
Cyclische Tetrapeptide aus natürlichen Aminosäuren und
verschiedenen 3-Aminobenzoessäurederivaten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Susanne Pohl

aus Köln

2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Ritter
2. Berichterstatter: Prof. em. Dr. G. Wulff

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Juli 2002

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. em. Dr. G. Wulff am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Zeit von November 1998 bis März 2002 angefertigt.

Herrn Prof. em. Dr. G. Wulff möchte ich herzlich danken für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis. Besonders danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Stefan Kubik für das interessante und perspektivenreiche Thema, seine engagierte Betreuung, sowie die vielen anregenden und aufschlußreichen Diskussionen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Beuer und den Mitarbeitern des Institutes für Anorganische Chemie und Strukturchemie II für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren bedanken. Frau Menzel danke ich für die Anfertigung der IR-Spektren.

Für die Aufnahme der Röntgenstrukturen danke ich Herrn Dr. Reiss vom Institut für Anorganische und Strukturchemie I und Herrn Dr. Goddard vom Max-Planck-Institut für Kohleforschung in Mühlheim an der Ruhr. Herrn Dr. Tommes und Herrn Bürgel vom Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie I danke ich für die Aufnahme der Massenspektren. Außerdem danke ich Frau Zerta vom Institut für Pharmazeutische Chemie für die zahllosen C,H-Analysen.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

Pohl, S.; Goddard, R.; Kubik, S., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 7555-7558.

Kubik, S.; Bitta, J.; Goddard, R.; Kubik, D.; Pohl, S., *Mater. Sci. Eng. C*, **2001**, 18, 125-133.

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	2
<u>2</u>	<u>THEORETISCHER TEIL</u>	10
2.1	<u>AUFGABENSTELLUNG</u>	10
2.2	<u>CYCLISCHE HEXAPEPTIDE MIT SUCCINIMIDUNTEREINHEITEN</u>	13
2.3	<u>CYCLISCHE HEXAPEPTIDE MIT HARNSTOFFSUBSTITUENTEN</u>	25
2.4	<u>SYNTHESE VON CYCLOPEPTIDEN DURCH „DIREKTCYCLISIERUNG“</u>	29
2.5	<u>STRUKTUREN UND REZEPTOREIGENSCHAFTEN DER NEUEN CYCLOPEPTIDE</u>	38
2.5.1	<i>Cyclische Octapeptide</i>	38
2.5.2	<i>Cyclische Tetrapeptide</i>	40
2.6	<u>TETRAPEPTIDE MIT AROMATISCHEN SUBSTITUENTEN</u>	71
2.6.1	<i>Cyclische Tetrapeptide mit Cholsäuresubstituenten</i>	72
2.6.2	<i>Cyclische Tetrapeptide mit Harnstoffsubstituenten</i>	79
<u>3</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	96
<u>4</u>	<u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	100
4.1	<u>ALLGEMEINES</u>	100
4.2	<u>NMR-EXPERIMENTE</u>	103
4.3	<u>ALLGEMEINE ARBEITSWEISEN</u>	105
4.4	<u>SYNTHESEN</u>	107
4.4.1	<i>Synthesen zu Kapitel 2.2</i>	107
4.4.2	<i>Synthesen zu Kapitel 2.3</i>	115
4.4.3	<i>Synthesen zu Kapitel 2.4</i>	120
4.4.4	<i>Synthesen zu Kapitel 2.5</i>	138
4.4.5	<i>Synthesen zu Kapitel 2.6</i>	145
	<u>LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN</u>	161
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	162

1 Einleitung

Die Entwicklung neuer synthetischer Rezeptoren ist ein wichtiges Gebiet der Supramolekularen Chemie.¹ Viele dieser Rezeptoren basieren auf Kronenethern,² Cyclodextrinen,³ Cyclophanen⁴ und Calixarenen⁵, Makrocyclen also, die in ihrem Hohlraum Gäste aufnehmen können.⁶ Ein zentrales Motiv bei der Darstellung solcher neuen Rezeptorsysteme ist die Entwicklung von Methoden, um ein flexibles Rezeptorgrundgerüst auf einen bestimmten Gast optimal zuzuschneiden. Gerade die Calixarene (Abb. 1.1) haben in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren große Bedeutung erlangt, da sie sich als besonders vielseitiges Grundgerüst für eine große Zahl sehr unterschiedlicher Rezeptoren erwiesen haben.⁷

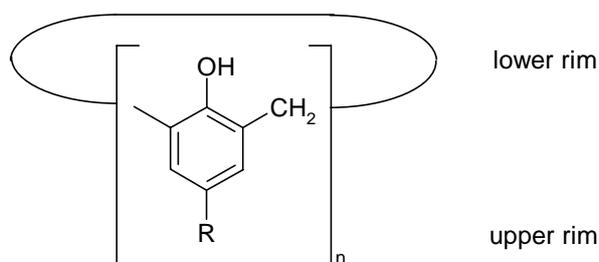


Abb. 1.1

Calix[n]aren

Dementsprechend haben Rezeptoren, die auf Variationen des Calixarengrundgerüsts beruhen, die unterschiedlichsten Anwendungen als Sensoren,⁸ Kapseln,⁹ Katalysatoren¹⁰ und Bausteine für Supramolekulare Aggregate¹¹ gefunden. Die verschiedenen Strategien zu einem derartigen „Tuning“ von Rezeptoren lassen sich anhand der vielzähligen Arbeiten über die Calixarene gut illustrieren.

Calixarene sind cyclische Oligomere, die bei der basischen Kondensation von Phenol mit Formaldehyd gebildet werden. Die aromatischen Untereinheiten, welche über flexible Methylengruppen verknüpft sind, können einen konusförmigen Hohlraum ausbilden (Abb. 1.2), in dem sowohl neutrale als auch kationische Gäste eingelagert werden können.¹² Im Falle kationischer Gastmoleküle werden diese durch Kationen- π -Wechselwirkungen gebunden.¹³ Sowohl die Selektivität als auch die Affinität für einen bestimmten Gast wird jedoch durch verschiedene Faktoren beeinflusst. So spielt die Hohlraumgröße eine wichtige Rolle, die durch die Zahl der aromatischen Bausteine (n =

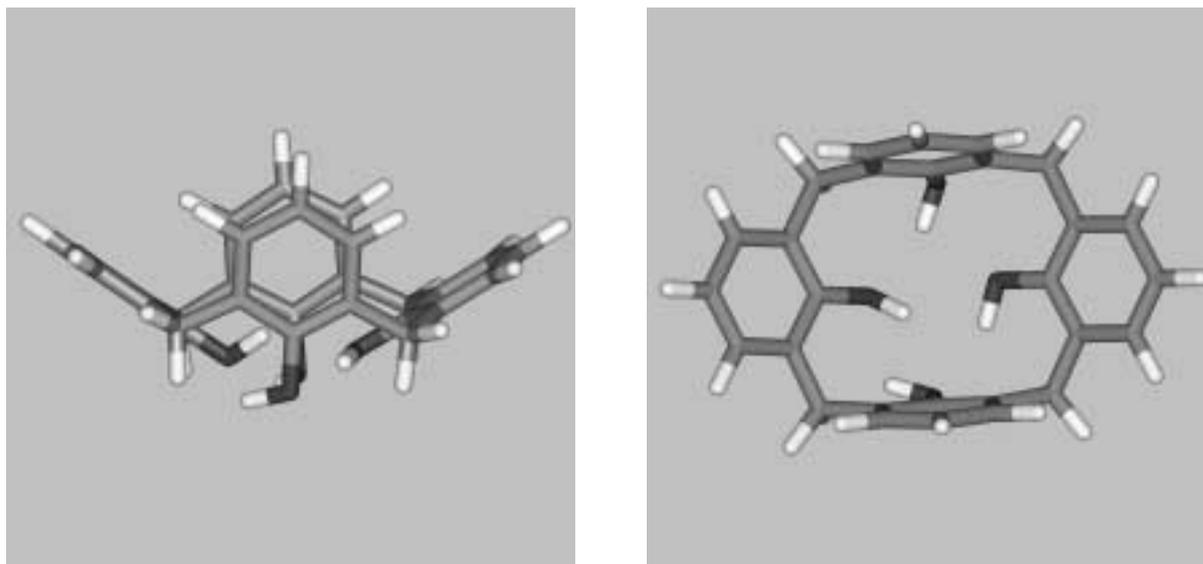


Abb. 1.2 Hohlraum einer Calix[4]arens in der cone Konformation.

4-8, Abb. 1.1) variiert werden kann. Daneben ist jedoch auch die Form des Hohlräum von Bedeutung, die von der Konformation des gesamten Makrocyclus geprägt wird. So können Calixarene auf Grund der ungehinderten Rotation um die Methylengruppen in einer Vielzahl an Konformationen vorliegen. Allein für die Calix[4]arene lassen sich z. B. vier symmetrische Grundkonformationen finden, die sich in der relativen Anordnung der aromatischen Ringe zueinander unterscheiden (Abb. 1.3). Dabei bildet die *cone-Konformation* einen Hohlraum aus, der zur Einlagerung von Gästen am günstigsten ist.

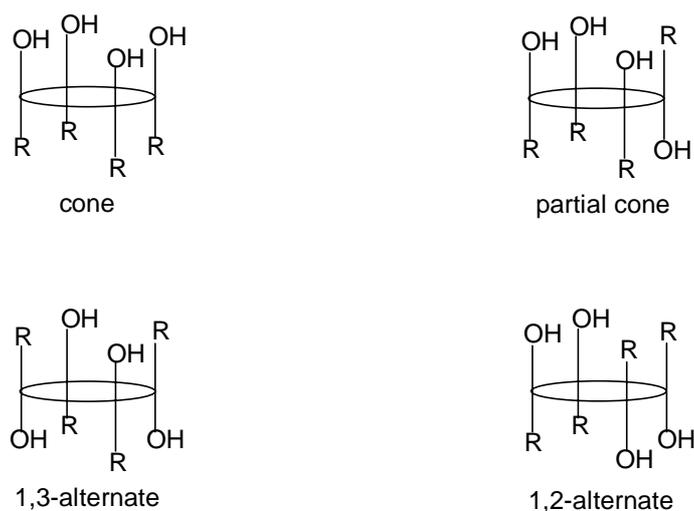


Abb. 1.3 Die vier Grundkonformationen eines Calix[4]arens.

$^1\text{H-NMR}$ -Experimente haben gezeigt, daß bei Raumtemperatur diese C_{4v} -symmetrische cone-Konformation bevorzugt vorliegt; oberhalb Raumtemperatur stellt sich ein schnelles

Gleichgewicht zwischen den beiden entarteten cone-Konformationen ein, die sich über ein Umklappen der OH-Gruppen durch den Innenraum des Konus ineinander umwandeln.¹⁴ Diese Rotation der Phenyleinheiten wird durch Einführung sperriger Substituenten am lower oder upper rim oder durch intra- oder intermolekulare Verbrückung der Benzenringe unterbunden.¹⁵ Der Rezeptor kann dadurch gezielt in einer bestimmten Konformation eingefroren werden.

Durch geschickte Wahl der Substituenten kann neben der Verringerung der konformativen Freiheit der Calixarene eine zusätzliche Modifikation ihrer Bindungseigenschaften erreicht werden, wenn diese Substituenten als zusätzliche Bindungszentren fungieren können. Einführung von Bindungszentren wie Estern, Ketonen oder Amiden, die Metallionen komplexieren können, liefert zum Beispiel eine Gruppe von Rezeptoren, die zur spezifischen Erkennung von Alkali- und Erdalkalimetallionen geeignet sind.¹⁶ Die Selektivität dieser Verbindungen bei der Gastbindung wird wiederum durch Ringgröße, Konformation und die Art des Bindungszentrums gesteuert. Die Kationen werden von diesen Calixarendervativen nicht mehr in den aromatischen Hohlraum eingelagert, das Calixaren stellt vielmehr nur die Plattform dar, auf der die Bindungsarme angeordnet und fixiert werden. Auf die gleiche Weise konnten auch Anionenrezeptoren auf Basis von Calixarenen dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurden Wasserstoffbrückendonoren wie z.B. Amide oder kationische Untereinheiten wie z.B. Cobaltocene als zusätzliche Bindungszentren eingeführt.¹⁷ Calixarene, die mit *N*-verknüpften Aminosäuren oder Peptidschleifen substituiert sind, wurden außerdem zur Erkennung von Aminosäuren¹⁸ und von Proteinoberflächen¹⁹ eingesetzt. Mendoza et al. stellten kürzlich eine molekulare Kapsel aus zwei Calix[6]arenen dar, die durch Wasserstoffbrücken zwischen am upper rim befestigten Leucinresten zusammengehalten wurden.²⁰

Die Tatsache, daß die Einführung weiterer Bindungszentren gleichzeitig die Konformation des Rezeptors beeinflusst, kann außerdem gezielt zum Design von ditopen Rezeptorsystemen mit *allosterischen Effekten* genutzt werden.²¹

Neben der Substitution mit zusätzlichen Bindungszentren erreicht man auch durch Variation der aromatischen Calixarenbausteine eine erhebliche Veränderung ihrer Rezeptoreigenschaften. Ersetzt man das Phenol z. B. durch Resorcin kommt man zu den Resorcinarenen (Abb. 1.4, links). Die zweite Hydroxylgruppe in den Resorcinuntereinheiten führt auf Grund der Ausbildung intramolekularer, cyclischer Wasserstoffbrücken zu einer

weiteren Verringerung der Beweglichkeit des Makrocyclus. Diese Versteifung des Hohlraumes kann durch kovalente Verbrückung der Resorcinuntereinheiten noch verstärkt werden. Solche starren Resorcinarenderivate sind als Cavitanden bekanntgeworden (Abb. 1.4, rechts).

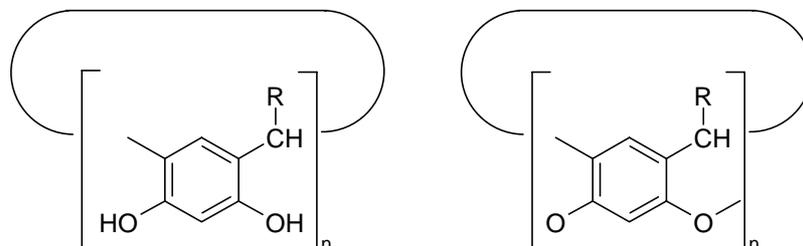


Abb. 1.4 Resorcinaren (links) und Cavitand (rechts)

Durch kovalente Verknüpfung zweier Halbschalen lassen sich aus Cavitanden Containermoleküle herstellen, die Carceranden.²² Ersetzt man die aromatischen Untereinheiten der Calixarene durch z.B. Pyrrol, so erhält man eine Klasse von Rezeptoren, die auch ohne zusätzliche Bindungszentren zur Erkennung von Anionen befähigt sind.²³ Die Anionen werden dabei durch N-H...X Wasserstoffbrücken gebunden.

Durch Verlängerung des Methylenspacers zwischen den Aromaten kommt man zu den Homocalixarenen²⁴, die ebenfalls Anwendung in der Kationenerkennung gefunden haben.

Wie kann man diese Konzepte nun nutzen, um eine neue Klasse künstlicher Rezeptoren zu etablieren? Ein besonders interessanter Ansatz hierzu ist die Kombination bekannter Rezeptorbausteine aus dem Bereich der synthetischen Makrocyclen mit Bausteinen aus der Natur. So haben Ishida et al. 3-Aminobenzoesäuren mit natürlichen α -L-Aminosäuren kombiniert, um synthetische Cyclopeptide herzustellen, die sie zur Erkennung von Monophosphatestern und als ein Serinproteasemimic einsetzten (Abb. 1.5).²⁵

illustriert, sind diese synthetischen Cyclopeptide (Mitte) Hybride aus Strukturelementen von natürlichen Peptiden (links) und Calixarenen (rechts).

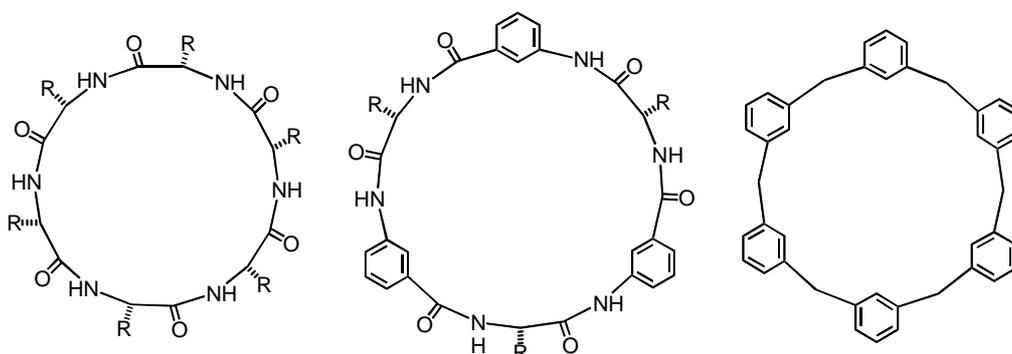


Abb. 1.6 Links: Cyclohexapeptid, rechts: Calix[6]aren, Mitte: Hybrid aus Cyclohexapeptid und Calix[6]aren.

Das erste von Kubik vorgestellte Hexapeptid **1** bindet wie die Calixarene in Chloroform quaternäre Ammoniumionen in dem von den aromatischen Aminosäuren aufgespannten Hohlraum (Abb. 1.7, links).³⁰ Zusätzlich ist **1** in der Lage durch Wasserstoffbrücken zu den Amidprotonen Anionen wie Phosphat oder Sulfonat zu binden. Da die Anionenbindung sowohl die Konformation des Cyclopeptides als auch seine Kationenbindung beeinflusst, ist **1** ein ditoper Rezeptor mit einem positiven allosterischen Effekt.

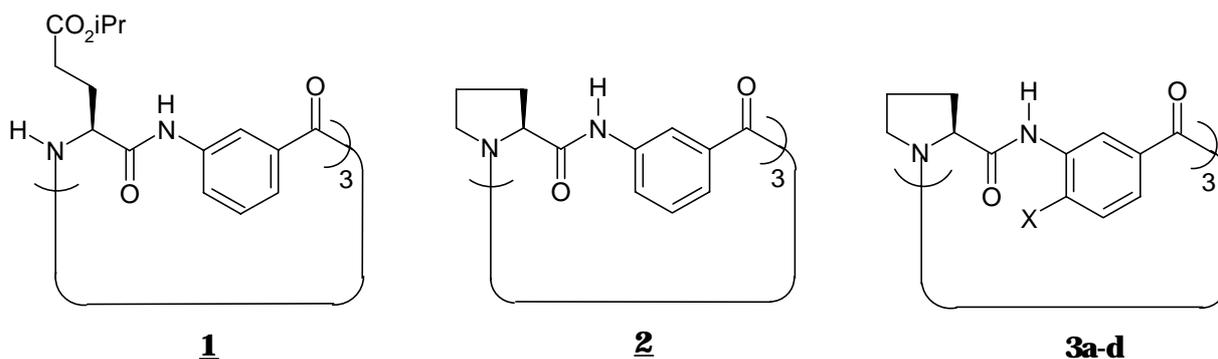


Abb. 1.7 Cyclopeptide **1**, cyclo-[(L)Glu-(OiPr)-AB]₃, **2**, cyclo-[(L)Pro-AB]₃, und Cyclopeptide mit Substituenten in 4-Position (X= Cl [**3a**], CH₂OCH₃ [**3b**], OCH₃ [**3c**], COOCH₃ [**3d**]).

Durch Variation der natürlichen Aminosäure konnte sowohl die Kationen- als auch die Anionenaffinität von **1** erhöht werden, indem die Glutaminsäureuntereinheiten durch Prolinuntereinheiten ersetzt wurden.³¹ Eine Ursache hierfür ist die verringerte Flexibilität der cyclischen Aminosäure Prolin, bei der eine Rotation um die C(α)-N-Bindung nicht mehr

möglich ist. Der Verlust der Rotationsfreiheitsgrade bei Komplexbildung eines Gastes ist bei Rezeptor **2** (Abb. 1.7, Mitte) also geringer als bei Rezeptor **1**. Um die Zahl der frei rotierbaren Bindungen weiter einzuschränken und so Cyclopeptide mit einem noch starrereren Grundgerüst zu erhalten, wurden von Kubik die Cyclopeptide **3a-d** dargestellt, bei denen in 4-Position am aromatischen Ring Substituenten eingeführt wurden (Abb. 1.7, rechts).³² Diese Substituenten unterbinden, wie in Abbildung 1.8 a) dargestellt, durch Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrücken zum benachbarten N-H Proton die Rotation der Amidgruppe, die bei **2** beobachtet wurde. Die Amidbindung kann sich nun nicht mehr in der zur Anionenkomplexierung notwendigen Konformation zur Unterseite des Makrocyclus hin ausrichten (Abb. 1.8 b)) und infolgedessen verlieren diese Cyclopeptide ihre Eigenschaft als Anionenrezeptoren. Ihre Kationenantizität wird auf Grund der besseren Vororganisation aber in einigen Fällen (**3c** und **3d**) im Vergleich zur Stammverbindung **2** signifikant erhöht.

