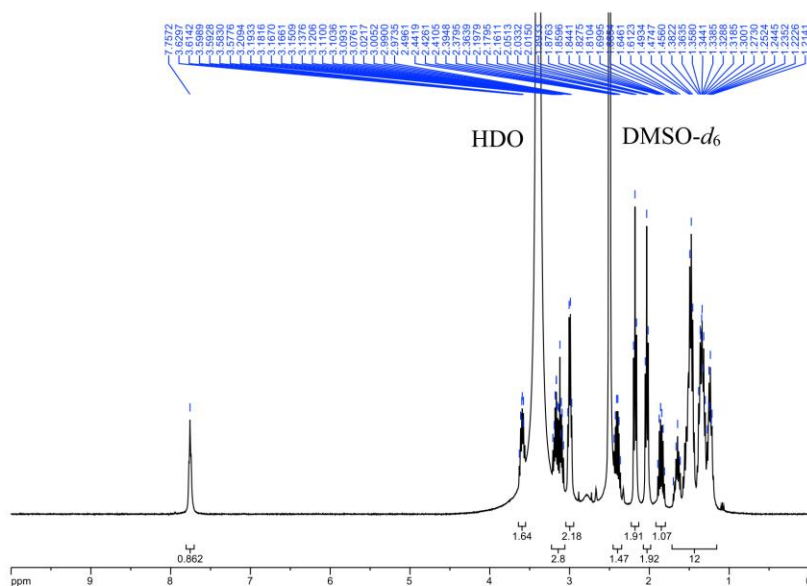
ESI-TOF MS (negative mode)



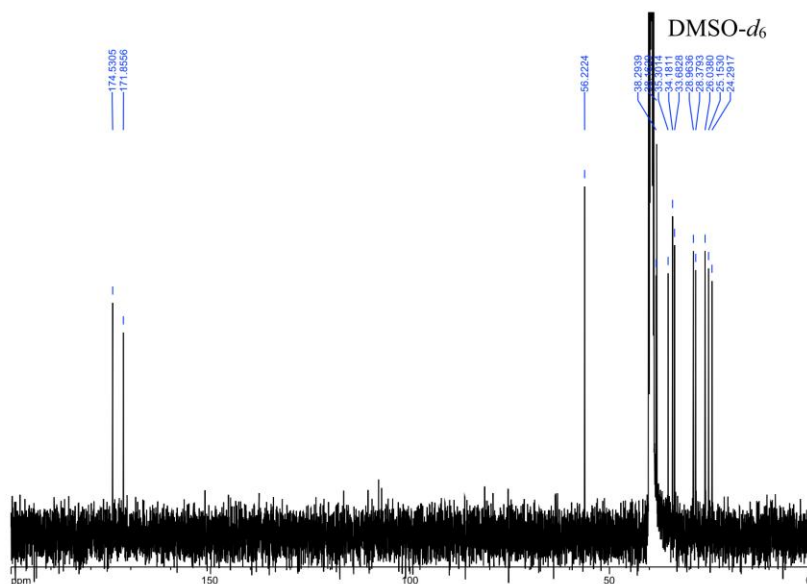
		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
[M-H] ⁻	C ₄₇ H ₅₇ N ₁₁ O ₈ S ₂ - H ⁺	966.4	966.4
[M+Cl] ⁻	C ₄₇ H ₅₇ N ₁₁ O ₈ S ₂ + Cl ⁻	1002.4	1002.4

NMR and Mass Spectra of 3

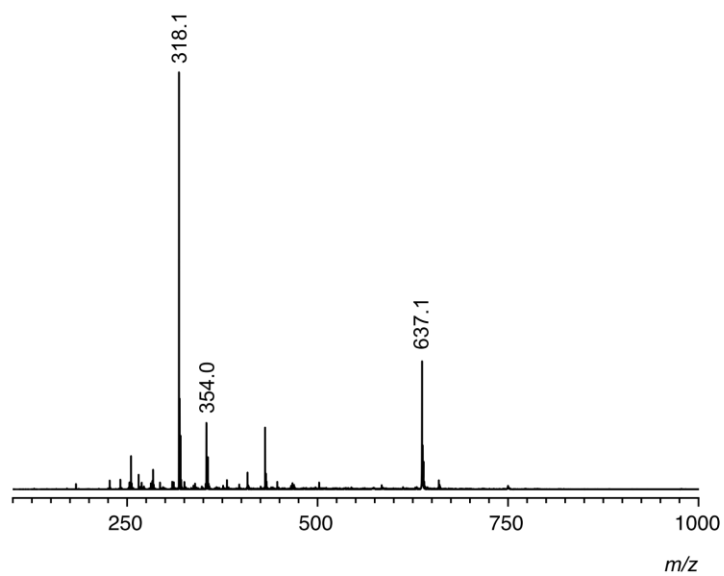
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