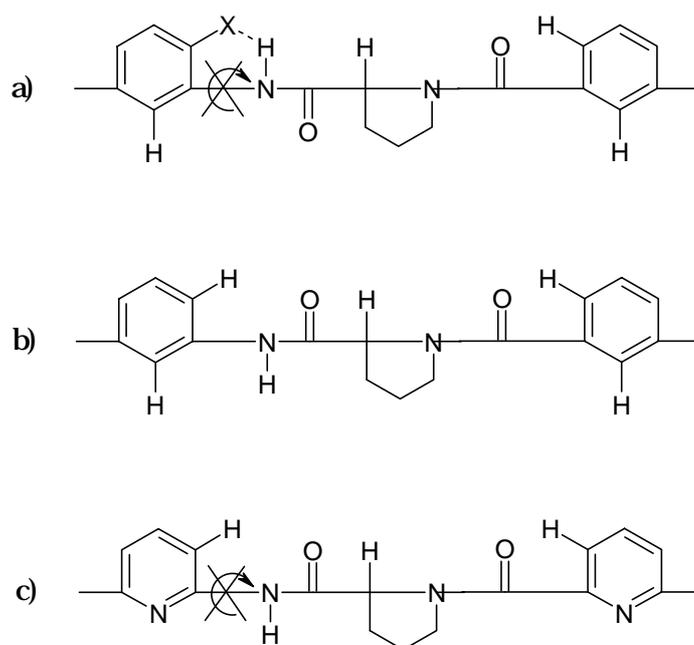


Abb. 1.8 Bevorzugte Konformation a) von Cyclopeptid **3** mit geeignetem Substituenten in 4-Position ($X = \text{Cl}, \text{CH}_2\text{OCH}_3, \text{OCH}_3, \text{COOCH}_3$); b) von Cyclopeptid **2** bei Binden eines Anions c) von Cyclopeptid **4**.

Durch Variation der aromatischen Aminosäure gelang es Kubik ebenfalls, cyclische Hexapeptide darzustellen, in denen die sekundäre Amidbindung gerade in der zur Anionenerkennung geeigneten Konformation fixiert wird (Abb. 1.8 c)). In der 6-Aminopicolinsäure erzwingt nämlich die Pyridyluntereinheit eine antiparallel Ausrichtung des $\text{N}^{\delta-}\text{-H}^{\delta+}$ Bindungsdipols zum lone pair am aromatischen Stickstoffatom.³³ Dieser Effekt

kommt auch bei Cyclopeptid **4** zum Tragen und bewirkt eine drastische Steigerung der Anionenaffinität: **4** ist auch in sehr kompetitiven Lösungsmitteln wie Wasser/Methanol Gemischen ein leistungsfähiger Anionenrezeptor (Abb. 1.9).³⁴

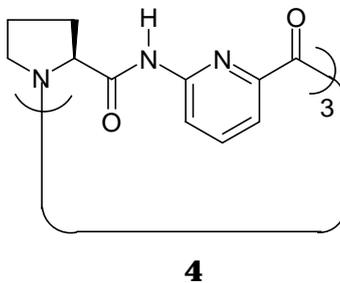


Abb. 1.9 Cyclopeptid *cyclo-[(L)Pro-AP]₃*, **4**.

Auch das Konzept der Einführung weiterer Bindungszentren zur Veränderung der Bindungseigenschaften von künstlichen Rezeptoren wurde von Kubik erfolgreich eingesetzt. Aufbauend auf Cyclopeptid **5** mit einer Carboxylgruppe in 5-Position an der aromatischen Aminosäure als Ankergruppe für weitere Bindungszentren konnten verschiedene Rezeptoren zur Kohlenhydraterkennung dargestellt werden (Abb. 1.10).³⁵

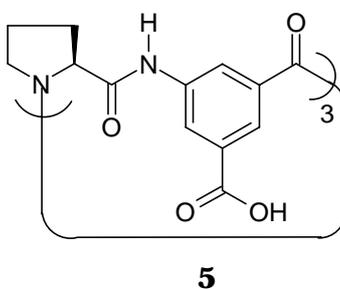


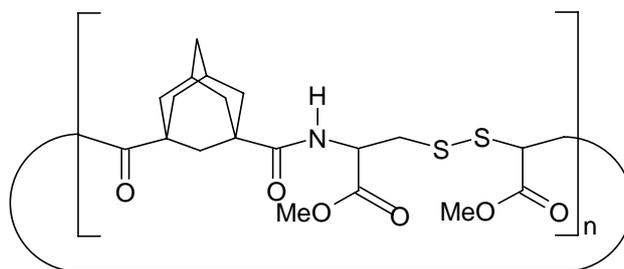
Abb. 1.10 Cyclopeptid *cyclo-[(L)Pro-AB(5CO₂H)]₃*, **5**.

Die von Kubik verwendete strukturell variable Cyclopeptidgrundstruktur ermöglicht noch eine Reihe von Ansätzen zur Kontrolle der Rezeptoreigenschaften. Diese Arbeit stellt meinen Beitrag zu diesen Untersuchungen dar.

2 Theoretischer Teil

2.1 Aufgabenstellung

Bei den Untersuchungen zur Konformation und den Rezeptoreigenschaften der von Kubik entwickelten Cyclopeptide wurde bisher der Einfluß der aromatischen Bausteine und der natürliche Aminosäure auf Konformation und Bindungseigenschaften untersucht sowie weitere Bindungszentren in die Makrocyclen eingeführt. Dabei standen im wesentlichen cyclische Hexapeptide im Mittelpunkt der Untersuchungen, die sequentiell aus den zugrundeliegenden Dipeptid aufgebaut wurden. Ausgehend von einem geeigneten Dipeptid aus einer natürlichen und einer aromatischen Aminosäure wird dieses also erst zum linearen Tetrapeptid, dann zum linearen Hexapeptid aufgebaut und schließlich cyclisiert. Um einen schnelleren Zugang zu neuen Cyclopeptiden zu ermöglichen, will ich im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren entwickeln, mit dem solche Cyclopeptide direkt aus einem Dipeptid hergestellt werden können. Bei dieser „Direktcyclisierung“ entsteht unter den Bedingungen der Peptidsynthese aus dem verwendeten Dipeptid das cyclische Hexapeptid, ohne daß die linearen Zwischenstufen wie beim sequentiellen Aufbau isoliert werden müssen. Bei den Calixarenen, die durch Umsetzung von Phenolen mit Formaldehyd gebildet werden, ist dieses Direktverfahren die Methode der Wahl. Die Ringgröße läßt sich hier hervorragend durch die Reaktionstemperatur und die Menge der zugesetzten Base steuern.



6a-d

Abb. 2.1 Cyclopeptide **6a-d** aus L-Cysteindimthylester mit 1,3-Adamantandicarbonyldichlorid; **6a**: $n=2$, **6b**: $n=3$, **6c**: $n=4$, **6d**: $n=5$.

D. Ranganathan hat gezeigt, daß sich eine analoge Methode auch zur Synthese der Hybridcyclopeptide **6a-d** (Abb. 2.1) anwenden läßt, die in einem Schritt durch

Direktcyclisierung von L-Cysteindimthylester mit 1,3-Adamantandicarbonyldichlorid dargestellt werden konnten.³⁶

Darüber hinaus will ich in dieser Arbeit die Untersuchungen zur Einführung weiterer Bindungszentren in die Cyclopeptide fortführen. Vorbild für meine Studie sind wieder die Calixarene: Ungaro et al. haben Calix[4]arene hergestellt, die am upper rim entweder eine Carboxylgruppe oder eine Aminofunktion als Ankergruppe für Bindungszentren trugen.^{18,19b} Diese wurden im ersten Fall *N*-terminal, im zweiten Fall C-terminal mit Aminosäuren zu den eingangs erwähnten Peptidocalix[4]arenen verknüpft, wodurch sich zwei sehr unterschiedliche Klassen von Rezeptoren ergaben. Während die *N*-verknüpften Peptidocalix[4]arene als Vancomycin Mimetikum Anwendung fanden, wurden die C-verknüpften Peptidocalix[4]arene zur Anionenerkennung verwendet. Eben dieses Konzept soll nun auf Rezeptor **7** übertragen werden. Zur Darstellung der Zuckerrezeptoren auf Basis solcher Cyclopeptide wurde, wie Eingangs erwähnt, ein Cyclohexapeptid verwendet, das in 5-Position der aromatischen Untereinheiten Carboxylgruppen trägt, mit der die zusätzlichen Bindungsarme amidisch angeknüpft werden konnten. In Analogie zu den Peptidocalix[4]arenen von Ungaro et al. sollen von mir nun Cyclopeptide hergestellt werden, die anstelle der Carboxylgruppen Aminofunktionen zur Einführung weiterer Bindungszentren tragen. Neben der Möglichkeit, verschiedene Carbon- und Aminosäuren an diese Aminogruppen anzubinden, soll in erster Linie die Eignung von Harnstoffsubstituenten als zusätzliche Bindungszentrum untersucht werden. Harnstoffe sind sowohl in acyclischen³⁷ als auch in makrocyclischen Rezeptoren³⁸ – darunter auch in Calixarenen^{17d+f,39} und synthetischen Cyclopeptiden⁴⁰ – als Bindungszentren für verschiedene Anionen eingesetzt worden. Als selbstkomplementäre Wasserstoffbrückenbildner wurden sie außerdem zur Selbstassoziation von harnstoffsubstituierten Calixarenen zu molekularen Kapseln verwendet.⁴¹ Durch den Einbau von Harnstoff in Hybridcyclopeptide konnten neue selbstassoziierte Peptidnanoröhren gewonnen werden.⁴² Zur Untersuchung des Potentials von Harnstoffsubstituenten in den hier beschriebenen Cyclopeptiden, soll dementsprechend Rezeptor **7** hergestellt werden (Abb. 2.2).

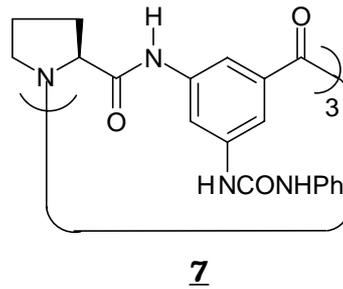


Abb. 2.2 Cyclopeptid *cyclo*-[(L)Pro-AB(5NHCONHPh)]₃, **7**.

In einem weiteren Projekt, das ich im Rahmen dieser Arbeit behandeln will, werde ich versuchen, die Flexibilität der Cyclopeptide durch strukturelle Veränderung der natürlichen Aminosäure weiter zu verringern. Durch den Wechsel von Glutaminsäure zum cyclischen Prolin hat Kubik die Rigidität seiner cyclischen Hexapeptide bereits deutlich erhöhen können. Mit der Einführung von 2*S*-Aminosuccinimid (Suc) in Rezeptor **8** (Abb. 2.3) soll nun einen alternativer Weg getestet werden.⁴³ In Cyclopeptid **8** wird nämlich die Rotation der C(α)-C=O und der C=O-N Bindung in der Succinimiduntereinheit unterbunden, während in **2** die Rotation der N-C(α) in den Prolinringen verhindert wird. Dieser Unterschied könnte die Rezeptoreigenschaften von **8** im Vergleich zu denen von **2** deutlich beeinflussen.

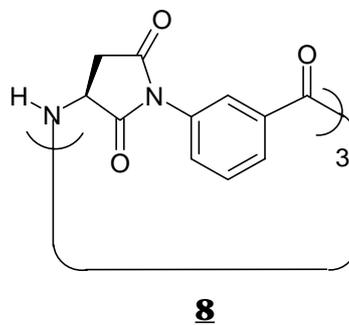


Abb. 2.3 Cyclopeptid *cyclo*-[(L)Suc-AB]₃, **8**.

2.2 Cyclische Hexapeptide mit Succinimiduntereinheiten

In diesem Teil der Arbeit sollte durch Variation der natürlichen Aminosäure ein cyclisches Hexapeptid (**8**) mit einer im Vergleich zu den Peptiden **1** und **2** erhöhter Rigidität hergestellt werden (Abb. 2.4). Von einer solchen Versteifung des Makrocyclus erwartete ich eine Verbesserung der Rezeptoreigenschaften.

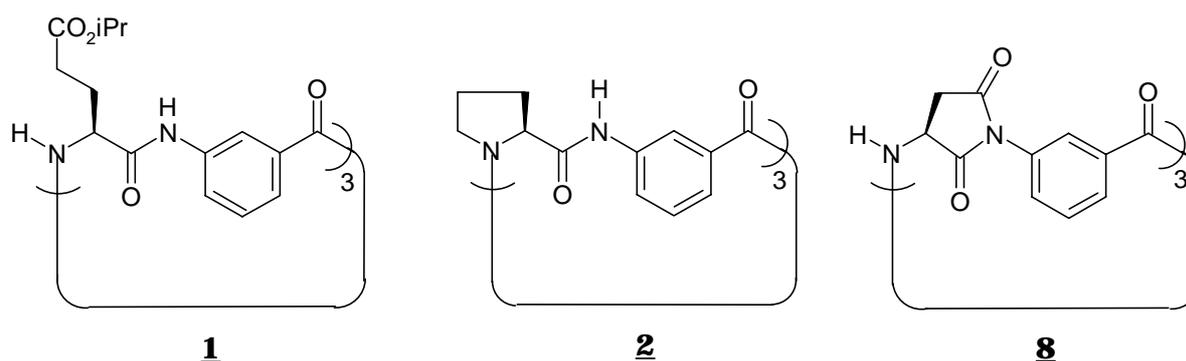


Abb. 2.4 Cyclische Hexapeptide mit verschiedenen natürlichen Aminosäuren.

Die cyclischen Hexapeptide **1** und **2** bilden nämlich mit ihren aromatischen Untereinheiten einen Hohlraum aus, in dem quaternäre Alkylammoniumionen durch Kationen- π -Wechselwirkungen gebunden werden können. Je besser dieser Hohlraum in der zur Kationenerkennung optimalen Geometrie vororganisiert ist, desto stabiler sind die entsprechenden Komplexe, weil ungünstige entropische Faktoren, d. h. die Verringerung der konformativen Flexibilität der Cyclopeptide während der Komplexbildung, durch diese Präorganisation mehr und mehr wegfallen. Konformation und konformative Beweglichkeit solcher Cyclopeptide spielen also eine maßgebliche Rolle für die Kationenaffinität. Wie eingangs beschrieben, hat der Einbau des cyclischen Prolins in Cyclopeptid **2** die Flexibilität des Hexapeptides reduziert, indem die Rotation um die C(α)-N-Bindung der α -Aminosäure unterbunden wurde. Die Rezeptoreigenschaften von **2** wurden damit gegenüber Hexapeptid **1** mit der acyclischen Glutaminsäure als natürlichem Baustein deutlich verbessert.

Ich möchte nun eine weitere Variation der natürlichen Aminosäure vornehmen und 2S-Aminosuccinimid verwenden. Durch den Einbau des Succinimids wird die Rotation um eine andere Bindung eingeschränkt, nämlich die um die C(α)-C=O und die C=O-N Bindung der α -Aminosäure. Dadurch wird die Zahl der rotierbaren Bindungen zwischen zwei aromatischen Peptiduntereinheiten in Hexapeptid **8** gegenüber **2** auf drei verringert (Abb. 2.5).

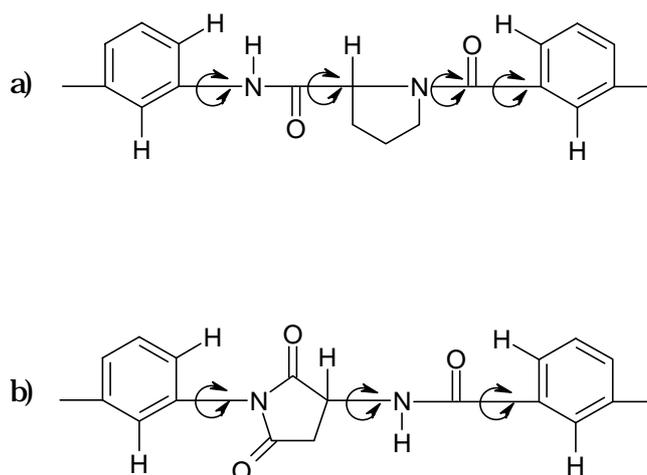
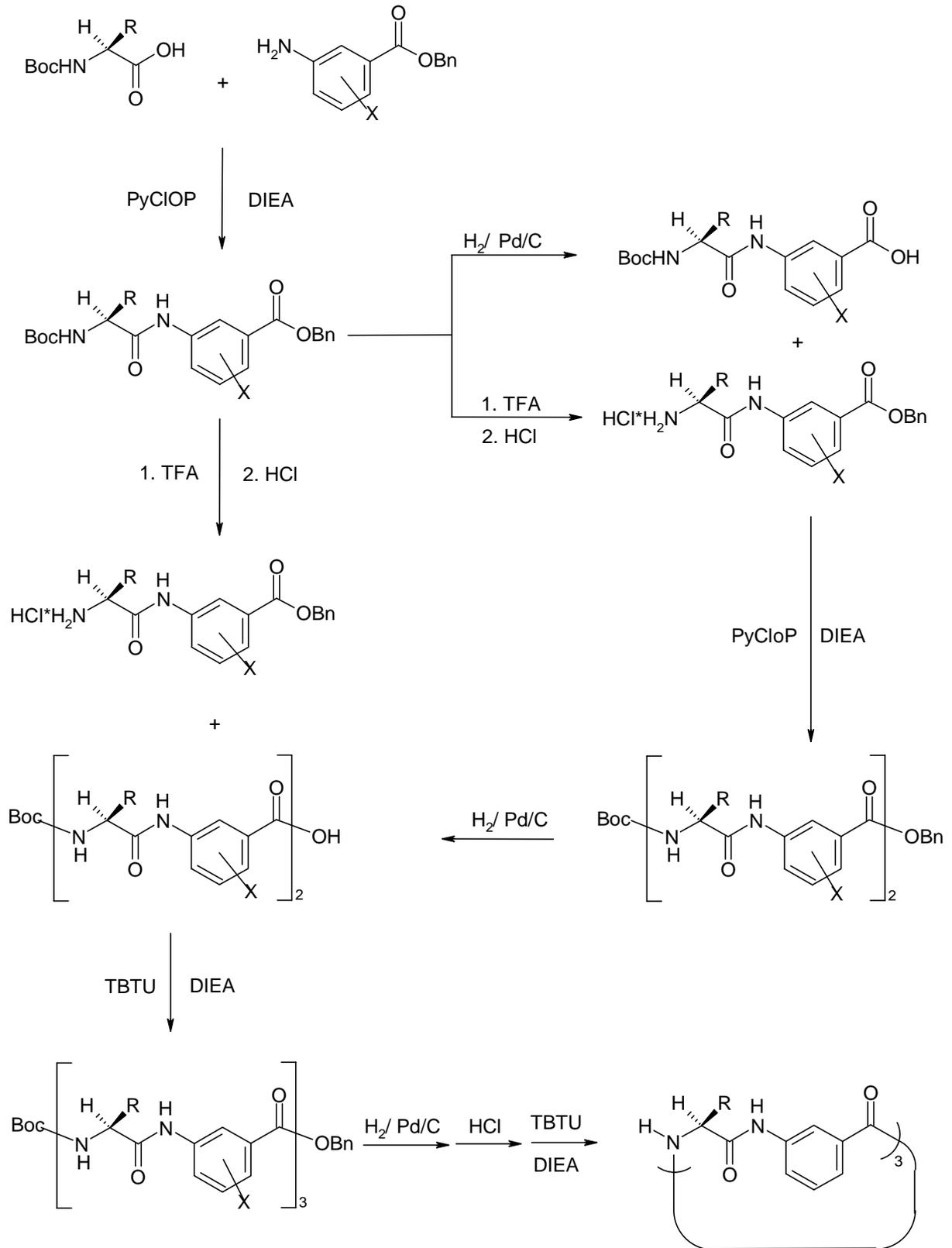


Abb. 2.5 Rotierbare Bindungen a) in Cyclopeptid **2**, b) in Cyclopeptid **8**.

Die Darstellung des Hexapeptides **8** soll nach dem bereits etablierten sequentiellen Aufbau erfolgen.³⁰ Der allgemeine Ablauf dieser Synthese, ausgehend von der *N*-geschützten natürlichen und der (gegebenenfalls substituierten) *C*-geschützten 3-Aminobenzoesäure, ist in Schema 2.1 dargestellt. Als Schutzgruppen haben sich bei dieser Sequenz das *t*-Butylcarbammat (Boc-Schutzgruppe) für die aliphatischen Aminogruppen und der Benzylester (Benzylschutzgruppe) für die aromatische Carbonsäure bewährt. Die natürlichen Aminosäuren waren meist kommerziell erhältlich, während die aromatischen Aminosäuren synthetisiert werden mußten. Zur Darstellung des Dipeptides wurde das aromatische Amin mit der α -Aminocarbonsäure gekuppelt. Trotz der etwas verringerten Nucleophilie der aromatischen Amine können mit PyCloP als Kupplungsreagenz in den meisten Fällen Ausbeuten von über 90% erreicht werden. Ausgehend von dem so erhaltenen Dipeptid wird dann durch wiederholtes Entschützen und Kuppeln erst das lineare Tetrapeptid, dann das lineare Hexapeptid und schließlich das cyclische Hexapeptid hergestellt. Da in der Regel ab der Stufe des linearen Hexapeptides die Peptide nicht mehr in Chloroform oder Methylenechlorid, sondern nur in DMF löslich sind, müssen die Kupplungen ab diesem Punkt mit TBTU durchgeführt werden, da die Umsetzung mit PyCloP in DMF zu Nebenreaktionen führt.⁴⁴



Schema 2.1

Sequentieller Aufbau der cyclischen Hexapeptide.

Soll diese Reaktionssequenz auf die Zielverbindung **8** übertragen werden, so muß als erstes das cyclische Imid **9** (Abb. 2.6) aus Asparaginsäure und 3-Aminobenzoessäure hergestellt werden.

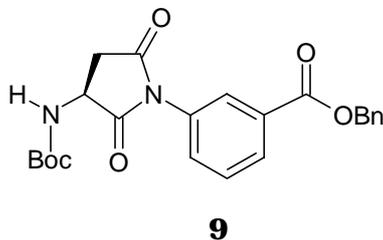
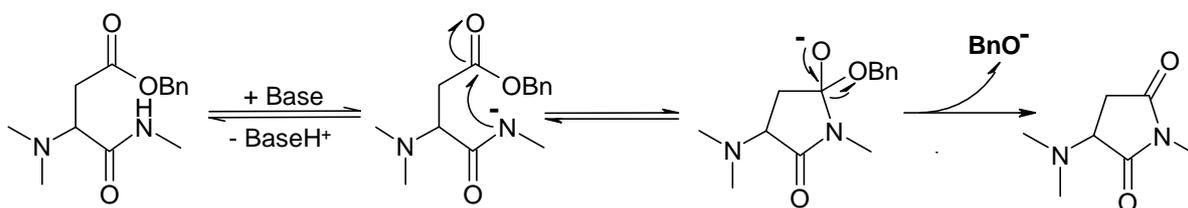


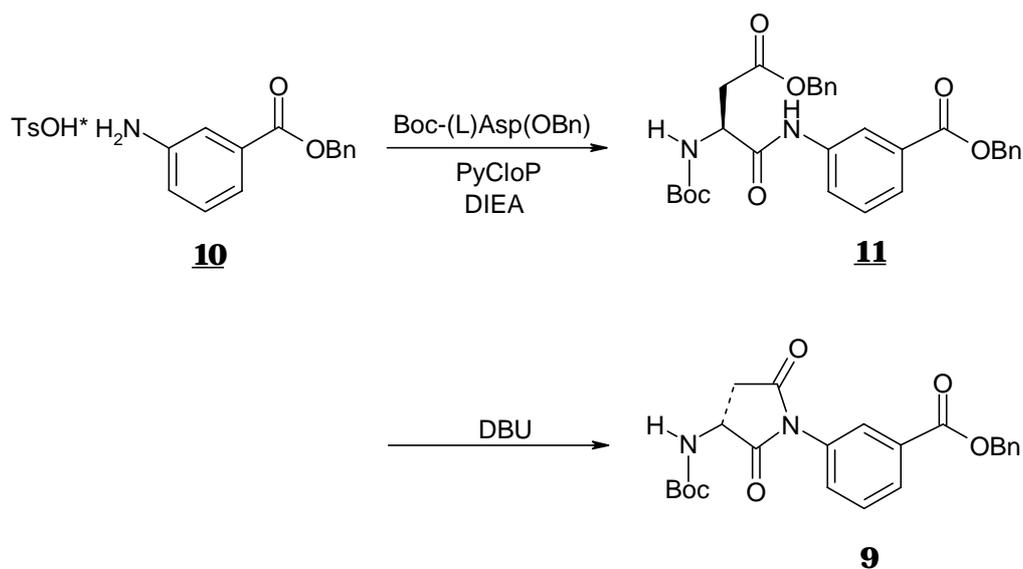
Abb. 2.6 Dipeptid Boc-(L)Suc-AB-OBn, **9**.

Die Bildung solcher cyclischen Imide als Zersetzungsprodukt von β -benzylgeschützten Asparaginsäure- oder glutaminsäurehaltigen Peptiden ist als Nebenreaktion in der Peptidsynthese wohlbekannt.⁴⁵ Der Mechanismus der Abbaureaktion ist in Schema 2.2 dargestellt.⁴⁶



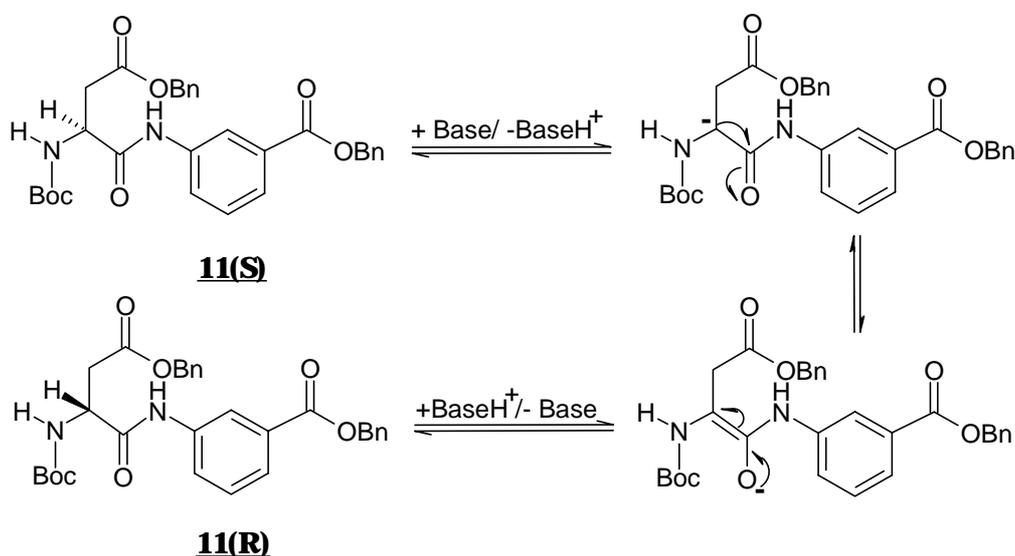
Schema 2.2 Mechanismus der basischen Zersetzung von Asparaginsäure- β -benzylestern.

Diese Zersetzungsreaktion von Asparaginsäure- β -benzylestern zum 2S-Aminosuccinimid will ich nun gezielt zur Synthese von **9** nutzen. Samukov et al. beschrieben eine sehr einfache Methode zur Cyclisierung des Benzylesters von Boc-Asp(OBn)-Gly-OPse (Pse= 2-[4-(phenylazo)benzylsulfonyl]ethylether) zum Succinimid unter Einwirkung der Base DBU.⁴⁷ Ob das Peptid unter den verwendeten, stark basischen Bedingungen racemisiert, wurde dabei allerdings nicht untersucht. Um zu überprüfen, ob dieser direkte Weg für die Darstellung des enantiomerenreinen Succinimids **9** geeignet ist, habe ich das Dipeptid **11** aus Asparaginsäure- β -benzylester und 3-Aminobenzoessäurebenzylester-TsOH (**10**)³⁰ nach Standardmethoden hergestellt und nach Samukov mit einem Überschuß von DBU in DMF umgesetzt (Schema 2.3).



Schema 2.3 Versuch zur Darstellung des Dipeptides Boc-(L)Suc-AB-OBn, **9**, nach Samukov.

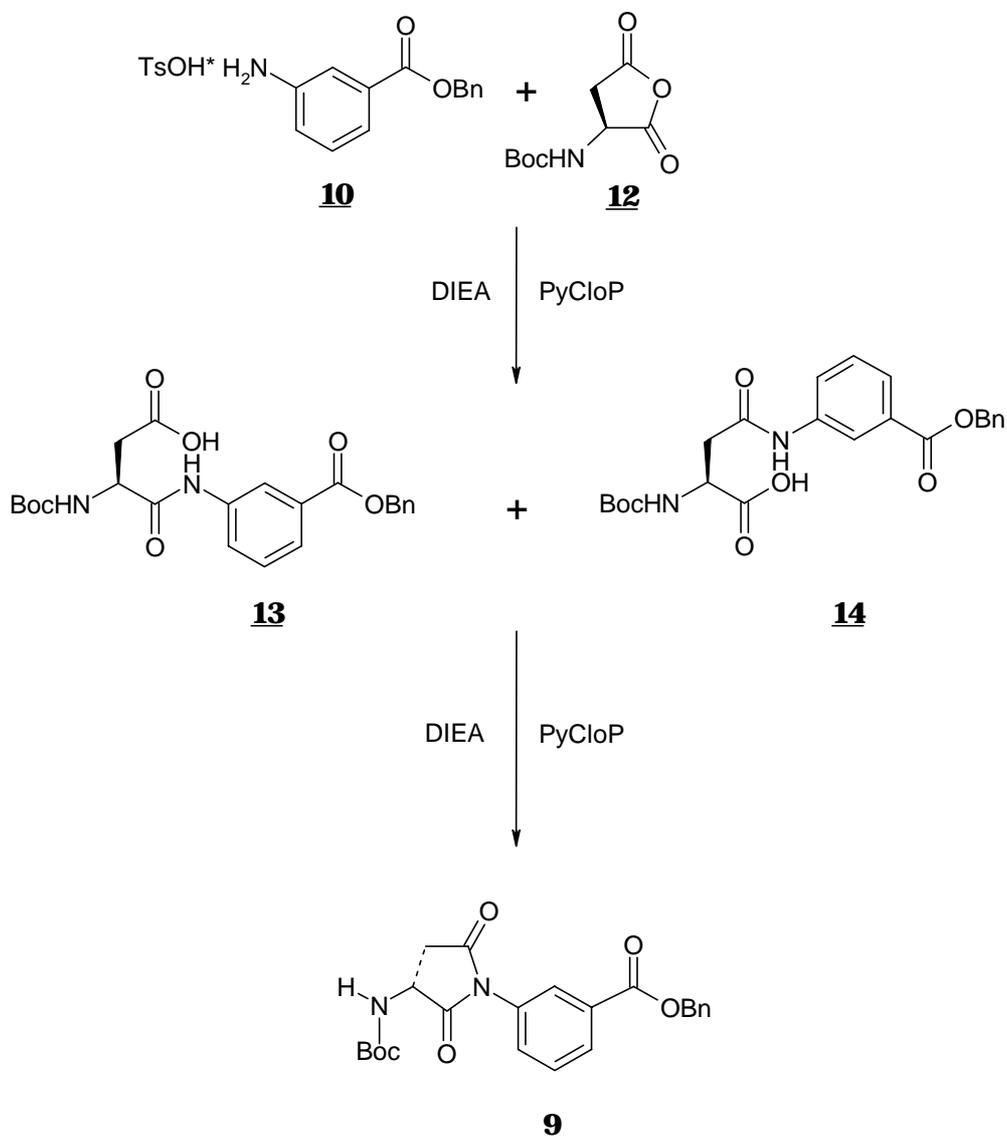
Wie durch Drehwertmessung und chirale HPLC nachgewiesen werden konnte, trat unter diesen Reaktionsbedingungen vollständige Racemisierung ein. Ursache dafür sind sicherlich die stark basischen Reaktionsbedingungen, die im Gleichgewicht zu einer Abspaltung des aciden C(α)-H führen könnte, was die Racemisierung erklärt (Schema 2.4).



Schema 2.4 Mechanismus der Racemisierung von **11**.

Um unter milderen Bedingungen das Succinimid enantiomerenrein zu erhalten, wurde **11** statt mit DBU mit nur einem Äquivalent DIEA umgesetzt. DIEA ist eine wesentlich schwächere

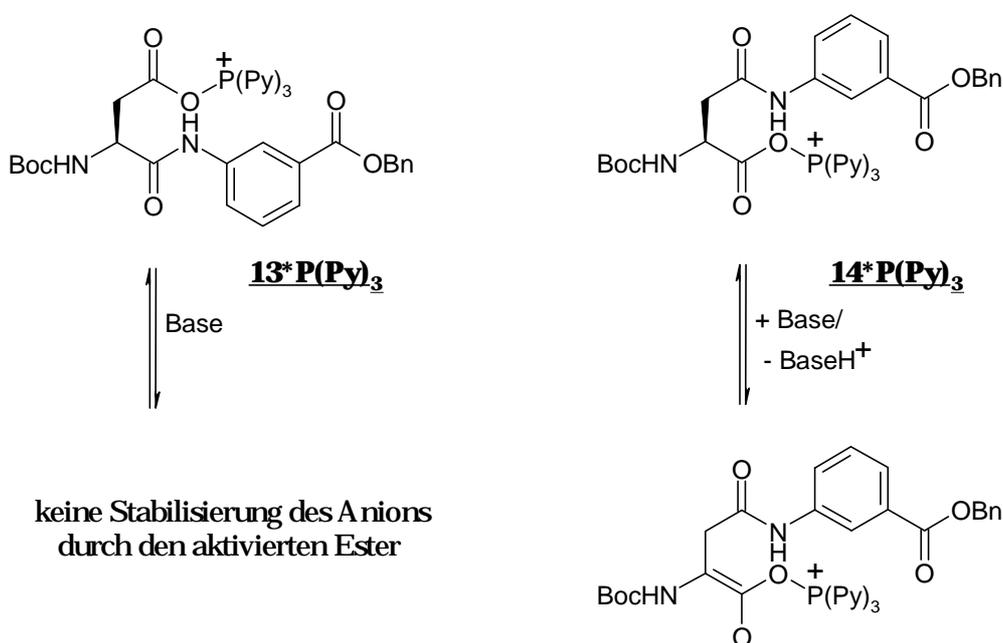
Base, die standardmäßig in der Peptidsynthese eingesetzt wird. Dennoch tritt auch unter diesen Bedingungen vollständige Racemisierung ein. Daher wurde die alternative Synthesestrategie in Schema 2.5 entworfen, bei der eine Freisetzung von Alkoholat, die möglicherweise eine Ursache für die beobachtete Racemisierung sein könnte, umgangen wird.



Schema 2.5 Alternative Strategie zur Darstellung des Dipeptides Boc-(L)Suc-AB-OBn, **9**.

Bei dieser Reaktionssequenz wird das Asparaginsäureanhydrid⁴⁸ **12** mit 3-Aminobenzoesäurebenzylester **10** umgesetzt. Dabei wird das Anhydrid geöffnet. Je nachdem, ob der Angriff des aromatischen Amins **10** am α - oder am β -Carbonylkohlenstoff erfolgt, bilden sich die beiden Regioisomere **13** und **14**. Eine Trennung der Regioisomere ist hier allerdings nicht nötig, da beide bei der anschließenden Cyclisierung zum gewünschten

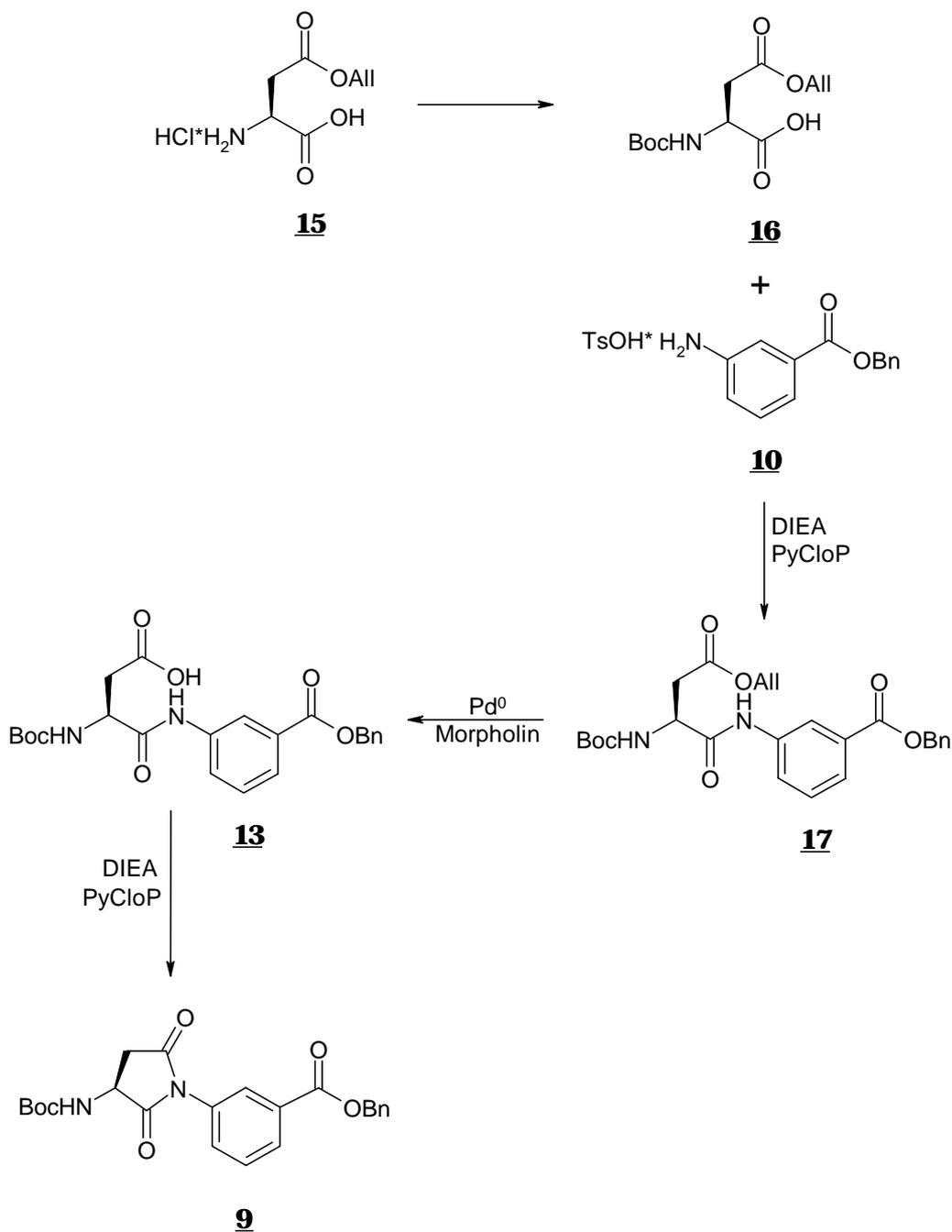
Produkt **9** weiterreagieren. Diese Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Methylenchlorid/Methanol). Es zeigte sich, daß **13** wesentlich reaktiver ist als **14**: Aus der Mischung der beiden Regioisomere reagiert nur **13** vollständig zu **9**. Das Regioisomer **14** wird langsamer und auch nur unvollständig umgesetzt. Da bei dieser Reaktionsführung kein Alkoholat freigesetzt wird, sollte das Dipeptid unter diesen Bedingungen enantiomerenrein darzustellen sein. Dennoch zeigte sich in der HPLC, daß auch hier teilweise Racemisierung auftritt (etwa 5%). Der deutlich geringere Grad der Racemisierung ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß nur der aktivierte Ester **14·P(Py)₃**, für eine Racemisierung anfällig ist, wie in Schema 2.6 veranschaulicht wird:



Schema 2.6

Mechanismus der Racemisierung des Regioisomers **14**.

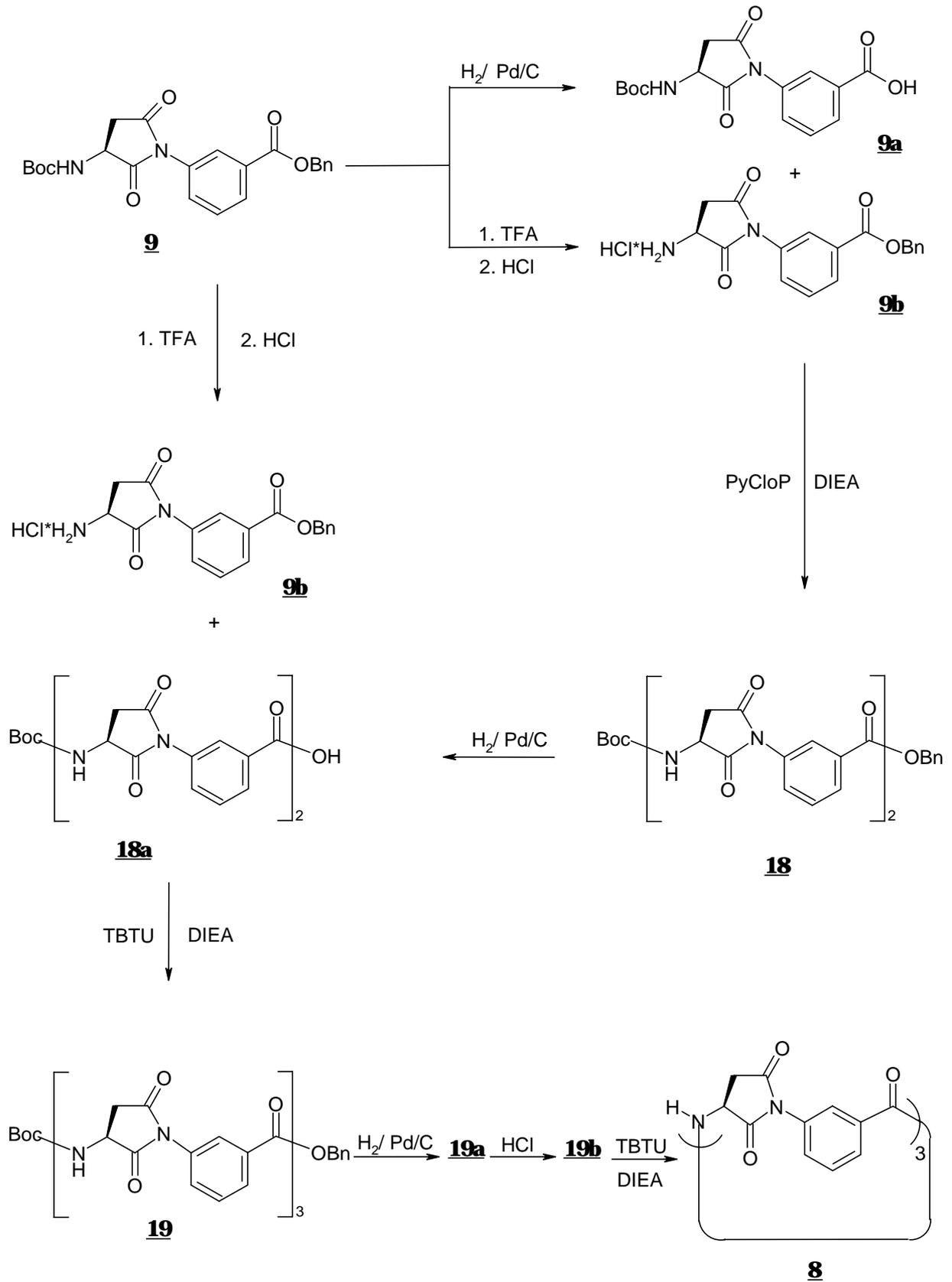
Da eine saubere Trennung der beiden Regioisomere durch chromatographische Methoden nicht gelang, wurde eine dritter Syntheseweg eingeschlagen, über den es schließlich möglich war, das gewünschte Dipeptid enantiomerenrein herzustellen (Schema 2.7).