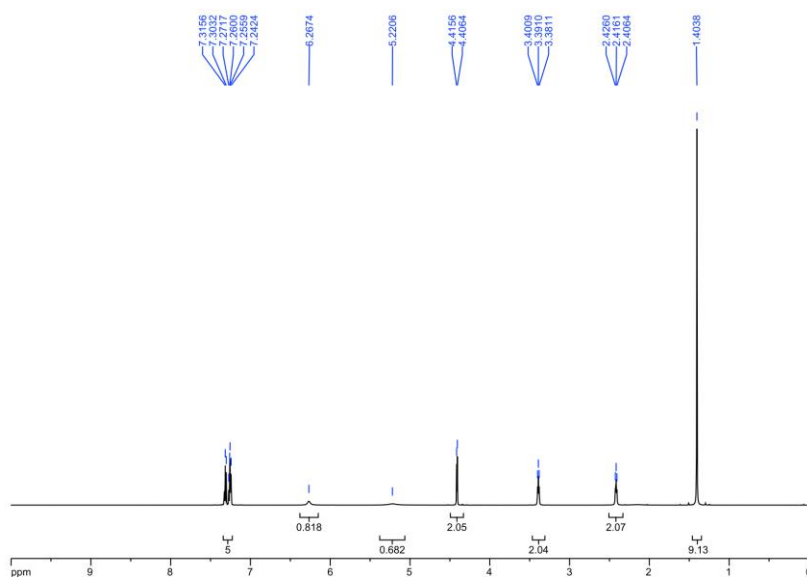
ESI-TOF MS (negative mode)



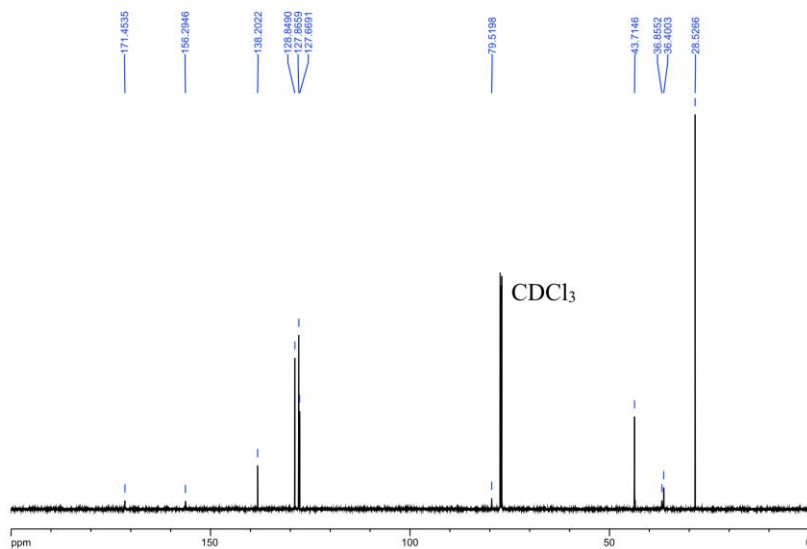
		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₂₅ NO ₃ S ₂ - H ⁺	318.1	318.1
[M+Cl] ⁻	C ₁₄ H ₂₅ NO ₃ S ₂ + Cl ⁻	354.1	354.0
[M ₂ +Cl] ⁻	(C ₁₄ H ₂₅ NO ₃ S ₂) ₂ - H ⁺	637.2	637.1

NMR and Mass Spectra of the Boc-Protected Precursor of 4

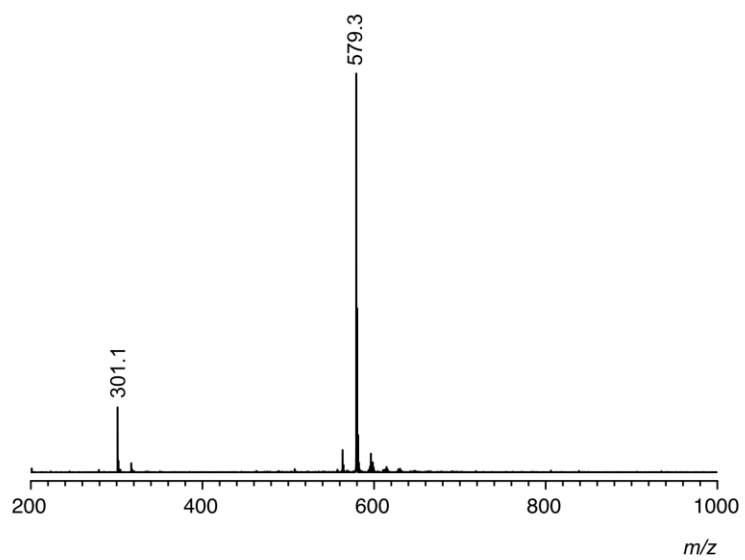
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3)



^{13}C NMR (101 MHz, $\text{MeOD-}d_4$)



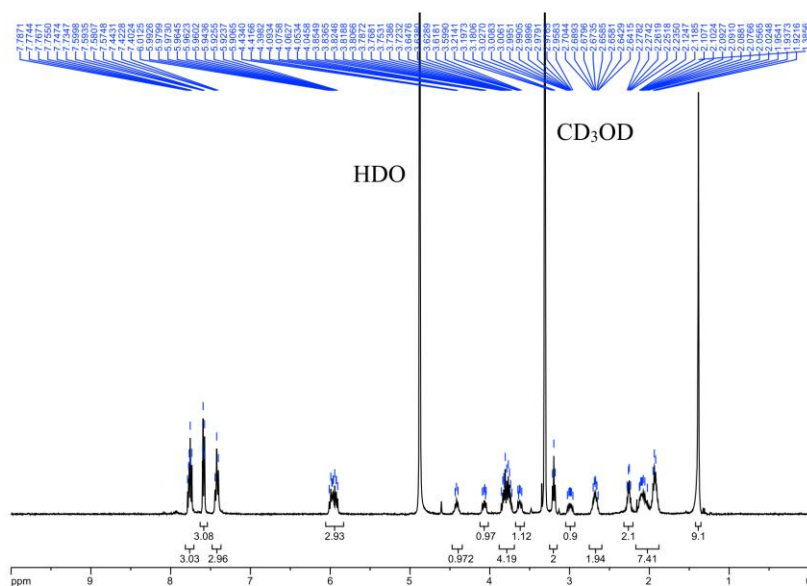
ESI-TOF MS (positive mode)



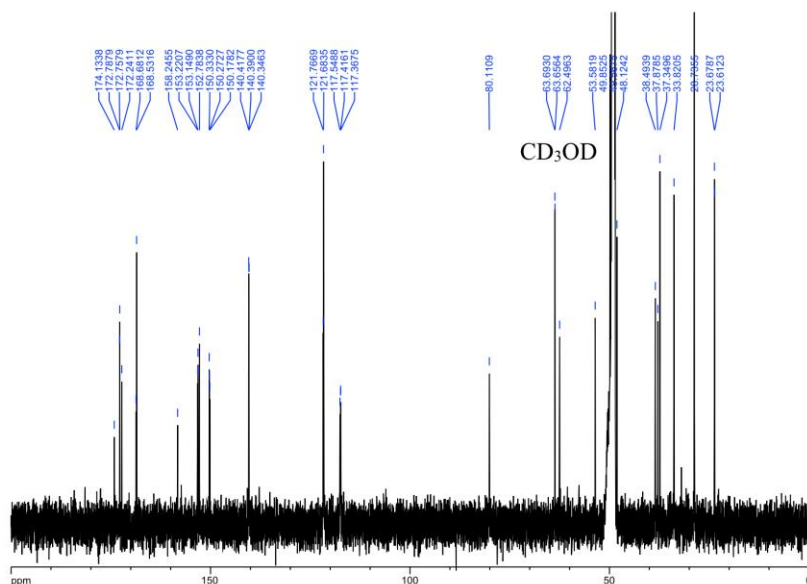
		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M+Na]^+$	$C_{15}H_{22}N_2O_3 + Na^+$	301.2	301.1
$[M_2+Na]^+$	$(C_{15}H_{22}N_2O_3)_2 + Na^+$	579.3	579.3

NMR and Mass Spectra of the Boc-Protected Precursor of 5

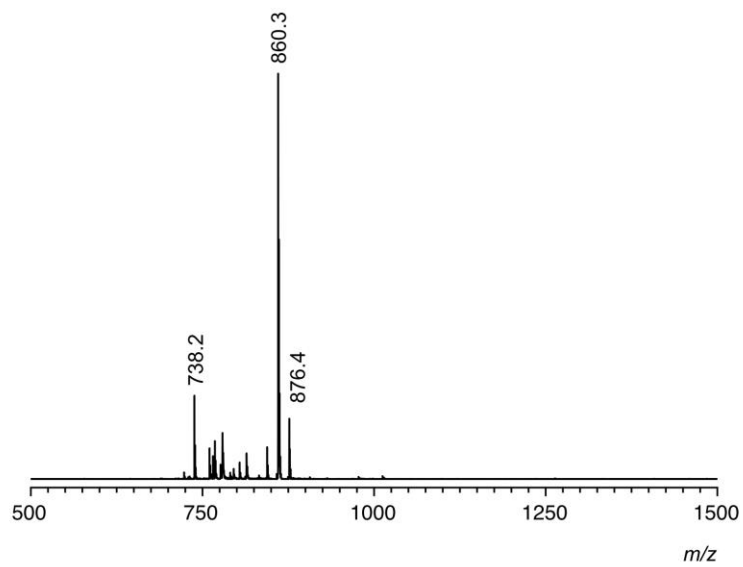
¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄)



¹³C NMR (101 MHz, MeOD-*d*₄)



MALDI-TOF MS (positive mode)



		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M-C_4H_8-CO_2+H]^+$	$C_{41}H_{47}N_{11}O_9-C_5H_9O_2+H^+$	738.3	738.2
$[M+Na]^+$	$C_{41}H_{47}N_{11}O_9+Na^+$	860.3	860.3
$[M+K]^+$	$C_{41}H_{47}N_{11}O_9+K^+$	876.3	876.4

Nanoparticle Synthesis and Characterisation

Analytical Methods

¹H NMR Spectroscopy. The ¹H NMR spectroscopic measurements were performed on a Bruker Avance™ III 400 spectrometer at 400 MHz and 22 °C. MeOD-*d*₄ and D₂O were used as purchased.

UV-vis Spectroscopy. The UV-vis measurements were performed by using a Varian Cary 100 spectrometer in semi-micro PMMA disposable cuvettes. All measurements were performed at 22 °C by using HPLC grade water as the solvent. The spectra were recorded between 300 and 800 nm. The AuNPs and the salts were weighed by using an analytical precision balance. Blank measurements were performed with water.