Schema 2.7

Synthese von Boc-(L)Suc-AB-OBn, **9** über den Allylester.

Nach der Methode von Lajoie et al.⁴⁹ wurde zunächst das Hydrochlorid des (L)Asparaginsäure- β -allylesters (**15**) hergestellt und zum *t*-Butylcarbamat **16** umgesetzt. Nach Kupplung zum Dipeptid **17** konnte der β -Allylester nach Standardmethode gespalten und das gewünschte Regioisomer **13** selektiv erhalten werden. Die Cyclisierung von **13** mit PyCloP führte anschließend, wie erwartet, zum enantiomerenreinen Produkt **9**. Ausgehend von **9** wurde nun das Cyclopeptid **8** nach der eingangs erläuterten Methode sequentiell aufgebaut (Schema 2.8).

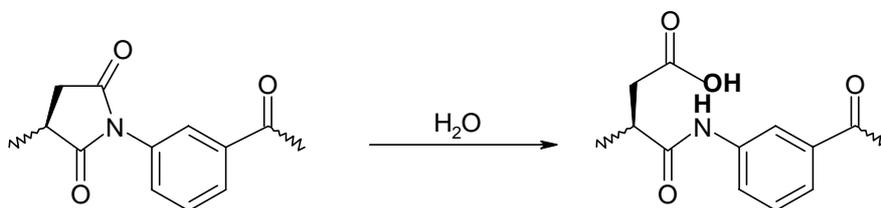


Schema 2.8

Sequentieller Aufbau von cyclo-[(L)Suc-AB]₃, **8**.

Die Synthese verlief bis zur Stufe des linearen Hexapeptides erfolgreich, alle linearen Peptide waren stabil und konnten analysenrein erhalten werden. Bei der Cyclisierung des vollständig geschützten linearen Hexapeptides wurde jedoch die Bildung zahlreicher Nebenprodukte beobachtet. Das isolierte Rohprodukt konnte über eine Kieselgelsäule mit Methylchlorid/Methanol 5:1 jedoch soweit aufgereinigt werden, daß das Hexapeptid **8** sauber aus den Fraktionsgläsern auskristallisierte, wie durch C,H-Analyse des isolierten Produktes gezeigt werden konnte. Dabei war die Ausbeute mit 2% allerdings extrem gering. In den Mutterlauge der Produktfraktionen wurden nach Abfiltrieren des Produktes immer noch sämtliche Nebenprodukte dünnschichtchromatographisch nachgewiesen. Diese Beobachtung legte nahe, daß das cyclische Produkt instabil ist und offensichtlich leicht zur Zersetzung neigt. Dies wurde überprüft, indem eine kleine Menge des sauberen Cyclopeptides **8** in Methylchlorid/Methanol 1:1 gelöst und auf eine DC-Platte aufgetragen wurde. Nach Entwicklung mit Methylchlorid/Methanol 5:1 wurden auf der DC-Platte sämtliche Nebenprodukte, bei denen es sich also offensichtlich um Zersetzungsprodukte handelt, beobachtet. In der Mischung dieser Zersetzungsprodukte zeigte sich im Massenspektrum als höchste Masse ein Peak bei einem Verhältnis m/z von 667, einer Masse, die um 18 schwerer ist als der $M + H^+$ Peak von Cyclopeptid **8**. Dieser Peak kann dementsprechend einem Produkt zugeordnet werden, in dem ein Molekül Wasser an Cyclopeptid **8** addiert wurde. Diese Reaktion ist sehr wahrscheinlich durch Hydrolyse des Succinimids auf dem sauren Kieselgel eingetreten, und führt, wie in Schema 2.9 gezeigt, zu einem Cyclopeptid, in dem ein Succinimidring geöffnet ist.

Für jeden Succinimidring, der gespalten wird, erhöht sich dabei das Molekulargewicht um 18 g/mol, da genau ein Molekül Wasser angelagert wird:



Schema 2.9

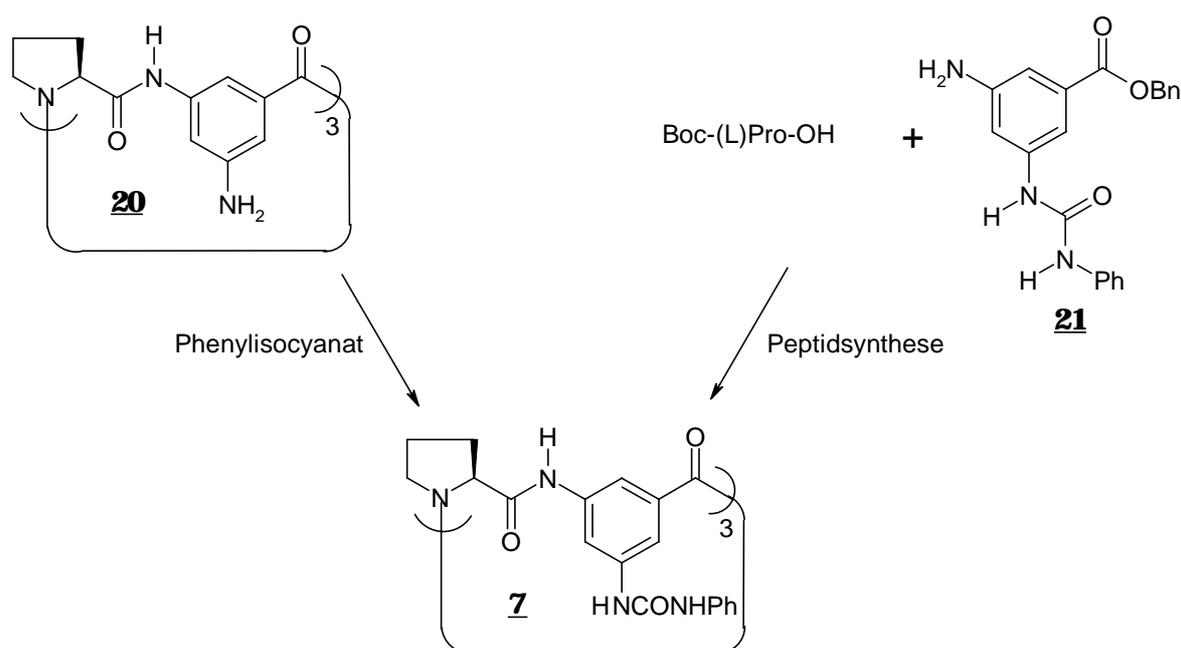
Hydrolyse des Succinimids auf Kieselgel.

Diese Instabilität des Cyclopeptides ist sicherlich neben der geringen Flexibilität der linearen Hexapeptidvorstufe, die eine Cyclisierung ebenfalls erschweren sollte, ein Grund für die außergewöhnlich schlechte Ausbeute bei der Cyclisierung. Die Ursache für die erhöhte

Hydrolyseanfälligkeit des Succinimids im Cyclopeptid, die bei den linearen Vorläufern nicht beobachtet wurde, muß ein Effekt des Makrocyclus sein. Es ist anzunehmen, daß der Ring von Cyclopeptid **8** so gespannt ist, daß das Succinimid sehr viel leichter geöffnet wird, um so Ringspannung des Makrocyclus abzubauen. Das Cyclopeptid sprengt also quasi selbst die Ketten, die ich ihm durch den Succinimidring anlegen wollte. Somit ist der Succinimidring ein ungeeigneter Baustein, um Cyclohexapeptide mit verminderter Zahl der rotierbaren Bindungen herzustellen. Bei meinen weiteren Untersuchungen habe ich mich daher auf Cyclopeptide mit (L)Prolin als starrer natürlicher Aminosäureuntereinheit konzentriert.

2.3 Cyclische Hexapeptide mit Harnstoffsubstituenten

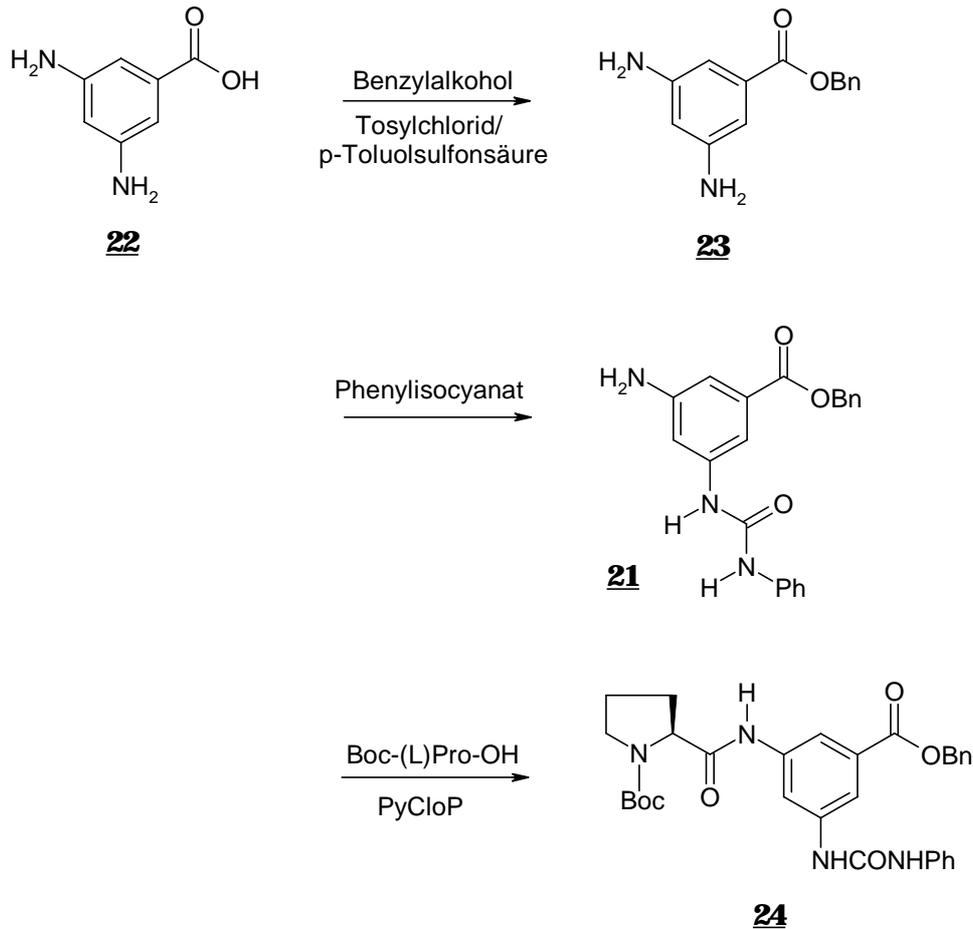
Das zweite strategische Ziel meiner Arbeit ist die Einführung von Harnstoffsubstituenten als zusätzliche Bindungszentren in das von Kubik entwickelte Cyclohexapeptid aus (L)Prolin und 3-Aminobenzoesäure. Dazu soll Cyclopeptid **7** nach der allgemeinen Reaktionssequenz in Schema 2.1 sequentiell aufgebaut werden. Es stellte sich dabei zunächst die Frage, an welcher Stelle der Synthese der Harnstoff in das Zielmolekül eingebaut werden soll (Schema 2.10). Man könnte die Harnstoffreste zu Beginn der Synthese einführen, indem man eine 3-Aminobenzoesäure mit geeigneten Harnstoffsubstituenten in 5-Position (**21**) als aromatischen Baustein in der Peptidsynthese verwendet. Oder aber man stellt zunächst das cyclische Hexapeptid aus (L)Prolin und 3,5-Diaminobenzoesäure her (**20**) und fügt die Harnstoffuntereinheiten erst in das fertige Cyclopeptid ein, zum Beispiel durch Umsetzung der aromatischen Aminogruppen mit Phenylisocyanat.^{39,41b}



Schema 2.10 Alternative Synthesestrategien für den Einbau der Harnstoffsubstituenten in cyclo-[(L)Pro-AB(5NHCONHPh)]₃, **7**.

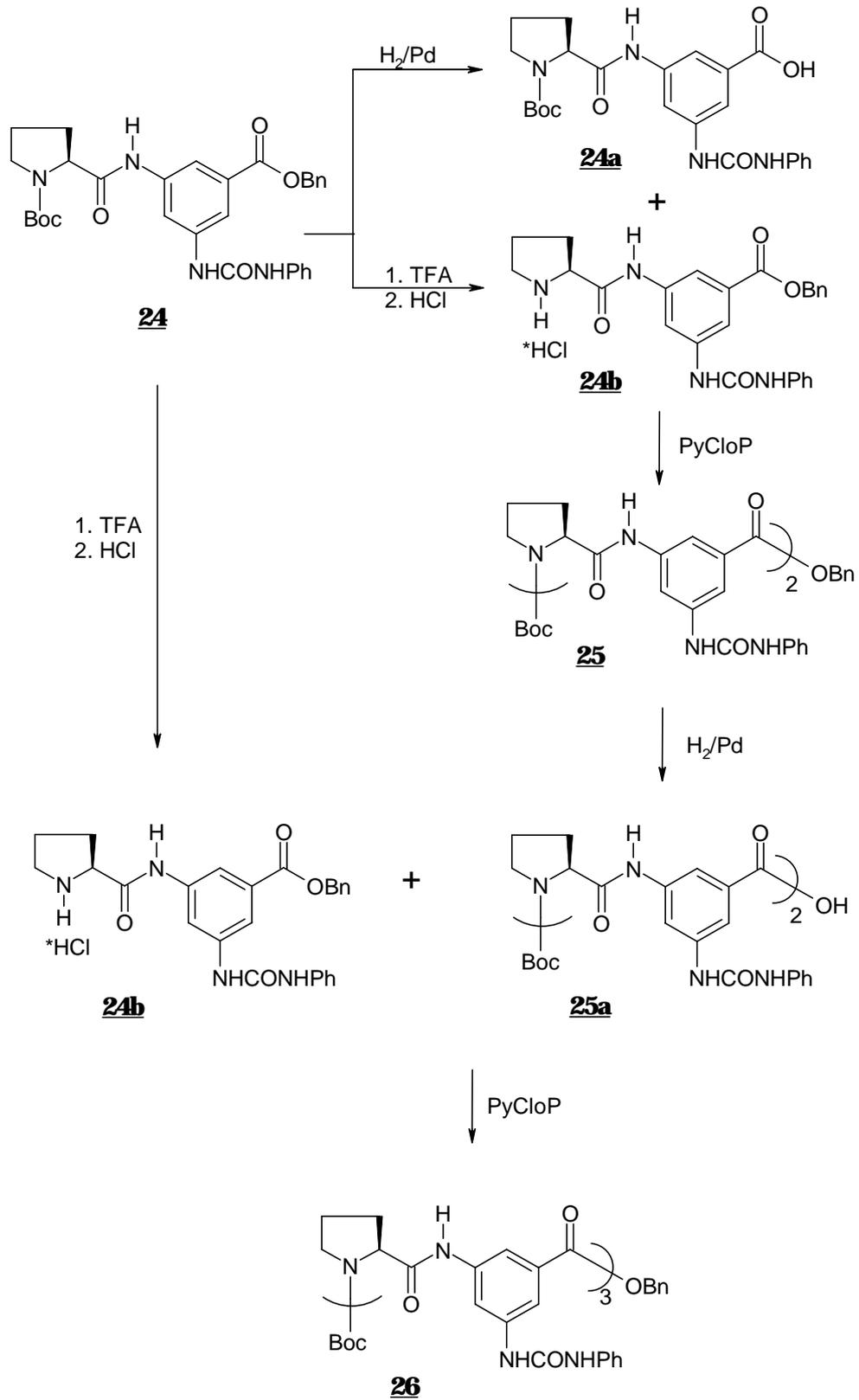
Auf Grund der geringen Reaktivität aromatischer Aminogruppen erschien es fraglich, ob eine gleichzeitige Umsetzung von drei Aminogruppen in einem Hexapeptid am Ende der Peptidsynthese möglich sei, besonders, weil die Nucleophilie der zweiten Aminofunktion durch den elektronenziehenden induktiven Effekt der metaständigen Amidfunktion im

Cyclopeptid gegenüber der freien 3,5-Diaminobenzoesäure etwas herabgesetzt wird. Daher schien es sinnvoller, den Harnstoff zu Beginn der Synthese einzuführen. Schema 2.11 zeigt die zu diesem Ziel entworfene Reaktionssequenz: Zunächst wurde nach der Methode von Arai und Maramatsu der Benzylester **23** hergestellt.⁵⁰ Durch Zugabe von einem Äquivalent Phenylisocyanat konnte selektiv der monosubstituierten Harnstoff **21** erhalten werden. Anschließend wurde **21** mit Boc-(L)Pro-OH zum Dipeptid **24** gekuppelt.



Schema 2.11 Synthese des Dipeptides Boc-(L)Pro-AB(5-NHCONHPh)-OBn, **24**.

Aus dem Dipeptid **24** wurde dann nach dem in Kapitel 2.2 beschriebenen allgemeinen Synthesekonzept das Hexapeptid sequentiell aufgebaut (Schema 2.12). Dabei stellte sich heraus, daß die Aufarbeitung der Produkte von Stufe zu Stufe schwieriger wurde. Zwar störte die Harnstofffunktion nicht bei den Entschützungs- und Kupplungsreaktion.



Schema 2.12 Synthese des linearen Hexapeptides Boc-[(L)Pro-AB(5-NHCONHPh)]₃-OBn, **26**.

Je länger jedoch die Peptidkette wurde, desto schwieriger war die Reinigung der Produkte durch die üblichen Verfahren (Chromatographie, Umkristallisation). Auf der Stufe des linearen Hexapeptides **26** war eine Abtrennung des Produktes von den Abbauprodukten des Kupplungsreagenzes dann gar nicht mehr möglich. Die Ursache hierfür liegt sicherlich bei den Harnstoffuntereinheiten, die auf Grund ihrer Polarität und ihrer Tendenz zur Aggregation die Aufarbeitung der Peptide erschweren. Wegen dieses grundsätzlichen Problems in der Handhabung dieser harnstoffhaltigen Peptide wurde die Synthese an dieser Stelle abgebrochen, da abzusehen war, daß eine Reinigung des cyclischen Endproduktes **7** unter diesen Bedingungen nicht möglich sein würde.

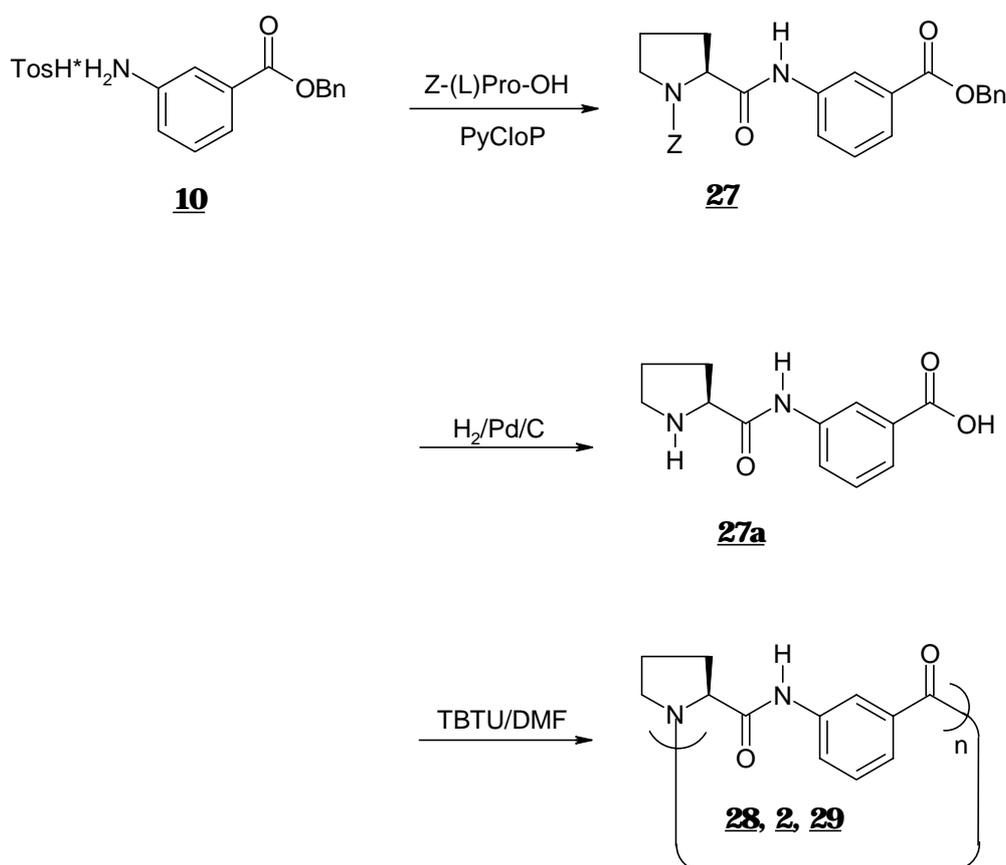
Diese Untersuchungen zeigten damit, daß es doch wesentlich günstiger sein sollte, die aromatische Aminofunktion während der Peptidsynthese zunächst mit einer unpolaren inerten Schutzgruppe zu maskieren, von der die Löslichkeit der Produkte und Zwischenstufen weitgehend unbeeinflusst bleibt und der Ablauf der Peptidsynthese nicht gestört wird. Die Einführung der Harnstoffsubstituenten muß dann am Ende der Synthese auf der Stufe eines cyclischen Hexapeptides mit freien Aminogruppen erfolgen. Daß diese Vorgehensweise wahrscheinlich möglich sein sollte, hat die Umsetzung des monosubstituierten 3,5-Diaminobenzoessäurederivates **21** zum Dipeptid **24** mit einer hohen Ausbeute von 97% gezeigt: Offensichtlich wird die Reaktivität der freien aromatischen Aminofunktion in 3,5-Diaminobenzoessäure durch die Derivatisierung nicht so weit herabgesetzt, wie zunächst angenommen.