Transmission Electron Microscopy. A droplet of an aqueous AuNP solution was placed on a holey carbon grid (Plano S147-4) and dried under ambient conditions. A JEOL JEM-2100 LaB6 Transmission Electron Microscope (TEM) equipped with a Gatan Orius SC1000 CCD camera was used for bright-field imaging at 200 kV accelerating voltage. The images have a size of 1024×1024 pixels (acquisition time 0.5 s). The average diameters of the AuNPs were determined by processing the images with ImageJ followed by statistical analysis with MS Excel.

Syntheses

Citrate-stabilised AuNPs (NP^{Cit}).³ Trisodium citrate dihydrate (484 mg, 1.65 mmol) was dissolved in water (250 mL) and the resulting solution was refluxed for 15 min. Meanwhile, a solution of HAuCl₄ (44.8 mg, 132 μmol) in water (1 mL) was also heated to 100 °C and added quickly to the refluxing citrate solution. The reaction mixture was further refluxed for 20 min and then allowed to cool to 25 °C. Prior to functionalisation, an aliquot of the resulting nanoparticles solution was dialysed against water for 24 h at 25 °C.

TEG-stabilised AuNPs (NP^{TEG}). To a dialysed NP^{Cit} stock solution (20 mL), a solution of **1** (1.00 mL, 100 μmol, 0.1 M in methanol) was added and the reaction mixture was stirred for 24 h at 25 °C. The solvent was removed *in vacuo*, the residue was re-dissolved in water (1.0 mL) and the AuNPs

purified first by size exclusion chromatography (Sephadex® G-10, water/methanol, 1:1 (v/v)) and then by membrane filtration. For this, the AuNPs were dissolved in water/methanol, 1:1 (v/v), the solution subjected to centrifugal concentrators with a MWCO membrane (5000 Da) and filtered off by centrifugation (3000 rpm, 12 °C). Membrane filtration was repeated three times. The resulting AuNPs were collected and dried. Yield: 3.5 mg.

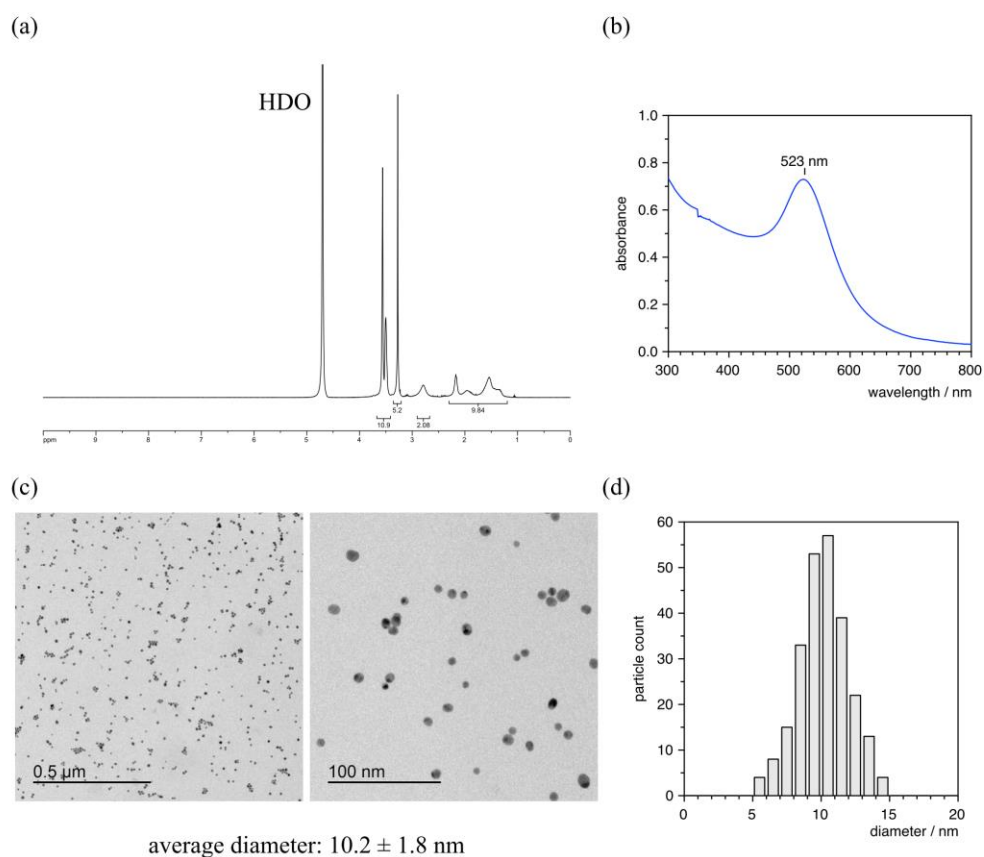


Figure S1: ^1H NMR spectrum in D_2O (a) and UV-vis spectrum (b) of NP^{TEG} in water, and TEM image (c) together with the histogram illustrating the size distribution of the nanoparticles derived from the TEM image (d).