Diese Synthesevariante läßt außerdem die Möglichkeit offen, Rezeptoren mit anderen Substituenten als Harnstoff in 5-Position herzustellen. Erste Ergebnisse zur Direktcyclisierung von Dipeptiden zu den cyclischen Hexapeptiden hatten zu diesem Zeitpunkt aber bereits erfolversprechende Ergebnisse geliefert und gezeigt, daß es möglich ist, das Hexapeptid **20** mit dieser neuen Synthesestrategie direkt aus dem Dipeptid zu erhalten. Deswegen wurde zur Darstellung von **7** das Konzept des sequentiellen Aufbaus nicht weiter verfolgt.

2.4 Synthese von Cyclopeptiden durch „Direktcyclisierung“

Wie aus Schema 2.1 ersichtlich ist, sind vom Dipeptid bis zum fertigen Cyclohexapeptid neun Stufen erforderlich. Die Ausbeute der Stufen beträgt im Durchschnitt etwa 95%. Lediglich bei der Cyclisierung ist die Ausbeute deutlich geringer und empfindlich von der Wahl der Aminosäuren abhängig. Je nach Substrat konnten hier Ausbeuten von 30-60% erreicht werden. Die Gesamtausbeute über die neun Stufen einer Cyclopeptidsynthese beträgt also typischerweise 20-40%. Durch eine Direktcyclisierung, ausgehend vom vollständig entschützten Dipeptid, können sechs der neun Stufen eingespart werden, was eine erhebliche Arbeitersparnis darstellt. Bei dieser Reaktionsführung wird ein vollständig entschütztes Dipeptid direkt unter Bedingungen umgesetzt, die üblicherweise bei der Cyclisierung linearer Hexapeptide verwendet werden. Während der Reaktion bilden sich aus dem Dipeptid zunächst die verschiedenen linearen Oligomere, die bei geeigneter Länge zum Cyclopeptid weiterreagieren können. Voraussetzung für ein Gelingen dieser verkürzten Synthese zur Darstellung cyclischer Hexapeptide ist natürlich, daß nur die linearen Hexapeptide cyclisieren, andere im Reaktionsgemisch auftretende Oligomere wie cyclische Tetra- oder Octapeptide aber nicht. Auf Grund der zu Beginn meiner Arbeit vorliegenden Ergebnisse schien diese Bedingung gegeben: Zum einen hat S. Kubik bereits gezeigt, daß sich durch Umsetzung linearer Tetrapeptide aus 3-Aminobenzoesäure und Glutamin- oder Asparaginsäure unter den Bedingungen der Peptidsynthese ausschließlich die entsprechenden cyclischen Octapeptide bilden. Eine Cyclisierung der linearen Tetrapeptide wurde dabei nicht beobachtet. Es bestand also kein Grund anzunehmen, daß sich bei der Direktcyclisierung eines Dipeptides unter ähnlichen Bedingungen cyclische Tetrapeptide bilden sollten. Zum anderen konnten cyclische Octapeptide mit (L)Prolin als natürlicher Aminosäure durch sequentiellen Aufbau nicht hergestellt werden, ihre Bildung wurde daher ebenfalls als unwahrscheinlich betrachtet. Bei Direktcyclisierung eines Dipeptides aus (L)Prolin und 3-Aminobenzoesäure erwarte ich also nur die Bildung cyclischer Hexapeptide, nicht aber die von Tetra- oder Octapeptiden. Deswegen habe ich meine Untersuchungen mit dem unsubstituierten Dipeptid **27** begonnen (Schema 2.8), welches durch Kupplung von Z-(L)Pro-OH mit dem 3-Aminobenzoesäurebenzylester **10**⁵¹ hergestellt wurde. Bisher haben wir zur Darstellung unserer Dipeptide fast immer die Boc-geschützten Derivate der natürlichen Aminosäuren eingesetzt. Da für die Direktcyclisierung das Dipeptid vollständig und nicht mehr selektiv entschützt werden muß, habe ich in diesem Fall die Z-Schutzgruppe vorgezogen. Diese kann nämlich unter den gleichen Bedingungen abgespalten werden wie der

Benzylester. Durch das simultane Entschützen des Dipeptides am *N*- und am *C*-Terminus konnte ich eine weitere Stufe in der Peptidsynthese einsparen. Um bei der Abspaltung der Schutzgruppen ein Ausfallen des entstehenden Betains aus der Reaktionslösung zu vermeiden, wurden während der Reaktion 1,2 Äquivalente DIEA zugesetzt. Es schien mir sinnvoll, für die Direktcyclisierung des freien Dipeptides **27a** zum Hexapeptid zunächst einmal die gleichen Reaktionsbedingungen anzuwenden, die sich bei der Cyclisierung des linearen Hexapeptides bereits bewährt hatten: Wegen der schlechten Löslichkeit der Hexapeptide haben wir diese Kupplungen in DMF durchgeführt. Außerdem hat sich gezeigt, daß die Ausbeute der Cyclisierung sehr verbessert werden kann, wenn das lineare Hexapeptid in großer Verdünnung vorgelegt und das Kupplungsreagenz langsam zugegeben wird. Die optimale Reaktionstemperatur liegt bei 80°C. Unter diesen Bedingungen wurde nun das entschützte Dipeptid **27a** umgesetzt (Schema 2.13).



Schema 2.13 Synthese der Cyclopeptide cyclo-[(L)Pro-AB]_n, **28**, n=2, **2**, n=3, **29**, n=4.

Das Ergebnis dieser Direktcyclisierung war äußerst überraschend: In der Reaktionslösung wurde durch Dünnschichtchromatographie die Bildung eines einzigen Produktes beobachtet, das mit 20% Ausbeute isoliert werden konnte. Die C,H-Analyse und das ¹H-NMR Spektrum

der Verbindung entsprachen einem cyclischen Oligomeren von **27a**. Im Massenspektrum der Verbindung zeigte sich dann aber, daß es sich nicht um das erwartete cyclische Hexapeptid **2** handelte, sondern um das cyclische Tetrapeptid **28**. Damit habe ich zum ersten Mal zeigen können, daß auch eine Bildung kleiner cyclischer Tetrapeptide mit starren aromatischen Untereinheiten möglich ist.

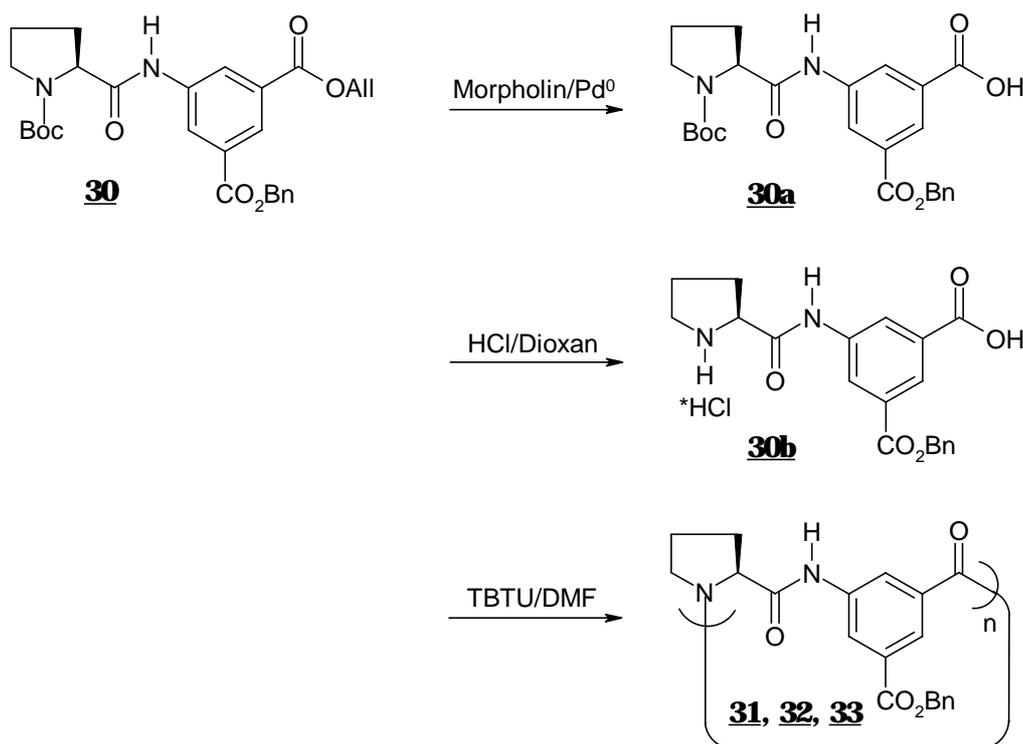
Es erschien nach unseren damaligen Erfahrungen sehr erstaunlich, daß dieses kleinere und sicherlich gespannte Tetrapeptid das Hauptprodukt der Direktcyclisierung ist. Dies bedeutet nämlich, daß das lineare Tetrapeptid, das sich in der Reaktionslösung zunächst aus dem Dipeptid **27a** bildet, sofort cyclisiert und nicht vor dem Ringschluß mit weiteren Dipeptideinheiten zu höheren Oligomeren weiterreagiert. Bei unseren bisherigen Untersuchungen zur Cyclisierung linearer Hexapeptide stand die Bildung höherer Oligomere mit dem Ringschluß stets in Konkurrenz, so daß wir durch Verdünnung, langsames Zutropfen des Kupplungsreagenzes und Erhöhen der Reaktionstemperatur einige Mühe unternehmen mußten, um die Bildung Oligomerisierung gegenüber der Cyclisierung des Hexapeptides zu unterdrücken.

Um mittels der Direktcyclisierung auch zu cyclischen Hexapeptiden zu gelangen, habe ich daraufhin die Reaktionsbedingungen in die umgekehrte Richtung verändert, um die Bildung höherer Oligomere gezielt zu fördern. Dabei wurden das Kupplungsreagenz direkt zugegeben, anstatt es langsam zur Reaktionslösung dazuzutropfen. Auch die Konzentration der Lösung wurde von 0,015 M auf 0,03 M verdoppelt. Auf diese Weise wird die bei unseren Cyclisierungen übliche Konzentration von 0,01 M erst erreicht, wenn im Schnitt drei lineare Dipeptide zusammen ein lineares Oligomer gebildet haben.

Da die Cyclisierung gegenüber der Oligomerisierung eine erhöhte Aktivierungsenergie hat, wurde zusätzlich die Reaktionstemperatur auf Raumtemperatur gesenkt, um die Cyclisierung des linearen Tetrapeptides zurückzudrängen.

Tatsächlich liefert die optimierte Direktcyclisierung bei Raumtemperatur nicht nur das cyclische Tetrapeptid **28** mit unveränderter Ausbeute von 19%, es bilden sich gleichzeitig das cyclische Hexa- (**2**) und das Octapeptid (**29**) mit Ausbeuten von etwa 6-7%. Unter diesen veränderten Reaktionsbedingungen ist es mir also gelungen, das cyclische Hexapeptid darzustellen. Außerdem konnte ich erstmals zeigen, daß die Darstellung linearer Octapeptide aus (L)Prolin und 3-Aminobenzoessäure möglich ist.

Um zu überprüfen, ob die Direktcyclisierung unempfindlich ist für die Anwesenheit von Substituenten in 5-Position an der Aminobenzoesäure, wurde die Direktcyclisierung auf das funktionalisierte Dipeptid **30** angewendet, das nach der Methode von J. Bitta hergestellt worden war (Schema 2.14).⁵¹ Nachdem mit Standardmethoden entschützt worden war, wurde **30b** erfolgreich cyclisiert und ergab wiederum das Tetrapeptid **31** (22%) und das Hexa- **32** und Octapeptid **33** (je 7%) mit sehr ähnlichen Ausbeuten wie bei der Cyclisierung des unsubstituierten Peptides **27**.



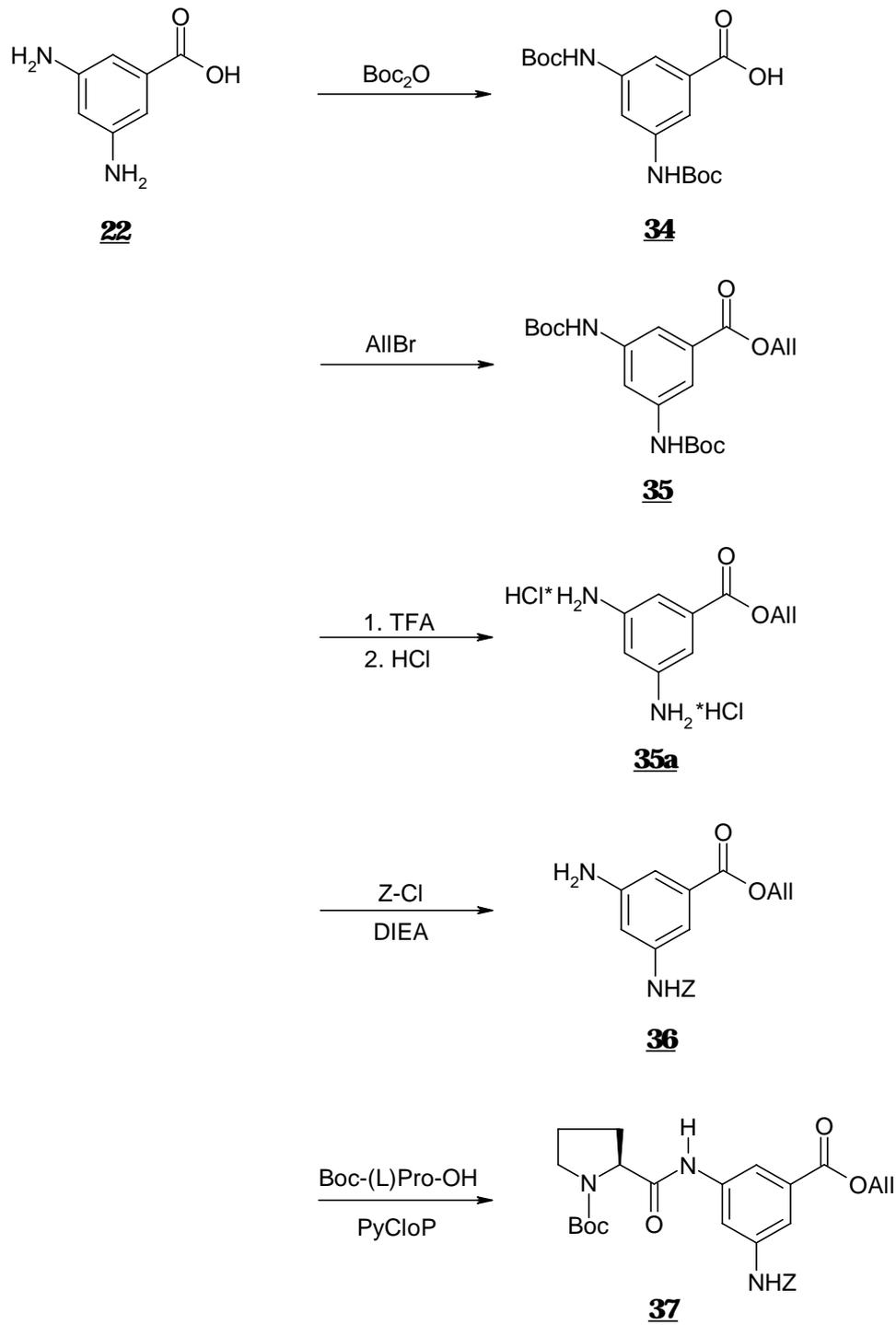
Schema 2.14 Synthese der Cyclopeptide cyclo-[(L)Pro-AB(5-CO₂Bn)]_{*n*}, **31**, *n*=2, **32**, *n*=3, **33**, *n*=4.

Ich habe also tatsächlich mein Ziel realisieren können, mit der Direktcyclisierung einen stark vereinfachten Zugang zu den cyclischen Hexapeptiden herzustellen. Zwar ist die Ausbeute mit weniger als zehn Prozent sehr gering, für eine erste Analyse der Struktur und der Rezeptoreigenschaften eines neuen Cyclopeptides werden allerdings nur Mengen von 100-200 mg benötigt. Im Hinblick auf die Zeit und Arbeitersparnis ist die Direktcyclisierung daher für den ersten Zugang zu einer neuen Verbindung auf jeden Fall eine sinnvolle Alternative. Ein weiterer Teilerfolg dieser Untersuchungen ist der Befund, daß die Darstellung cyclischer Octapeptide auch mit (L)Prolin als natürlichem Baustein möglich ist.

Der eigentliche Durchbruch, der mir mit der Entwicklung der Direktcyclisierung gelungen ist, ist jedoch die Entdeckung der cyclischen Tetrapeptide mit starren aromatischen Untereinheiten, deren Bildung bis jetzt als nicht möglich galt. Diese kleinen Cyclopeptide eröffnen völlig neue Möglichkeiten zur Darstellung von Rezeptoren, die sich wesentlich von den bisher untersuchten cyclischen Hexapeptiden unterscheiden. Daher habe ich ab diesem Zeitpunkt die Tetrapeptide intensiv in meine Untersuchungen einbezogen und später auch für Studien zur Einführung zusätzlicher Bindungszentren verwendet.

Auf Grund dieser vielversprechenden Ergebnisse bei der Entwicklung der Direktcyclisierung habe ich mich entschlossen, die Versuche zur Darstellung des cyclischen Hexapeptides **20** ebenfalls mit dieser vereinfachten Synthesemethode weiterzuführen. Zu diesem Zweck habe ich das funktionalisierte Dipeptid **37** hergestellt (Schema 2.15). Die aromatische Aminogruppe wurde als Benzylcarbammat (Z-Schutzgruppe) geschützt, da es sich bei der Direktcyclisierung des carbonylsubstituierten Dipeptides **30** bewährt hatte, die funktionelle Gruppe in 5-Position der Aminobenzoesäure während der Peptidsynthese als Benzylester zu schützen. Diese Schutzgruppe störte bei der Cyclisierung nicht und die fertigen Cyclopeptide konnte durch Hydrierung so sauber und vollständig entschützt werden, daß keine weiteren Reinigungsschritte notwendig waren.⁵² Dieser voraussichtliche Vorzug des Benzylcarbamates sollte bei der Synthese des aminosubstituierten Cyclopeptides **7** ebenfalls ausgenutzt werden. Dementsprechend wurde bei den anderen funktionellen Gruppen des Dipeptides die gleiche Kombination von Schutzgruppen verwendet wie bei **30**.

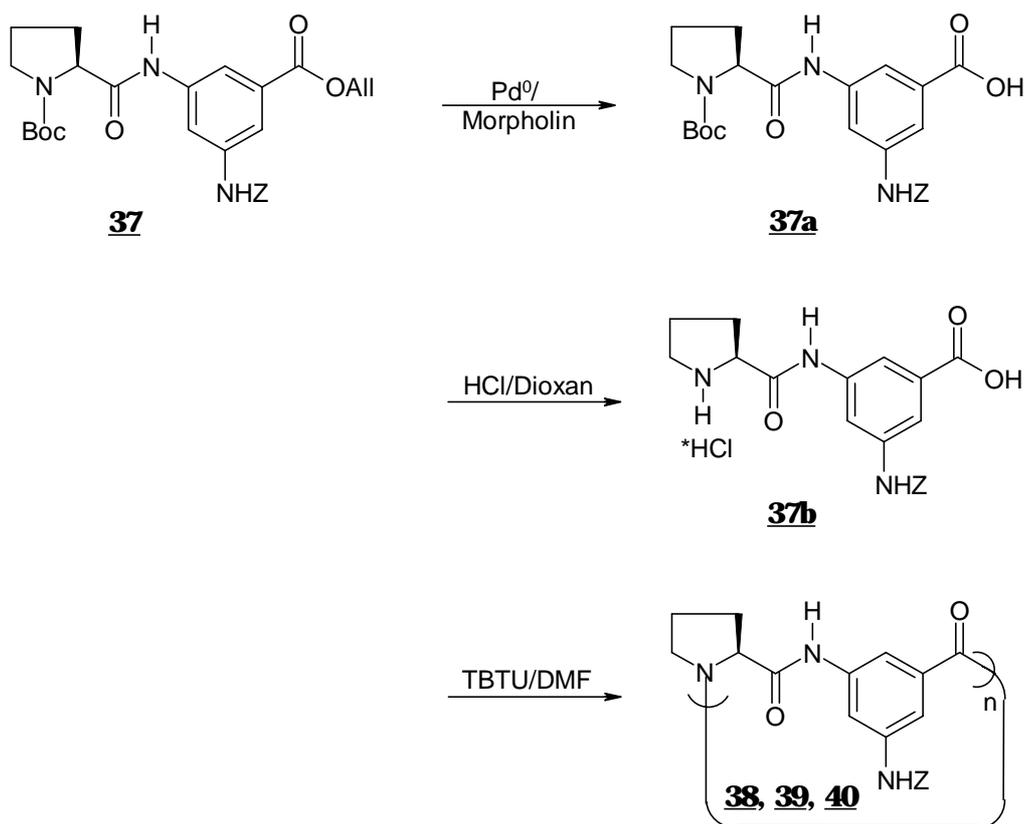
Zunächst wurde der Allylester **35** mit Allylbromid hergestellt. Um Nebenreaktionen zu vermeiden, wurden vorher die beiden Aminogruppen der 3,5-Diaminobenzoesäure mit Boc₂O als *t*-Butylcarbammat (Boc) geschützt (**34**). Nach der Veresterung wurden die beiden Boc-Schutzgruppen wieder abgespalten (**35a**). Dann wurde mit einem Äquivalent Benzylchlorformiat (Z-Cl) selektiv nur eine Aminogruppe geschützt (**36**) und die zweite Aminogruppe anschließend mit Boc-(L)Pro-OH zum Dipeptid **37** gekuppelt.