Attempted Synthesis of NP^{CP} by simultaneous immobilisation of 1 and 2. Dialysed NP^{Cit} stock solution (20 mL) was diluted with an organic solvent (methanol or DMF, 20-40 mL) and treated with solutions of, first, **2** (in methanol or DMF) and subsequently **1** (0.1 M in methanol or DMF). The times between the addition of the two solutions were varied. After the addition of both solutions was complete, the reaction mixture was stirred for 48 h at 25 °C. Afterwards, the solvent was removed *in vacuo*, the residue was re-dissolved in water/methanol, 1:2 (v/v) (1.2 mL) and the AuNPs purified first by size exclusion chromatography (Sephadex[®] LH-20, water/methanol, 1:2 (v/v)) and then by membrane filtration. For this, the AuNPs were dissolved in water/methanol, 1:1 (v/v), the solution subjected to centrifugal concentrators with a MWCO membrane (5000 Da) and filtered off by centrifugation (3000 rpm, 12 °C) with. Membrane filtration was repeated three times. The resulting AuNPs were collected and dried. The ¹H NMR spectroscopic characterisation of the products showed that none of the AuNPs thus obtained contained substantial amounts of immobilised cyclopeptide in spite of the systematic variation of the reaction conditions.

Mixed Monolayer-Protected NP^{COOH}. Dialysed NP^{Cit} stock solution (20 mL) was diluted with methanol (20 mL). Afterwards, solutions of **3** (100 µL, 10.0 µmol, 0.1 M in methanol) and of **1** (900 µL, 90.0 µmol, 0.1 M in methanol) were added simultaneously and the reaction mixture was stirred for 24 h at 25 °C. The solvent was removed *in vacuo*, the residue was re-dissolved in water/methanol, 1:2 (v/v) (1.2 mL) and the AuNPs purified first by size exclusion chromatography (Sephadex[®] LH-20, water/methanol, 1:2 (v/v)) and then by membrane filtration. For this, the AuNPs were dissolved in water/methanol, 1:1 (v/v), the solution subjected to centrifugal concentrators with a MWCO membrane (5000 Da) and filtered off by centrifugation (3000 rpm, 12 °C) with. Membrane filtration was repeated three times. The resulting AuNPs were collected and dried.

Mixed Monolayer-Protected NP^{Bn}. NP^{COOH} was dissolved in water/acetonitrile, 1:1 (v/v) (800 µL). A solution of sulfo-NHS (3.26 mg, 15.0 µmol) and EDC·HCl (2.88 mg, 15.0 µmol) in water (200 µL) was added. Compound **4** (1.3 mg, 5.00 µmol) was dissolved in water/acetonitrile, 1:1 (v/v) (400 µL) and the pH of the solution was adjusted to 8 with 0.1 M aqueous NaOH. This solution was added to the reaction mixture, whose pH was then again adjusted to 8 with 0.1 M aqueous NaOH. The

resulting mixture was stirred for 19 h at 25 °C. Afterwards, the nanoparticles were purified by size exclusion chromatography (Sephadex[®] LH-20, water/methanol, 1:2 (v/v)). The solvent was evaporated and the product dried. Yield: 2.9 mg. According to the ¹H NMR spectroscopic analysis (Figure S2), 32 ± 1% of the ligands immobilised on the nanoparticle contained terminal benzylamine groups.

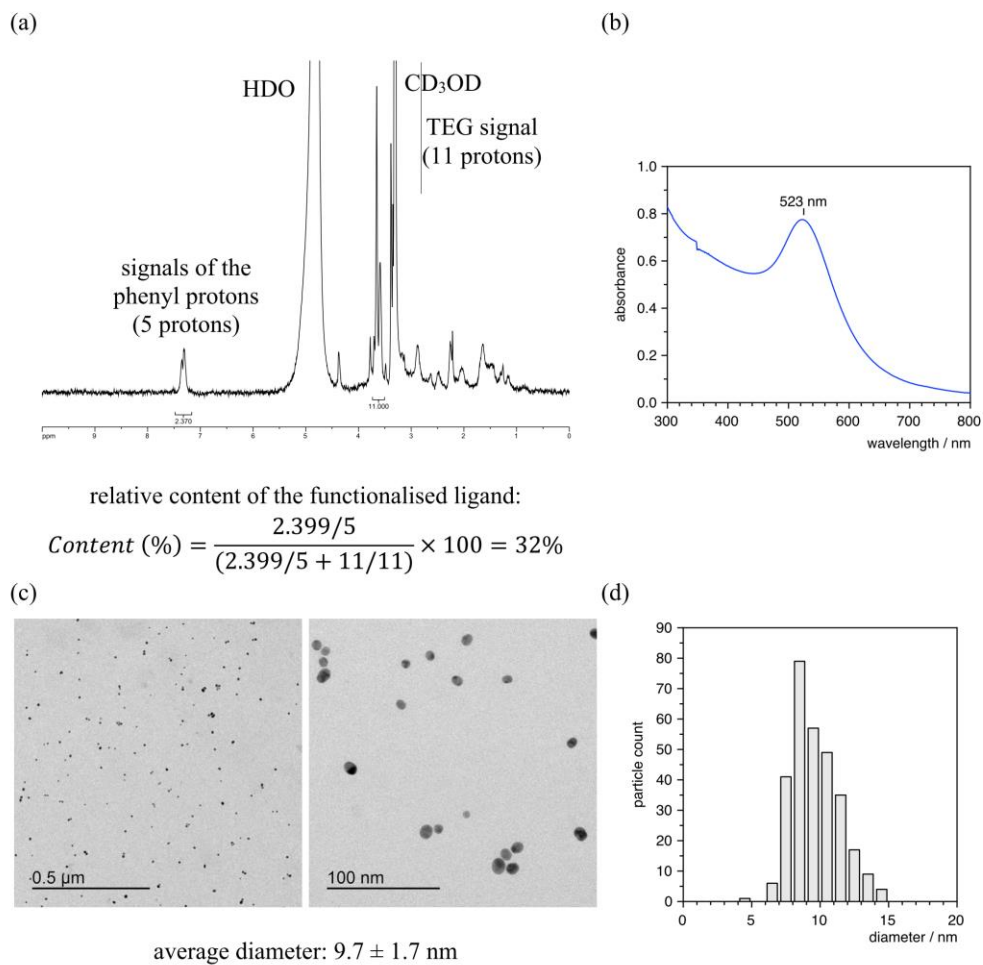
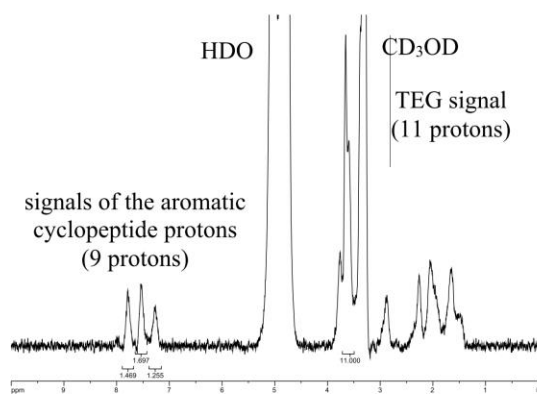