Schema 2.15

Synthese des Dipeptides Boc-(L)Pro-AB(5-NHZ)-OAll, **37**.

Die Schutzgruppen wurden dann nach Standardmethoden entfernt (Schema 2.16) und das vollständig entschützte Dipeptid **37b** direkt cyclisiert. Es konnte wiederum das cyclische Tetrapeptid als Hauptprodukt isoliert werden. Auch die Bildung des Hexa- und des Octapeptides wurde beobachtet.

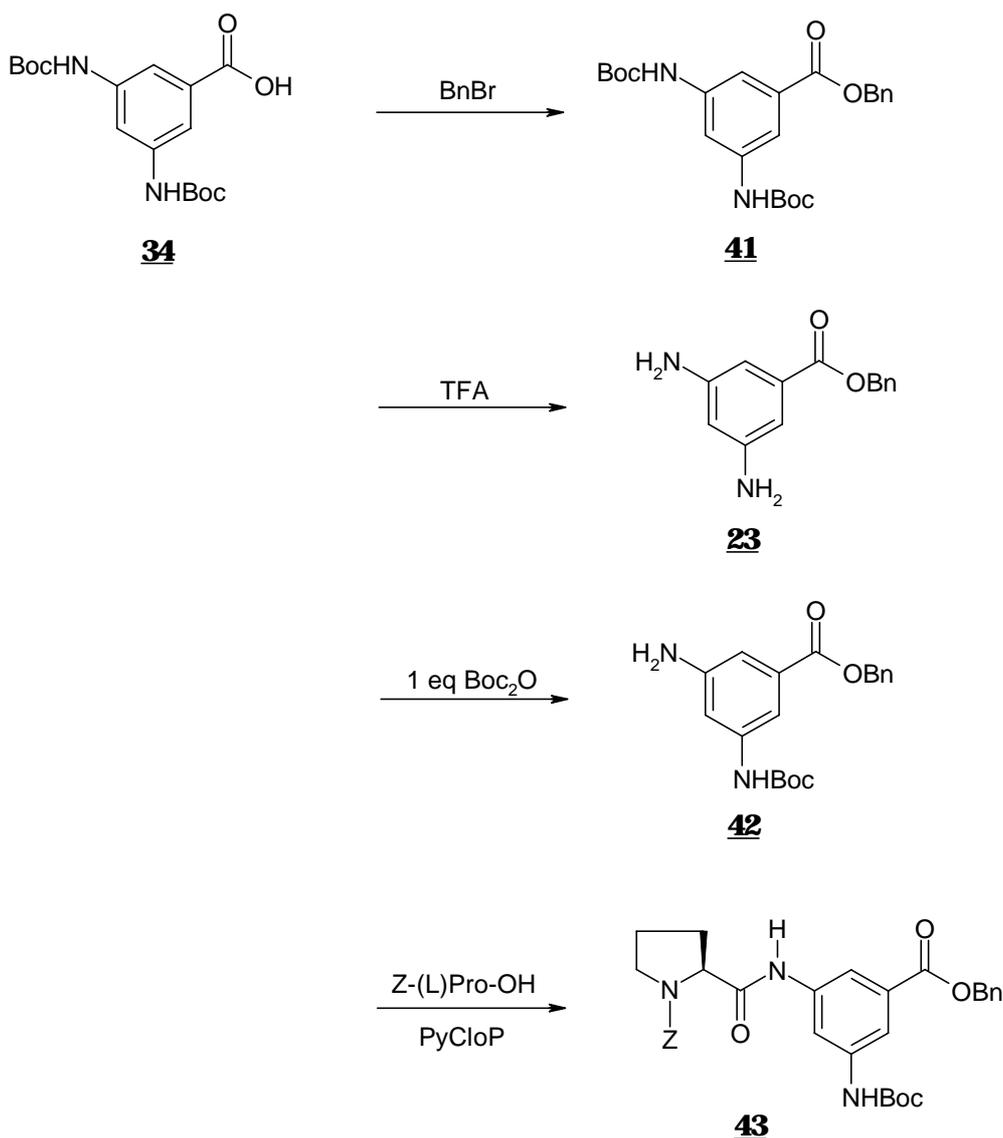


Schema 2.16 Synthese der Cyclopeptide $\text{cyclo}[(L)\text{Pro-AB}(5\text{-NHZ})]_n$, **49**, $n=2$, **39**, $n=3$, **40**, $n=4$.

Es ist jedoch nicht gelungen, diese Z-geschützten Cyclopeptide durch Hydrierung ohne signifikante Bildung von Nebenprodukten, bei welchen es sich wahrscheinlich um Oxidationsprodukte der aromatischen Aminogruppen handelt, sauber zu entschützen.

Daher wurde der alternative Syntheseweg in Schema 2.17 geplant. Bei diesem Weg erhält man ein Cyclopeptid, bei dem die Aminogruppe in 5-Position als *t*-Butylcarbamat geschützt vorliegt. Diese Schutzgruppe kann mit 6N HCl in trockenem Dioxan entschützt werden, wobei das Produkt direkt als Hydrochlorid anfällt. In dieser Form ist das aromatische Amin wesentlich weniger oxidationsempfindlich und sollte sich daher leichter isolieren lassen.

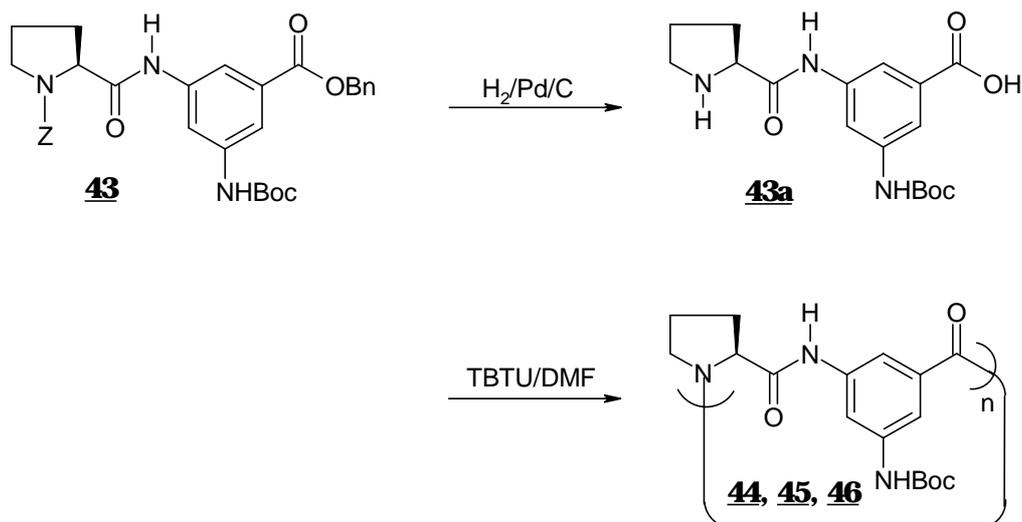
Dieser Syntheseweg war schließlich erfolgreich. Nachdem **34**⁵³ zum Benzylester **41** umgesetzt worden war, wurden dann die beiden Boc-Schutzgruppen wieder abgespalten und unter milderen Bedingungen (0° C, 1,1 Äquivalente Boc₂O) das Monocarbamat **42** hergestellt. Bei dieser Reaktion bildeten sich zwar auch geringe Mengen des Dicarbamates, das aber leicht chromatographisch auf Kieselgel abgetrennt werden konnte. Das Monocarbamat **42** wurde dann mit Z-(L)Pro-OH zum Dipeptid **43** gekuppelt.



Schema 2.17

Synthese des Dipeptides Z-(L)Pro-AB(5-NHBoc)-OBn, **43**.

Wie üblich konnte das terminal entschützte Dipeptid **43a** in einem Schritt durch Hydrierung von **43** in Gegenwart von 1,2 Äquivalente DIEA erhalten werden (Schema 2.18). Die Direktcyclisierung ergab wiederum die drei cyclischen Oligomere **44**, **45** und **46**. Durch Optimierung der Synthese konnte die Ausbeute der Cyclisierung mit dieser Methode schließlich auf 39% für das Tetrapeptid erhöht werden. Das Hexapeptid wurde mit 5%, das Octapeptid mit 2% Ausbeute erhalten. Diese Verbesserung wurde dadurch erreicht, daß durch Arbeiten unter inerten Bedingungen die Zersetzung des Kupplungsreagenzes TBTU unterbunden wurde. Schon bei anderen Cyclisierungen hatten wir diese Zersetzung oft beobachtet und einen teilweise erheblichem Aufwand zur Abtrennung der entstehenden Abbauprodukte vom gewünschten Cyclopeptid betreiben müssen.



Schema 2.18 Synthese der Cyclopeptide $\text{cyclo-}[(L)\text{Pro-AB}(5\text{-NHBoc})]_n$, **44**, $n=2$, **45**, $n=3$, **46**, $n=4$.

J. Bitta konnte zeigen, daß durch das Arbeiten unter einer Argonatmosphäre die Zersetzung weitgehend verhindert und gleichzeitig bei einigen Synthesen die Ausbeute der Produkte erheblich gesteigert werden kann. Im Falle meiner Direktcyclisierungen konnte durch das Arbeiten unter Schutzgas die Aufarbeitung der Produkte so weit vereinfacht werden, daß insbesondere der chromatographische Aufwand zur Reinigung der Cyclopeptide erheblich reduziert wurde.

Nachdem die Direktcyclisierung mehrfach wiederholt und die Aufarbeitung optimiert worden war, konnten für eine weitere Umsetzung ausreichende Mengen von 4,70 g Tetrapeptid, 500 mg Hexapeptid **45** und 200 mg Octapeptid **46** erhalten werden. Für meine Untersuchungen zur Einführung weiterer Bindungszentren konnte ich nun also nicht nur cyclische Hexapeptide, sondern auch cyclische Tetra- und Octapeptide miteinbeziehen. Bevor ich diese Untersuchungen fortgesetzt habe, beschäftigte ich mich jedoch zunächst eingehend mit der strukturellen Aufklärung der bis dahin unbekanntenen cyclischen Tetra- und Octapeptide, um ihr Potential als Grundgerüst für neue Rezeptoren zu erforschen.

2.5 Strukturen und Rezeptoreigenschaften der neuen Cyclopeptide

2.5.1 Cyclische Octapeptide

Die Darstellung cyclischer Octapeptide mit 3-Aminobenzoesäureuntereinheiten waren bisher nur erfolgreich, wenn (L)Glutaminsäure und (L)Asparaginsäure als natürliche Aminosäurekomponente verwendet wurde. Durch die Direktcyclisierung haben wir nun zum ersten Mal Zugang zu cyclischen Octapeptiden mit starrerem (L)Prolinbausteinen. Um eine erste Momentaufnahme der Konformation dieses neuen Cyclopeptides zu erhalten, habe ich zunächst versucht, eine Kristallstruktur zu erhalten. Das cyclische Octapeptid **44** läßt sich aus Methanol zwar umkristallisieren, die erhaltenen Kristalle waren allerdings nicht zur Röntgenstrukturanalyse geeignet. Auch eine systematische Variation der Kristallisationsbedingungen konnte dies nicht ändern. Meine Untersuchungen zur Konformation des Octapeptides beschränkten sich daher auf die Lösung. Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von **44** in d_6 -DMSO zeigt wie das des vergleichbaren cyclischen Hexapeptides einen einfachen scharfen Signalsatz, der auf eine im zeitlichen Mittel C_4 -symmetrische Konformation hindeutet. Daneben tritt im Spektrum aber ein weiterer Signalsatz auf, der einer unsymmetrischen Konformation entspricht. Aus der Intensität der Signale kann ein Verhältnis der symmetrischen und der unsymmetrischen Konformere von ca. 1:1 abgeschätzt werden. Auch im $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum der Verbindung sind beide Konformere zu beobachten, wegen der geringeren Intensität der Signale war hier allerdings eine genaue Zuordnung nicht möglich. Die chemischen Verschiebungen der $C(\beta)$ und der $C(\gamma)$ in beiden Konformeren in d_6 -DMSO deuten allerdings an, daß in beiden Strukturen an den tertiären Amideneinheiten wie im entsprechenden Hexapeptid die *trans* Konformation vorliegt: Die chemischen Verschiebungen entsprechen den in DMSO typischen Werten für *trans* Amide am Prolin in Peptiden (Tabelle 2.1).⁵⁴

	Shift <i>trans</i> ^{a)}	Shift <i>cis</i> ^{a)}	$\delta(\mathbf{44})$
$C(\beta)$	$29,5 \pm 0,5$ ppm	$31,3 \pm 0,5$ ppm	29,3 – 29,7 ppm
$C(\gamma)$	$24,2 \pm 0,5$ ppm	$22,5 \pm 0,5$ ppm	24,7 – 24,9 ppm

a) Literaturwerte für $C(\beta)$ und $C(\gamma)$ in d_6 -DMSO für *cis* und *trans* Amide in Peptiden.⁵⁴

Tabelle 2.1 Zuordnung der $C(\beta)$ - und der $C(\gamma)$ -Shifts von **44**.

Hochtemperaturmessungen in d_6 -DMSO zeigten, daß die Signale im ^1H -NMR Spektrum der Verbindung erst bei 120°C zu einem einfachen Signalsatz koaleszieren. Das Octapeptid ist also im Vergleich zum cyclischen Hexapeptid deutlich starrer: Der Austausch zwischen der symmetrischen und der unsymmetrischen Form ist bis 120°C langsam auf der NMR Zeitskala. Dieser Umstand erklärt möglicherweise auch die schlechten Kristallisationseigenschaften von **44**. Das langsame Gleichgewicht zwischen verschiedenen Konformeren ist für eine Verwendung von **44** als künstlicher Rezeptor ungünstig, da ein erheblicher Anteil der in Lösung vorliegenden Strukturen für die Gastbindung nicht gut vororganisiert ist. Daher habe ich mich bei meinen weiteren Untersuchungen im wesentlichen auf die cyclischen Tetrapeptide konzentriert, die - wie ich später zeigen werde - ein wesentlich größeres Potential für die Darstellung neuer interessanter Rezeptoren bieten.

2.5.2 Cyclische Tetrapeptide

Eine charakteristische Eigenschaft aller von mir dargestellten cyclischen Tetrapeptide ist die Tatsache, daß sie außergewöhnlich gut kristallisieren. Dank dieses Vorzuges konnten die Strukturen einiger Tetrapeptide im Festkörper durch Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. Die Abbildungen 2.7 und 2.9 geben die Kristallstrukturen des unsubstituierten Tetrapeptides **28** und die des Boc-geschützten Tetrapeptides **44** mit Aminogruppen in 5-Position der aromatischen Untereinheiten wieder.

Peptid **28** kristallisiert in einer C_2 -symmetrischen Konformation mit zwei Molekülen Wasser pro Peptideinheit. Im Gegensatz zu dem entsprechenden Hexapeptid liegen in **28** die beiden tertiären Amide in der *cis* Konformation vor, d. h. *cis*- und *trans*-Amide alternieren (*ctct*), eine recht gängige Anordnung in cyclischen Tetrapeptiden.⁵⁵ Bei diesen cyclischen Tetrapeptiden handelt es sich um die ersten Cyclopeptide mit einer *cis* Konformation an den Prolinuntereinheiten, welche in unserer Gruppe hergestellt wurden. Die Carbonylgruppen zeigen in beiden Verbindungen nicht abwechselnd nach oben und nach unten, wie das bei Cyclotetraeptiden der Fall ist, die nur aus (L)- α -Aminosäuren aufgebaut sind. Vielmehr bewirkt die aromatische γ -Aminosäure, daß die Carbonylgruppen alle zur gleichen Seite des Peptidringes zeigen, ähnlich wie man es bei Cyclotetraeptiden mit aus (S)- β -Aminosäuren findet.⁵⁶

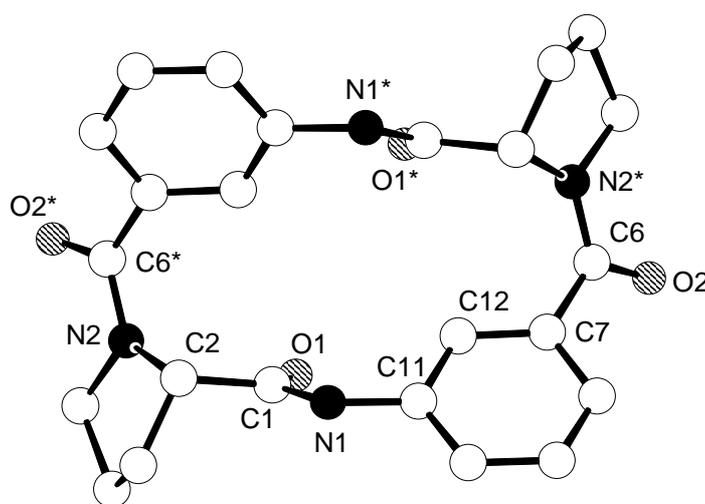


Abb. 2.7

Kristallstruktur von **28**.

Zur Veranschaulichung ist die relative Anordnung der Peptidbindungen in Abbildung 2.8 noch einmal wiedergegeben.

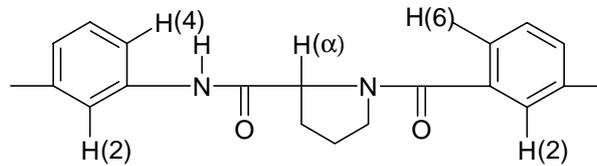


Abb. 2.8 Konformation von **28** im Festkörper.

Auffällig an der Kristallstruktur von **28** ist, daß dieses Cyclopeptid keinen definierten Hohlraum besitzt, sondern eine flache Schale bildet, bei der die beiden Aromaten in einem Winkel von 109° zueinander stehen. Ganz anders verhält sich dies bei **44** (Abb. 2.9). Auch **44** kristallisiert in einer exakt C_2 -symmetrischen Konformation, allerdings mit einem Molekül Wasser pro Peptideinheit.

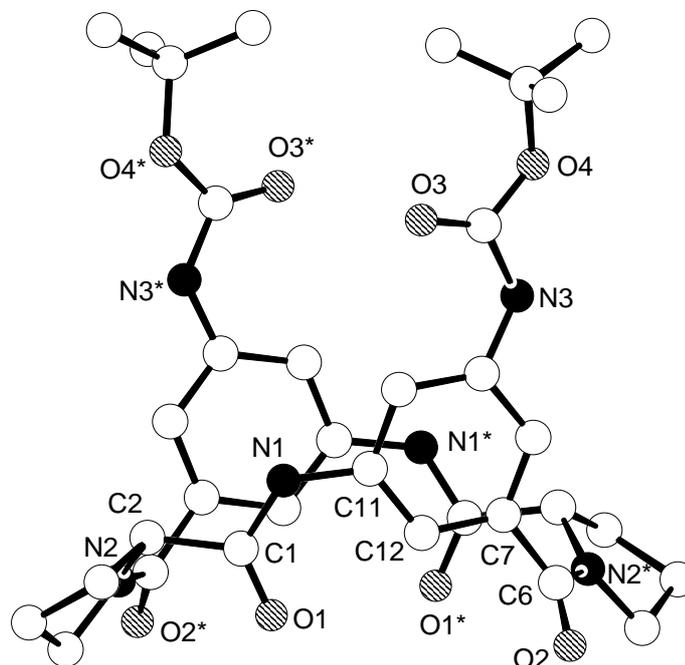


Abb. 2.9 Kristallstruktur von **44**.