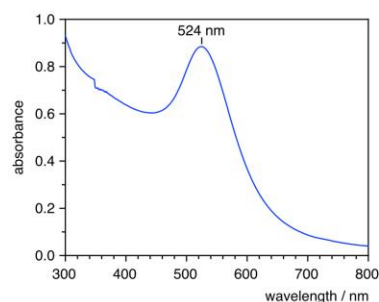
Figure S2: ¹H NMR spectrum in D₂O/MeOD-*d*₄, 1:1 (v/v) (a) and UV-vis spectrum (b) of NP^{Bn} in water, and TEM image (c) together with the histogram illustrating the size distribution of the nanoparticles derived from the TEM image (d).

Mixed Monolayer-Protected NP^{CP}. NP^{COOH} was dissolved in water/acetonitrile, 1:1 (v/v) (800 μ L). A solution of sulfo-NHS (3.3 mg, 15.0 μ mol) and EDC·HCl (2.9 mg, 15.0 μ mol) in water (200 μ L) was added. Compound **5** (4.1 mg, 5.00 μ mol) was dissolved in water/acetonitrile, 1:1 (v/v) (400 μ L) and the pH of the solution was adjusted to 8 with 0.1 M aqueous NaOH. This solution was added to the reaction mixture, whose pH was then again adjusted to 8 with 0.1 M aqueous NaOH. The resulting mixture was stirred for 19 h at 25 °C. Afterwards, the nanoparticles were purified by size exclusion chromatography (Sephadex[®] LH-20, water/methanol, 1:2 (v/v)). The solvent was evaporated and the product dried. Yield: 2.7 mg. According to the ¹H NMR spectroscopic analysis (Figure S3), 32 \pm 1% of the ligands immobilised on the nanoparticle contained terminal cyclopeptide moieties.

(a)



(b)



relative content of the functionalised ligand:

$$\text{Content (\%)} = \frac{(1.469 + 1.697 + 1.255)/9}{[(1.469 + 1.697 + 1.255)/9 + 11/11]} \times 100 = 33\%$$

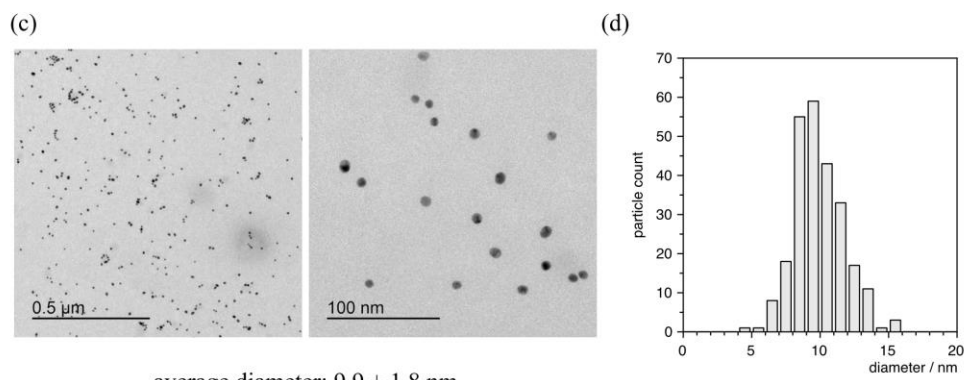


Figure S3: ^1H NMR spectrum in $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD-}d_4$, 1:1 (v/v) (a) and UV-vis spectrum (b) of NP^{CP} in water, and TEM image (c) together with the histogram illustrating the size distribution of the nanoparticles derived from the TEM image (d).