Die Aromaten sind hier fast parallel zueinander angeordnet und stehen in einem Winkel von 2° zueinander. Der Abstand der gegenüberliegenden aromatischen Kohlenstoffatome, an denen die Aminosubstituenten befestigt sind, beträgt hier nur 4,99 Å. In **28** beträgt dieser Abstand 8,93 Å. Diese auf den ersten Blick im Vergleich zu **28** völlig verschiedene Konformation ist jedoch nicht auf die relative Anordnung der Amidgruppen entlang der Ringe zurückzuführen, die der in **28** völlig entspricht. Der Unterschied zwischen den Kristallstrukturen **44** und **28** resultiert vielmehr aus unterschiedlichen Torsionswinkeln an den vier nicht amidischen Bindungen:

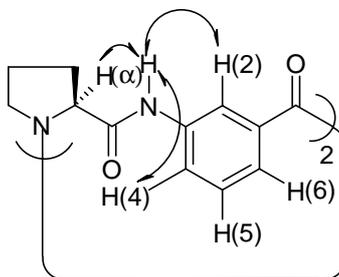
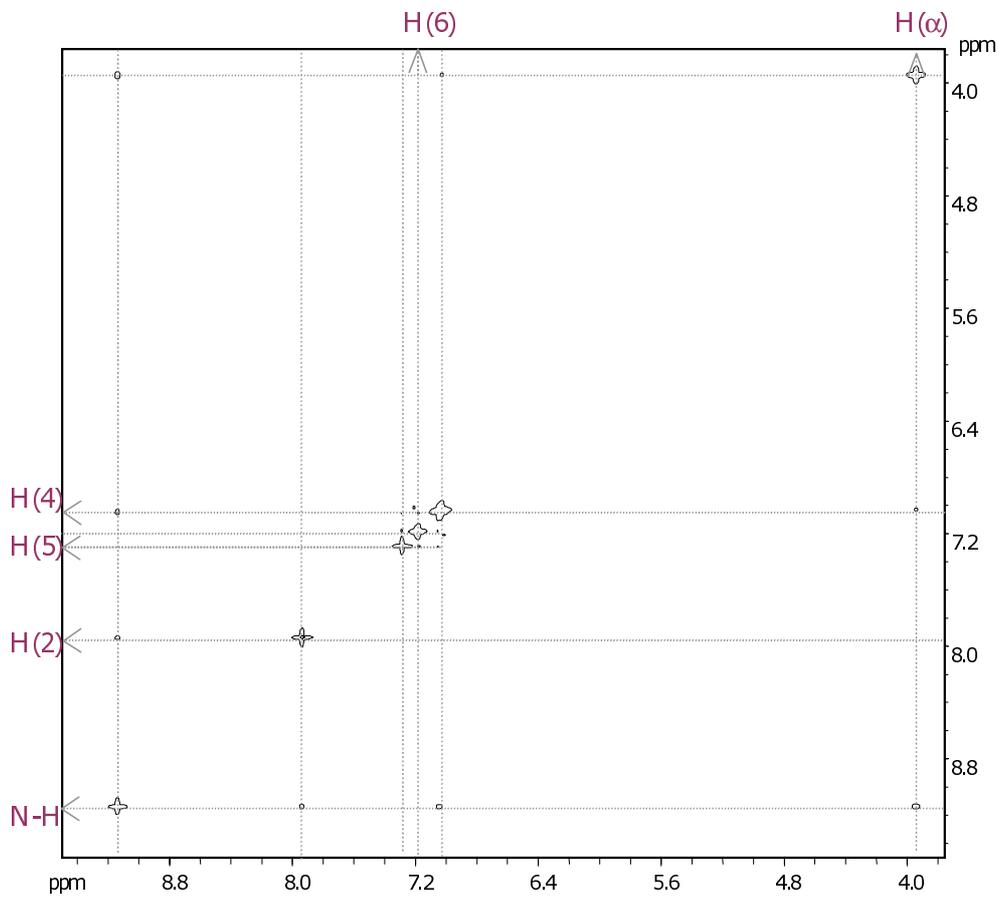
Bindung:	Winkel in 28	Winkel in 44
C1-N1-C11-C12	43°	-9°
N2*-C6-C7-C12	51°	120°
N1-C1-C2-N2	167°	136°
C1-C2-N2-C6	-91°	-51°

Das heißt also, daß **28** die offenere, **44** die gefaltete Form einer analogen Grundkonformation darstellt.

Verschiedene NMR Experimente deuten darauf hin, daß die beide Peptide in Lösung flexibel sind und wahrscheinlich zwischen solchen offenen und gefalteten Konformationen äquilibrieren. So zeigen sowohl die ¹³C- als auch die ¹H-NMR Spektren der beiden Peptide in d₆-DMSO und in d₆-DMSO/CDCl₃ Mischungen einen scharfen, einfachen Signalsatz und entsprechen somit einer im zeitlichen Mittel C₂-symmetrischen Konformation. Tieftemperatur NMR-Messungen mit **28** in d₇-DMF bestätigen, daß dieses Cyclopeptid flexibel ist: Bei –50°C sind die Signale im ¹H-NMR Spektrum von **28** zwar etwas verbreitert, eine Aufspaltung der Signale zeichnet sich jedoch nicht ab, d.h. selbst bei dieser Temperatur liegt noch ein schnelles Gleichgewicht zwischen den möglichen Konformeren vor.

Die NOESY-NMR Spektren von **28** und **44** sind sehr ähnlich und weisen auf eine relative räumliche Anordnung der Protonen hin, welche mit der Konformation in ihren Kristallstrukturen gut übereinstimmt. (Stellvertretend ist das NOESY-NMR Spektrum von **28** in Abbildung 2.10 dargestellt.) So treten in den Spektren beider Peptide in d₆-DMSO deutliche positive NOE Effekte zwischen dem Peptid-NH und dem H(α) am Prolin sowie dem Peptid-NH und dem H(4) an der 3-Aminobenzoessäure (+ 6%) auf.

NOESY-NMR Spektrum von **28** in CDCl₃



28

Abb. 2.10

Ausschnitt aus NOESY-NMR Spektrum von **28** in CDCl₃.

Ein wesentlich schwächerer NOE Effekt ist zwischen den Peptid-NH und den H(2) am Aromaten (etwa + 1%) zu beobachten. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß sich, wie in Abbildung 2.8 dargestellt, die N-H-Bindung bevorzugt zum aromatischen H(4) hin orientiert, daß allerdings in Lösung auch Konformationen auftreten, in denen die N-H Gruppe zum H(2) hin orientiert ist. Die chemischen Verschiebungen der C(β) und der C(γ) der beiden Peptide in d_6 -DMSO liegen im für *cis*-Amide an Prolinuntereinheiten typischen Bereich (Tabelle 2.2):⁵⁴

	Shift <i>trans</i> ^{a)}	Shift <i>cis</i> ^{a)}	δ (28)	δ (44)
C(β)	29,5 \pm 0,5 ppm	31,3 \pm 0,5 ppm	31,2 ppm	31,3 ppm
C(γ)	24,2 \pm 0,5 ppm	22,5 \pm 0,5 ppm	22,7 ppm	22,9 ppm

a) Literaturwerte für C(β) und C(γ) in d_6 -DMSO für *cis* und *trans* Amide in Peptiden.⁵⁴

Tabelle 2.2 Zuordnung der C(β)- und der C(γ)-Shifts von **28** und **44**.

Wie im Festkörper liegt also auch in Lösung eine *ctct* Anordnung der Amidbindungen vor. Diese *ctct* Konformation der Tetrapeptide gibt in gewisser Weise Antwort auf die Frage, warum sich bei der Direktcyclisierung von Dipeptiden mit Prolin als natürlichem Baustein ganz unerwartet cyclische Tetrapeptide bilden. Zwar ist die Anwesenheit von *cis*-Amiden keine notwendige Bedingung für die Bildung von cyclischen Tetrapeptiden,⁵⁷ in den meisten Fällen sind jedoch Prolin oder Sacrosinuntereinheiten mit tertiären Amidan anwesend. Im Gegensatz zu sekundären Amidan, bei denen die *trans* Konformation thermodynamisch bevorzugt ist, beobachtet man nämlich bei tertiären Amidan auch die *cis* Konformation. Tertiäre Amide an Prolinuntereinheiten besitzen außerdem eine deutlich geringere Rotationsbarriere, so daß an diesen Bindungen eine *cis/trans* Isomerisierung leichter möglich ist.⁶⁴ Tatsächlich zeigten Untersuchungen zur Cyclisierung linearer Tetrapeptide aus 3-Aminobenzoesäure und (L)Glutaminsäure bzw. (L)Asparaginsäure, daß hier ausschließlich das cyclische Octapeptid entsteht und die Bildung cyclischer Tetrapeptide auf Grund des Fehlens von tertiären Amidan offensichtlich nicht möglich ist.

Welchen Effekt hat die kleinere Ringgröße nun auf die Rezeptoreigenschaften? Die cyclischen Hexapeptide bilden eine flache Schale aus, die durch die drei aromatischen Untereinheiten aufgespannt wird. In dieser Schale können Alkylammoniumionen durch Kationen- π -Wechselwirkungen gebunden werden,^{30,31} wie durch NMR-Spektroskopie gezeigt werden kann. Die Einlagerung eines Kations in einen aromatischen Hohlraum bringt das Kation nämlich in engen Kontakt mit den aromatischen π -Oberflächen. Infolgedessen bewirkt

der aromatische Ringstrom eine Abschirmung der Gastprotonen, die durch einen Hochfeldshift der Signale im $^1\text{H-NMR}$ sichtbar wird.⁵⁸

Auf Grund der verringerten Zahl der Aminobenzoesäureeinheiten in den cyclischen Tetrapeptiden können diese keinen echten Hohlraum mehr ausbilden, wie die Kristallstrukturen von **28** und **44** erkennen lassen. Man sollte also nicht erwarten, daß die cyclischen Tetrapeptide eine hohe Kationenaffinität aufweisen. Durch NMR-Experimente mit Alkylammoniumionen habe ich diesen Sachverhalt überprüft.

Für diese Untersuchungen wurde stellvertretend **28** ausgewählt. Bei unseren NMR-Untersuchungen verwenden wir in der Regel jeweils eine äquimolare Lösung des Rezeptors und des Gastes (meist je 2 mM) in einem geeigneten Lösungsmittel, wobei sich für die Analyse schwacher nichtkovalenter Wechselwirkungen wie den Kationen- π -Wechselwirkungen insbesondere Chloroform als Lösungsmittel bewährt hat. Auf Grund der schlechten Löslichkeit von **28** in reinem Chloroform mußten in diesem Fall ein Gemisch von 2,5% d_6 -DMSO in CDCl_3 und eine maximale Konzentration von 1 mM gewählt werden. Als Gast wurde das *N*-Butyltrimethylammoniumion (BTMA) verwendet, weil es bei den Untersuchungen der cyclischen Hexapeptide als Standard gedient hatte. Um zusätzliche Effekte durch das Gegenion zu vermeiden, wurde das Pikrat (Pik) eingesetzt, da das Pikrat bisher eine geringe Bindungsaffinität zu unseren Cyclopeptiden gezeigt hat.³¹ Im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum einer 1 mM Lösung von **28** in 2,5% d_6 -DMSO in CDCl_3 konnte nach Zugabe von 1 Äquivalent Butyltrimethylammonium-pikrat ein Hochfeldshift der Gastprotonen beobachtet werden, wie er bei Erkennung eines Alkylammoniums durch Kationen- π -Wechselwirkungen typisch ist. Das Signal der *N*-Methylprotonen des Gastes verschiebt sich allerdings nur um $-0,02$ ppm, ein Wert, der relativ zur Meßgenauigkeit des NMR-Spektrometers recht klein ist.

Zur Bestimmung von Assoziationskonstanten als Maß für die Stärke der Wechselwirkung zwischen Wirt und Gast hat sich in der supramolekularen Chemie die *NMR-Titration* bewährt.⁵⁹ Bei dieser Methode wird in der Regel eine bestimmte Menge von einer Komponente (z.B. des Gastes) in Lösung vorgelegt und der induzierte Shift $\Delta\delta$ der Signale im NMR Spektrum bei kontinuierlicher Zugabe der anderen Komponente (z.B. des Rezeptors) verfolgt. Da dieser Shift der Konzentration des Komplexes in Lösung proportional ist, erhält man durch Auftragung von $\Delta\delta$ gegen das Rezeptor/Substrat Verhältnis eine Sättigungskurve, aus der durch nichtlineare Regression bei bekannter Stöchiometrie des Komplexes die

Assoziationskonstante errechnet werden kann. Der induzierte Shift $\Delta\delta$ strebt bei dieser Sättigungskurve gegen einen Grenzwert $\Delta\delta_{\max}$, der der chemischen Verschiebung des beobachteten Protons im reinen Komplex entspricht und mit der nichtlinearen Regression ebenfalls berechnet werden kann.

Die Komplexstöchiometrie kann ebenfalls NMR spektroskopisch durch die Aufnahme eines **Job-Plots** ermittelt werden.⁶⁰ Bei dieser Messung werden Lösungen mit unterschiedlichem Verhältnis von Wirt und Gast vermessen, wobei die Summe der Konzentrationen beider Komponenten in allen Lösungen identisch ist. Im Gegensatz zur NMR Titration steigt die Konzentration des Komplexes bei dieser Methode nicht kontinuierlich, sondern sie ist dann maximal, wenn Wirt und Gast in einem Verhältnis vorliegen, das ihrem Verhältnis im Komplex entspricht. Als Maß für die Komplexkonzentration wird ebenfalls der induzierte Shift $\Delta\delta$ der Signale im NMR Spektrum einer der beiden Komponenten verfolgt. Da die Konzentration des Komplexes bei konstanter Gesamtkonzentration außerdem dem Molenbruch x der beobachteten Komponente proportional ist, trägt man bei einem Job-Plot das Produkt $\Delta\delta \cdot x$ gegen x auf. Man erhält eine Glockenkurve, die bei einem 1:1 Komplex ihr Maximum bei $x = 0,5$ hat, bei einem 2:1 Komplex bei 0,33 usw. Voraussetzung für eine exakte Auswertung solcher NMR-Messungen ist allerdings ein induzierter Shift, der groß ist gegenüber der Meßgenauigkeit des NMR-Spektrometers.

Eine genaue Bestimmung der Assoziationskonstante durch NMR-Titration war daher für das System **28**/BTMA auf Grund des sehr kleinen Shifts $\Delta\delta$ nicht möglich, die erhaltenen Kurven lassen aber erkennen, daß nur eine schwache Bindung vorliegt und K_a sicherlich kleiner 100 M^{-1} ist.

Das gleiche Resultat ergaben Untersuchungen mit *N*-Methylpyridiniumpikrat. Dieser Gast wurde in der Hoffnung ausgewählt, daß die Kationen- π -Wechselwirkungen durch mögliche π - π -Wechselwirkungen dieses Kations mit dem Tetrapeptid verstärkt und eine exakte Auswertung der NMR-Titration dadurch möglich werden. Auf Grund seiner Form erscheint dieser Gast auch besser geeignet, in dem verkleinerten Hohlraum des Tetrapeptides eingelagert zu werden. Aber auch in diesem Fall beträgt der Shift des Signals der *N*-Methylprotonen des Gastes nur $-0,03 \text{ ppm}$ und die Bindungskonstante konnte ebenfalls mit $K_a < 100 \text{ M}^{-1}$ bloß abgeschätzt werden. Das Cyclohexapeptid **2** bindet dagegen im gleichen Lösungsmittelgemisch die beiden Kationen mit $K_a = 1,5 - 2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Tabelle 2.3 stellt die Kationenaffinität von **28** im Vergleich zu **2** dar.

	$\Delta\delta_{\max}^a$ (BTMA Pik)	K_a (BTMA Pik)	$\Delta\delta_{\max}^a$ (MePy Pik)	K_a (MePy Pik)
<u>2</u>	-0,43ppm	$1480 \pm 130\text{M}^{-1}$	-0,56ppm	$2300 \pm 200\text{M}^{-1}$
<u>28</u>	-0,02ppm ^b	$< 100 \text{M}^{-1}$	-0,03ppm ^b	$< 100 \text{M}^{-1}$

a) Verfolgt wurde das Signal des *N*-Methylprotons.

b) Wert entspricht nicht $\Delta\delta_{\max}$, sondern $\Delta\delta$ des 1:1-Komplex in 1 mM Lösung.

Tabelle 2.3 Vergleich der Kationenaffinität von Hexa- und Tetrapeptid in 2,5% *d*₆-DMSO in CDCl₃.

Die Annahme, daß die Verkleinerung der Ringgröße zum Verlust des Hohlraumes und damit zum Verlust der Kationenaffinität führt, konnte durch diese Untersuchungen somit bestätigt werden. Im Vergleich zu dem cyclischen Hexapeptid **2** geben diese Ergebnisse einen zusätzlichen Hinweis, daß die Kationenerkennung durch die cyclischen Hexapeptide tatsächlich auf einer spezifischen Wechselwirkung des Gastes mit dem Hohlraum beruht.

Wie verhält es sich aber mit der Anionenerkennung? Für die Hexapeptide konnte gezeigt werden, daß sie Anionen durch Wasserstoffbrücken zu den Peptid N-H Gruppen binden.^{30,31} Diese Eigenschaft hängt weniger von der Form des Hohlraums der Cyclopeptide ab und könnte daher für die Tetrapeptide ebenfalls beobachtet werden. Tatsächlich konnte ich durch NMR Experimente zeigen, daß Tetrapeptid **28** trotz der im Vergleich zum Hexapeptid verringerten Zahl der Amidbindungen in Chloroform verschiedene Anionen komplexieren kann: Die Signale der N-H Protonen von **28** erfahren nämlich nach Zugabe verschiedener Anionen im ¹H-NMR Spektrum einen deutlichen Tieffeldshift. Bei Zugabe von einem Äquivalent Benzoat zu einer 2 mM Lösung von **28** in 2,5% *d*₆-DMSO/CDCl₃ beträgt dieser Shift zum Beispiel + 1,84 ppm. Durch einen Job-Plot (Abb. 2.11) konnte bestätigt werden, daß ein 1:1 Komplex zwischen **28** und dem Benzoat vorliegt. Die Bindungskonstante wurde mit Hilfe einer NMR Titration zu $K_a = 18.200 \pm 300 \text{M}^{-1}$ bestimmt, der maximale Shift für das Signal des N-H Protons zu $\Delta\delta_{\max} = + 2,8 \text{ ppm}$ und für das Signal des H(2) Protons am Aromaten zu $\Delta\delta_{\max} = -0,1 \text{ ppm}$.

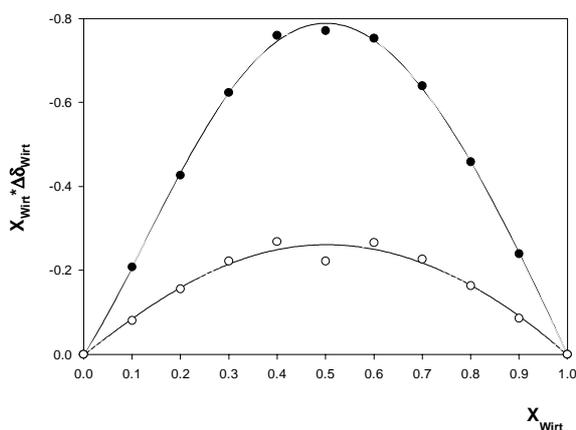


Abb. 2.11 Job-Plot von Tetrapeptid **28** mit Benzoat in CDCl_3 .

Welche Geometrie hat dieser Anionenkomplex? Bei den cyclischen Hexapeptiden haben wir festgestellt, daß zur Anionenkomplexierung die amidischen N-H Protonen zum H(2) hin konvergieren und dadurch das Anion auf einer Seite des Makrocyclus binden. Das NOESY-NMR Spektrum von **28** hat aber gezeigt, daß in Lösung die amidischen N-H Protonen bevorzugt zum H(4) hin orientiert sind. Bildet das Tetrapeptid dennoch Anionenkomplexe mit einer vergleichbaren Geometrie wie die cyclischen Hexapeptide? Durch ein NOESY-NMR Spektrum des Komplexes von **28** mit Benzoat ließ sich diese Frage eindeutig klären. Nach Zugabe von einem Äquivalent Benzoat als Tetrabutylammoniumsalz¹ (TBA) beobachtet man im NOESY-NMR Spektrum einer 2 mM Lösung von **28** in 2,5% d_6 -DMSO/ CDCl_3 eine deutliche konformative Umordnung des Cyclopeptides (siehe Tabelle 2.4, NOESY-NMR Spektren siehe Abb. 2.10 und 2.12.).

	N-H zu H(α)	N-H zu H(2)	N-H zu H(4)	H(2) zu H _{ortho} Gast
28	- 6%	- 1%	- 6%	---
28 ·Benzoat	- 6%	- 10%	---	schwach positiv

Tabelle 2.4 Vergleich der NOE Effekte **28** und **28**·Benzoat.