Binding Studies

Visual Binding Study. All experiments were performed by using HPLC grade water. The nanoparticles and salts were weighed by using an analytical precision balance and dissolved in water to obtain solutions containing 0.5 mg/mL of nanoparticles and salt solutions with a concentration of 0.1 M. As salts, NaCl, NaBr, NaI, Na₂SO₄, Na₂CO₃, Na₂HPO₄, Na₂HAsO₄, Na₄P₂O₇, NaNO₃ were used. Ten vials were prepared, each containing 100 μ L of the nanoparticle stock solution. The solutions were diluted with water (100 μ L). One vial was used as blank while each of the other vials was treated with a salt solution. Initially 1 μ L of the salt stock solution was added and the amounts were then progressively increased in steps of 1 μ L until the vials contained overall 5 μ L of the corresponding salt solution. Once 5 μ L were present, effects of the Na₂SO₄ solutions on the nanoparticles were observed. Photographs of the vials were taken after 5 and 30 minutes. This experiment was repeated at least three times.

UV-vis Spectroscopic Binding Study. The UV-vis spectroscopic measurements were performed on a Varian Cary 100 at 22 °C by using semi-micro PMMA disposable cuvettes with a 1 cm path length and HPLC grade water as the solvent. The nanoparticles and Na₂SO₄ were weighed by using an analytical precision balance. A stock solution of NP^{CP} was prepared containing 0.5 mg/mL of the nanoparticle in water and a 0.1 M aqueous solution of Na₂SO₄. Blank measurements were performed with water.

A series of samples were prepared, each containing the NP^{CP} stock solution (500 μ L) and varying amounts of the Na₂SO₄ stock solution (0, 5, 10, 15, 20, 25, 37.5, 50, 75, 100, 125 μ L). Each sample was made up with water to a total volume of 1 mL, and the respective UV-vis spectra were recorded between 300 and 800 nm exactly 5 minutes after sample preparation. The resulting spectra are shown in Figure S4a. Figure S4b shows a comparison of the UV-vis spectrum of NP^{CP} with the spectra obtained in the presence of 2.5 mM of Na₂SO₄ after 5 and 30 min.

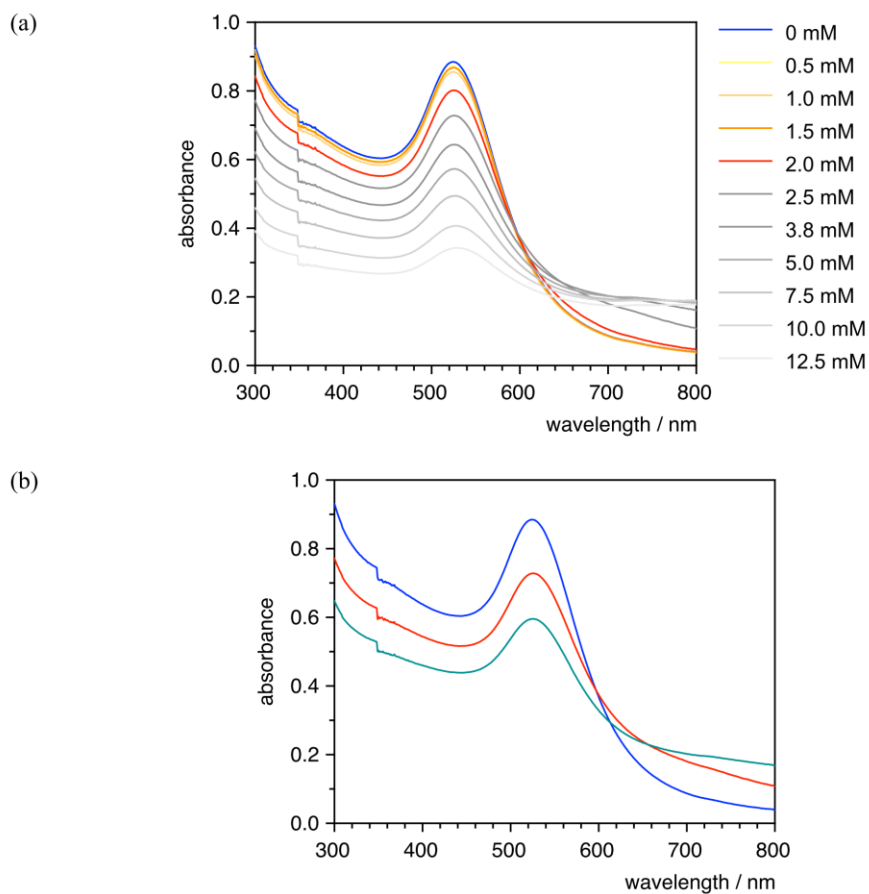


Figure S4: UV/VIS spectra of **NP^{CP}** (0.25 mg/mL) in water containing between 0 and 12.5 mM of Na₂SO₄ measured after 5 min (a). In (b), the UV-vis spectra of the solution containing 2.5 mM of Na₂SO₄ measured after 5 (red) and 30 min (green) are compared with the UV-vis spectrum of **NP^{CP}** (blue).

An analogous measurement was performed by adding a 0.1 M aqueous NaI solution (25 μ L) to the **NP^{CP}** stock solution (500 μ L) and adding water to obtain a total volume of 1 mL. The corresponding UV-vis spectrum is depicted in Figure S5 together with the spectrum of **NP^{CP}** in water.

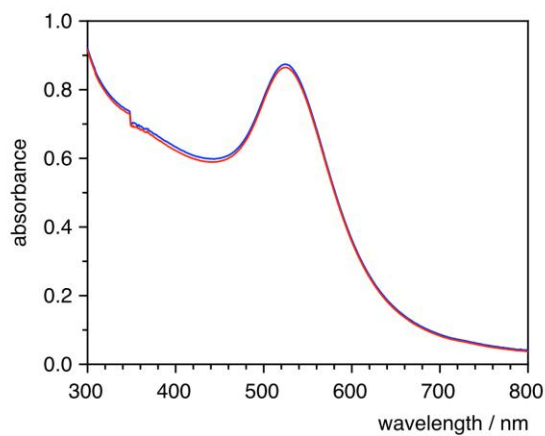
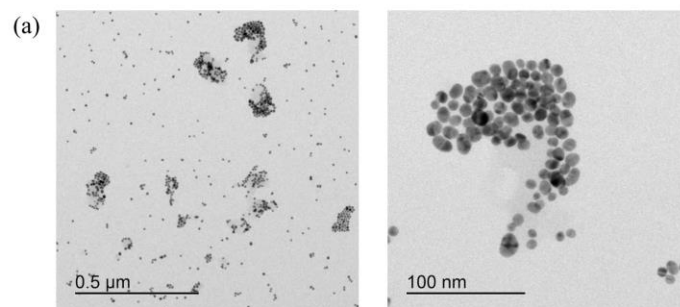


Figure S5: UV/VIS spectra of NP^{CP} (0.25 mg/mL) in water (blue) and spectrum of a solution containing additional 2.5 mM of NaI (red).

Transmission Electron Microscopy. Stock solutions in water were prepared containing of NP^{CP} (0.25 mg/mL) and of Na_2SO_4 (0.1 M). The Na_2SO_4 stock solution (5 μL) was added to the nanoparticle stock solution (200 μL) and TEM images of this mixture were taken after 5 and 30 minutes. For the measurement, a droplet of an aqueous AuNP solution was placed on a holey carbon grid (Plano S147-4) and dried under ambient conditions.



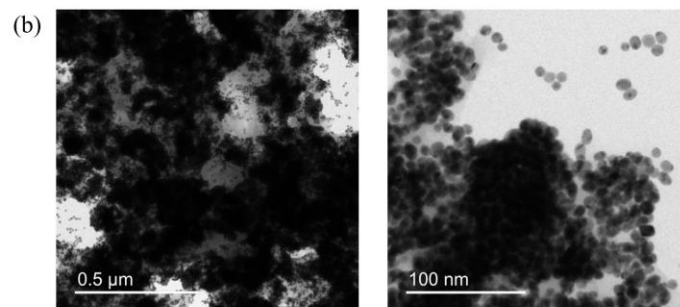


Figure S6: TEM images of NP^{CP} 5 min (a) and 30 min (b) after the addition of Na_2SO_4 .

Competition Experiment. Stock solutions of NP^{CP} (0.5 mg/mL) and NaCl (1 M), Na_2HPO_4 (1 M), and Na_2SO_4 (0.1 M) were prepared in HPLC grade water. Three vials were prepared, each containing 100 μL of the NP^{CP} stock solution and additional 100 μL of water. No salt solutions were added to the first vial. The NaCl and the Na_2HPO_4 stock solution (5 μL each) were added to the two other vials. To the third vial, the Na_2SO_4 stock solution (5 μL) was additionally added. All vials were made up to total volumes of 215 μL with water. A photograph of the vials, taken after 5 min, is shown in Fig. 4 of the main manuscript.

References

1. T. Fiala, K. Sleziakova, K. Marsalek, K. Salvadori and V. Sindelar, *J. Org. Chem.*, 2018, **83**, 1903–1912.
2. T. Fiehn, R. Goddard, R. W. Seidel and S. Kubik, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 7241–7255.
3. I. Ojea-Jiménez, N. G. Bastús and Victor Puentes, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 15752–15757.

6.6 Lebenslauf

Julia Bartl



Bildungsweg

11/2015 – 10/2020

Technische Universität Kaiserslautern

Promotion, Organische Chemie (AK Kubik)

Thema der Dissertation: Cyclopeptide als Bindungsmotive für Anionen in molekularen Käfigen sowie Goldnanopartikel-basierten Sonden

10/2010 – 09/2015

Technische Universität Kaiserslautern

Studium Diplom-Chemie, Vertiefung Organische Chemie

Diplom (1.0, „mit Auszeichnung“)

Thema der Diplomarbeit: Cyclopeptide als sensoraktive Substanzen für Quarzmikrowaagen

08/2002 – 07/2010

Christian-von-Mannlich-Gymnasium (Homburg/Saar)

bilinguales Abitur (1.4)

09/1998 – 07/2002

Grundschule Bechhofen

Preise

03/2016

Steinhofer-Preis der Prof. Dr. Drs. h.c. Adolf Steinhofer-Stiftung

Auszeichnung der besten Diplomarbeiten in Chemie 2015 an der TU Kaiserslautern

07/2016

Preis der Kreissparkassen-Stiftung für die TU Kaiserslautern

Auszeichnung der Diplomarbeit

02/2019

Posterpreis der SupraChem 2019 in Würzburg

Stipendien

07/2017 – 02/2020

Promotionsstipendium der Carl-Zeiss-Stiftung