[1] Bei der Untersuchung reiner Anionenwechselwirkungen hat es sich bewährt, das voluminöse Tetrabutylammoniumion als Gegenion einzusetzen, da eine gleichzeitige Kationenwechselwirkung hier als unwahrscheinlich betrachtet werden kann.³⁷⁻³⁹

NOESY-NMR Spektrum von **28** + Benzoat in CDCl₃

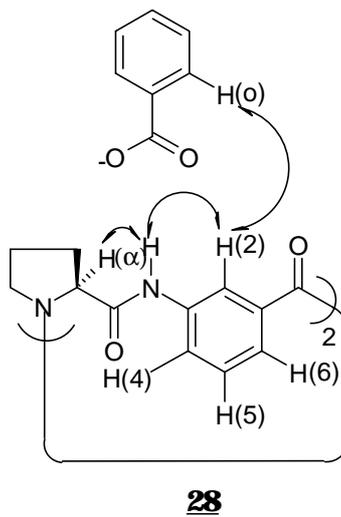
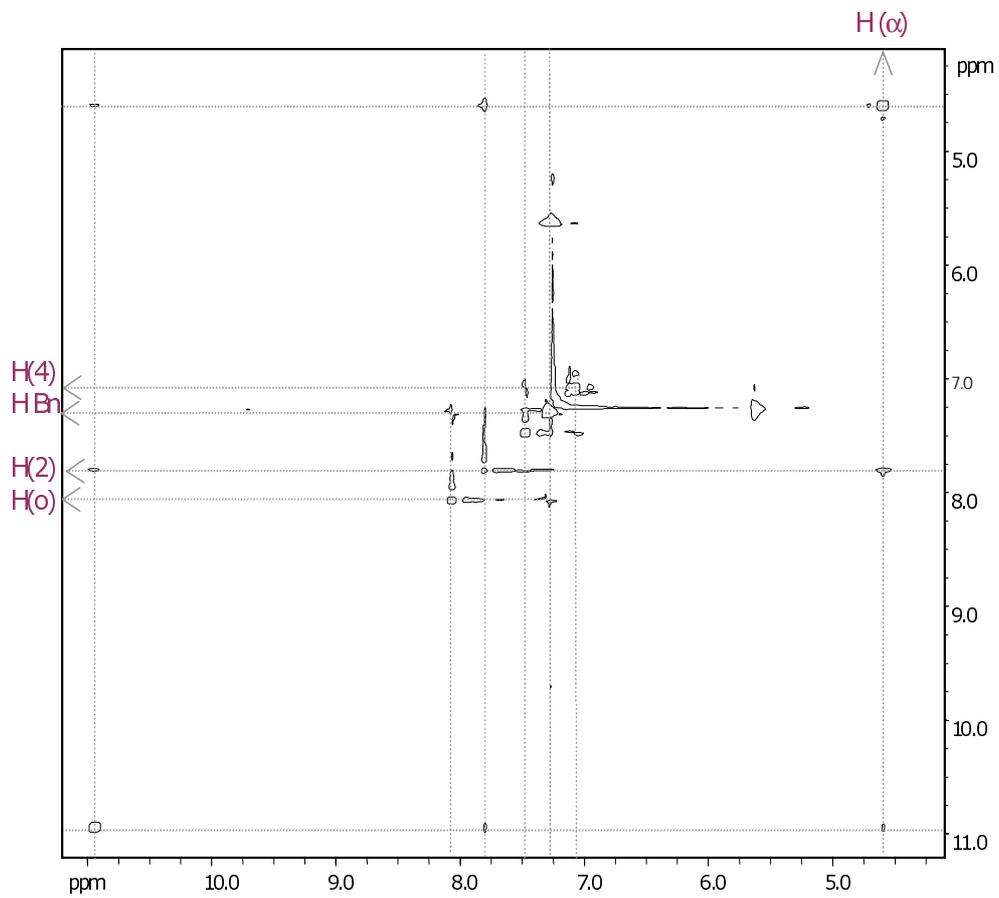


Abb. 2.12

Ausschnitt aus NOESY-NMR Spektrum von **28** + Benzoat in CDCl₃.

Der NOE Effekt zwischen dem N-H Proton und dem H(α) ist auch in diesem Spektrum erkennbar, der Effekt vom N-H Proton zum H(4) verschwindet jedoch im Vergleich zu dem Spektrum des unkomplexierten Cyclopeptides und der NOE Effekt zum H(2) nimmt stark an Intensität zu. Zusätzlich tritt ein schwach positiver NOE zwischen dem zum Gast hin orientierten H(2) und dem H_{ortho} des Benzoats auf, ein weiterer Hinweis auf eine bindende Wechselwirkung zwischen **28** und Benzoat.

Zur Anionenkomplexierung nimmt das cyclische Tetrapeptid also wie das entsprechende Hexapeptid eine Konformation ein, bei der die sekundären Amidbindungen zum H(2) hin orientiert sind. Der NOE zwischen dem N-H und dem H(α) am Prolin bleibt dagegen unbeeinflusst, ein Effekt zum H(β) tritt nicht auf.

Man muß daher annehmen, daß die Orientierung des N-H Protons zum H(2) nicht auf eine Rotation der Amidbindung zurückzuführen ist, da sich die Orientierung der Amidbindung relativ zum Prolinring offensichtlich nicht ändert. Vergleicht man die beiden Konformationen in Abbildung 2.13, so sieht man, daß der Übergang von der einen in die andere Konformation vielmehr auf ein Umklappen der aromatischen Ringe zurückgeführt werden kann.

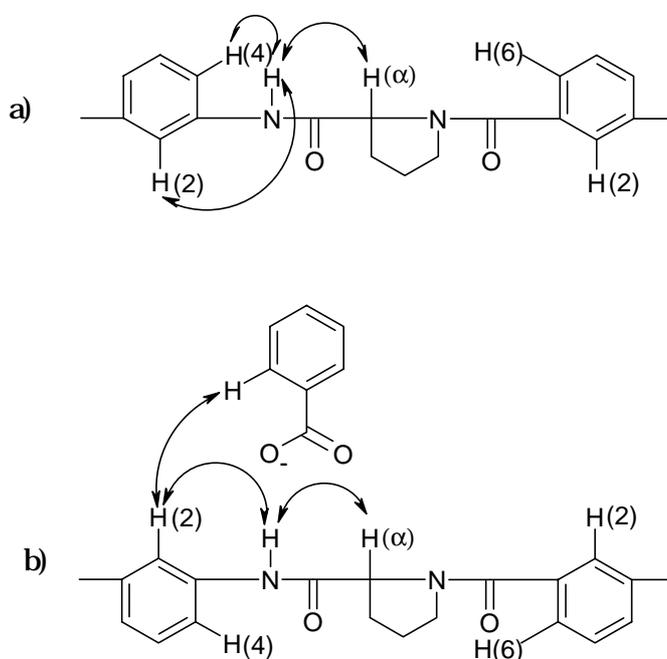


Abb. 2.13 Illustration der NOE Effekte von a) **28** und b) **28** · Benzoat.

Die energieminierte Struktur des Komplexes von Benzoat mit **28** (Cerius², Dreiding 2.21) ist in Abbildung 2.14 wiedergegeben.

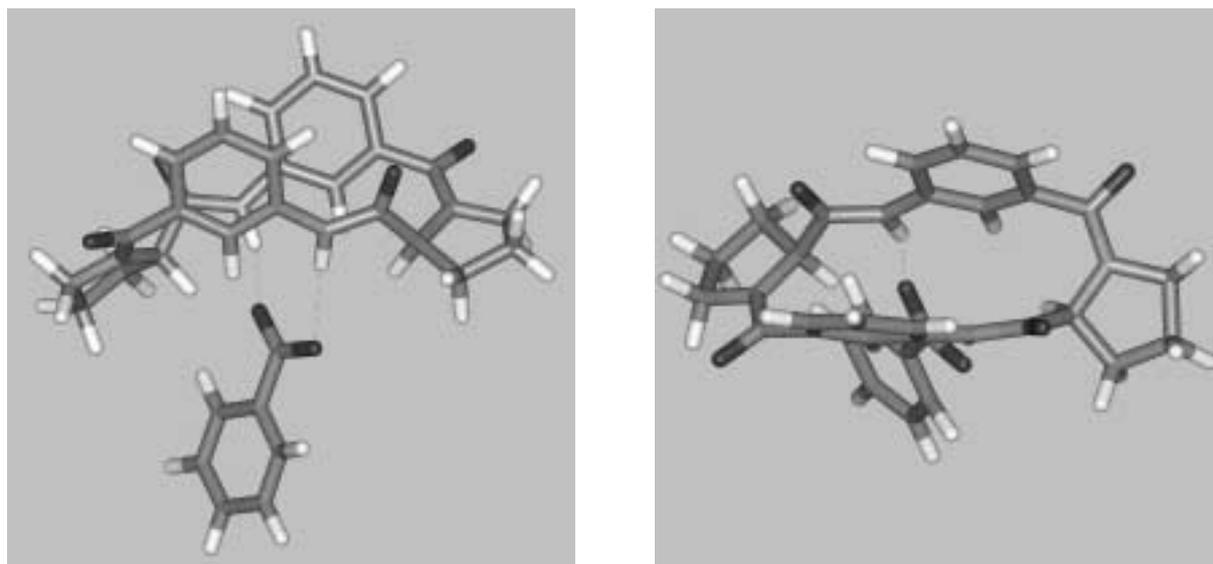


Abb. 2.14 Komplex **28**-Benzoat: Seitenansicht (links) und von oben (rechts) (Cerius², Dreiding 2.21).

Nachdem die Geometrie der Komplexbildung geklärt war, wurde nun systematisch die Affinität von **28** zu verschiedenen Anionen unterschiedlicher Geometrie⁶¹ und Basizität⁶² in 2,5% d₆-DMSO/CDCl₃ untersucht, wobei sich folgende Trends ergaben (Tabelle 2.5): Am schwächsten gebunden werden die nicht basischen Anionen mit einem pK_B > 12, also die Halogenide, Nitrat und Tosylat. Die Assoziationskonstanten liegen hier zwischen 5·10² und 5·10³ M⁻¹. Dabei wird innerhalb der Reihe der Halogenide das kleine und härtere Chlorid am besten gebunden, das Bromid weniger als halb so gut, und das Iodid schließlich wird mit einer Assoziationskonstante gebunden, die eine ganze Größenordnung kleiner ist als die des Chlorids. Von den Oxoanionen wird das Nitrat am schlechtesten gebunden, das Tosylat wird dreimal so gut gebunden und das Hydrogensulfat am besten mit einer Assoziationskonstante, die ebenfalls fast eine ganze Größenordnung größer ist als die des Nitrats oder des Iodids. Die Assoziationskonstanten der Anionen mit einem pK_B ≤ 12 liegen im Bereich von 2 - 8·10⁴ M⁻¹. Die Affinität des Tetrapeptides zu den Anionen steigt also deutlich mit der Basizität. Dihydrogenphosphat und Hydrogenphosphonat haben auf Grund des gleichen pK_B Wertes auch praktisch die gleiche Bindungskonstante. Der etwas unterschiedliche Sauerstoff-Sauerstoff Abstand wirkt sich hier nicht aus.

Anion	pK _B	 bzw. Radius	K _a ^{c)}	Δδ _{max} (N-H) ^{b)}	Δδ _{max} (H(2)) ^{b)}	Δδ _{max} (H(α)) ^{b)}
Cl ⁻	21	1,81 Å	4200 M ⁻¹	+ 1,6 ppm	+ 0,1 ppm	+ 1,0 ppm
Br ⁻	23	1,96 Å	1580 M ⁻¹	+ 1,1 ppm	+ 0,1 ppm	---
I ⁻	24	2,20 Å	470 M ⁻¹	+ 0,6 ppm	+ 0,1 ppm	---
NO ₃ ⁻	16	2,12 Å	700 M ⁻¹	+ 0,8 ppm	+ 0,08 ppm	---
Tosylat	16	2,42 Å	1900 M ⁻¹	+ 0,9 ppm	- 0,1 ppm	---
Benzoat	10	2,23 Å	18200 M ⁻¹	+ 2,8 ppm	- 0,1 ppm	---
HSO ₄ ⁻	17	2,43 Å	5760 M ⁻¹	---	+ 0,07 ppm	---
H ₂ PO ₄ ⁻	12	2,51 Å	27500 M ⁻¹	---	- 0,2 ppm	+ 1,4 ppm
HPO ₄ ²⁻	7	2,51 Å	2 _w :1 _G ^{a)}	---	---	---
PO ₄ ³⁻	2	2,51 Å	2 _w :1 _G ^{a)}	---	---	---
PhHPO ₃ ⁻	12	2,55 Å	26100 M ⁻¹	---	- 0,2 ppm	+ 1,0 ppm
PhPO ₃ ²⁻	7	2,55 Å	80000 M ⁻¹	+ 2,9 ppm	- 0,09 ppm	+ 0,8 ppm

a) K_a nicht berechnet, da hier 2:1 Komplexe auftraten (durch Job-Plot bestätigt). Meßdaten ließen sich nicht an 2:1 Kurve fiten.

b) Es wurden jeweils die Signale zur Auswertung herangezogen, die über den gesamten Meßbereich verfolgt werden konnten und dabei einen genügend großen Shift relativ zur Meßgenauigkeit des Spektrometers aufwiesen.

c) Fehler von K_a < 20%.

Tabelle 2.5 Bindungskonstanten von **28** mit verschiedenen Anionen in CDCl₃/2,5% d₆-DMSO.

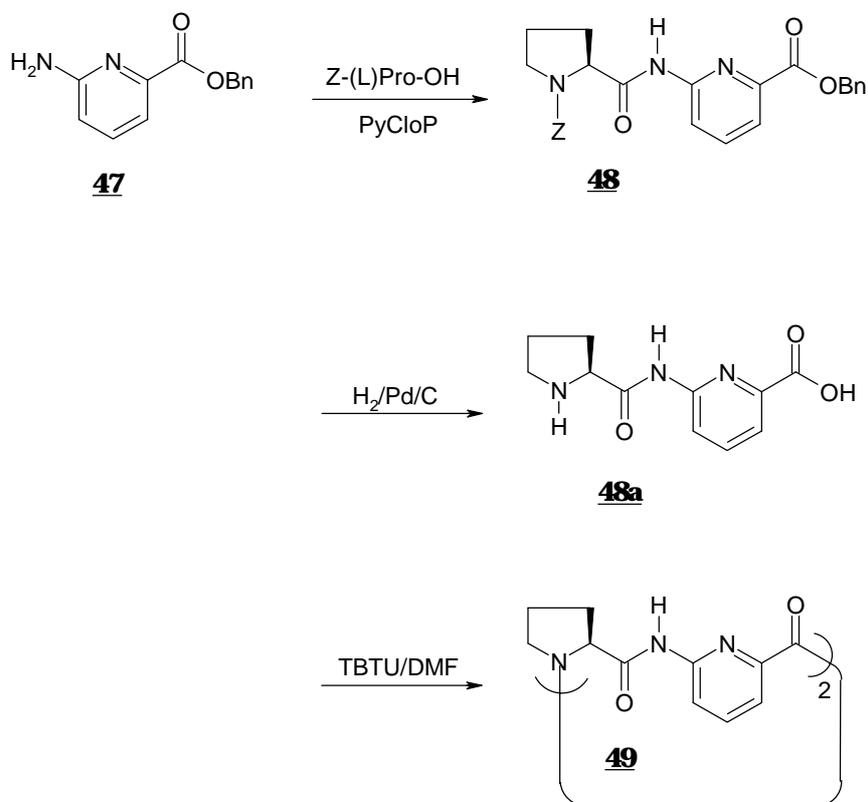
Die einzige Ausnahme in dieser Reihe bildet das Benzoat. Obwohl es basischer ist als das Dihydrogenphosphat, wird es schwächer gebunden, wahrscheinlich da hier der Sauerstoff-Sauerstoff Abstand um fast 30 pm kürzer ist.²

In d₆-DMSO konnten nur noch die Anionen mit einem pK_B ≤ 12 komplexiert werden. Die Wechselwirkung in diesem polaren Lösungsmittel ist schwach: Benzoat wird mit einer Bindungskonstante von K_a = 65 ± M⁻¹ gebunden und Dihydrogenphosphat mit K_a = 340 ± 30 M⁻¹. Bei Cyclopeptid **28** geht also auf Grund des kleineren Hohlraumes die Fähigkeit zur Kationenbindung verloren, dafür ist **28** aber ein interessanter Anionenrezeptor. Kann man etwas unternehmen, um die Bindungseigenschaften von **28** noch zu verbessern? Die NOE Experimente haben gezeigt, daß dieser Rezeptor erst in eine geeignete Konformation übergehen muß, bevor er ein Anion bindet. Der Energieunterschied zwischen dieser Konformationen und der in Lösung stabilsten wurde zu etwa 10 kcal/mol berechnet (Cerius², Dreiding 2.21). Wenn es nun gelänge, den Rezeptor in der zur Anionenkomplexierung

[2] Der Abstand der beiden N-H Protonen in der Kristallstruktur von **28** beträgt zum Vergleich 3,09 Å.

geeigneten Konformation zu fixieren, so müßte sich dies positiv auf die gesamte freie Bindungsenthalpie auswirken. Zum einen entfielen der Energieaufwand von 10 kcal/mol zur Umwandlung in die energetisch ungünstigere Konformation, zum anderen könnte der Entropieverlust verringert werden, den die Verringerung der Flexibilität von **28** bei der Anionenbindung hervorruft. Frühere Untersuchungen in unserer Gruppe haben bereits gezeigt, daß cyclische Hexapeptide mit Picolinsäure als aromatischem Baustein eine erhöhte Anionenaffinität besitzen, da sie in der zur Anionenerkennung geeigneten Geometrie vororganisiert sind.³⁴ Diese Präorganisation ist darauf zurückzuführen, daß sich in picolinsäurehaltigen Cyclopeptiden die N-H Bindung zum Pyridylstickstoff hin – dies entspricht der Position des H(2) in der 3-Aminobenzoesäure – orientiert.³³ Um diesen Effekt auch zur Optimierung der Bindungseigenschaften meiner cyclischen Tetrapeptide auszunutzen, habe ich die Verbindung **49** hergestellt.

Zunächst habe ich versucht, **49** durch Direktcyclisierung von Dipeptid **48** zu gewinnen. Das Dipeptid wurde aus 6-Aminopicolinsäurebenzylester (**47**), der mir freundlicherweise von D. Kubik zur Verfügung gestellt wurde, und Z-(L)Pro-OH hergestellt (Schema 2.19).

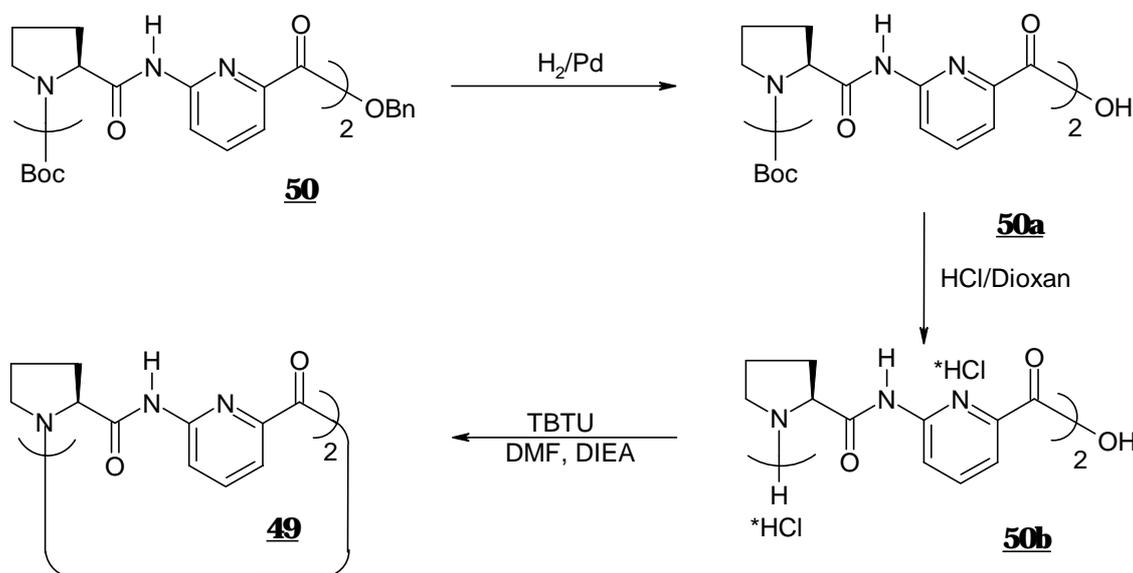


Schema 2.19 Darstellung des Cyclopeptides cyclo-[(L)Pro-AP]_m **49** durch Direktcyclisierung.

Es wurde wie üblich in Gegenwart von 1,2 Äquivalenten DIEA geschützt und das so erhaltene Dipeptid **48a** cyclisiert. Schon bei der Cyclisierung des linearen Hexapeptides mit

6-Aminopicolinsäure war die Ausbeute deutlich geringer als bei Derivaten mit 3-Aminobenzoesäure als aromatischem Baustein.³⁴ Bei der Direktcyclisierung von **48a** verlief der Ringschluß so schlecht, daß das cyclische Tetrapeptid **49** nur mit 2% Ausbeute isoliert werden konnte.

Daher wurde **49** sequentiell aufgebaut (Schema 2.20). Die Synthese des linearen Vorläufers **50** erfolgte nach der Methode von S. Kubik,³⁴ die Cyclisierung von **50b** erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei der Direktcyclisierung. Die Ausbeute war dabei, wie bei allen bisher durchgeführten Cyclisierungen mit picolinsäurehaltigen Peptiden, recht gering, da die durch die Picolinsäure erzwungene Konformation zum Ringschluß wahrscheinlich weniger gut geeignet ist.



Schema 2.20

Sequentieller Aufbau von cyclo-[(L)Pro-AP], **49**.

Bevor ich die Bindungseigenschaften von **49** untersucht habe, versuchte ich zunächst wieder mit den üblichen Methoden eine Zuordnung der bevorzugten Konformation dieses Cyclopeptides im Kristall und in Lösung vorzunehmen. **49** kristallisiert aus Methanol/Methylenchlorid mit einem Molekül Wasser pro Peptideinheit. Das Ergebnis der Kristallstrukturanalyse ist in Abbildung 2.15 dargestellt.

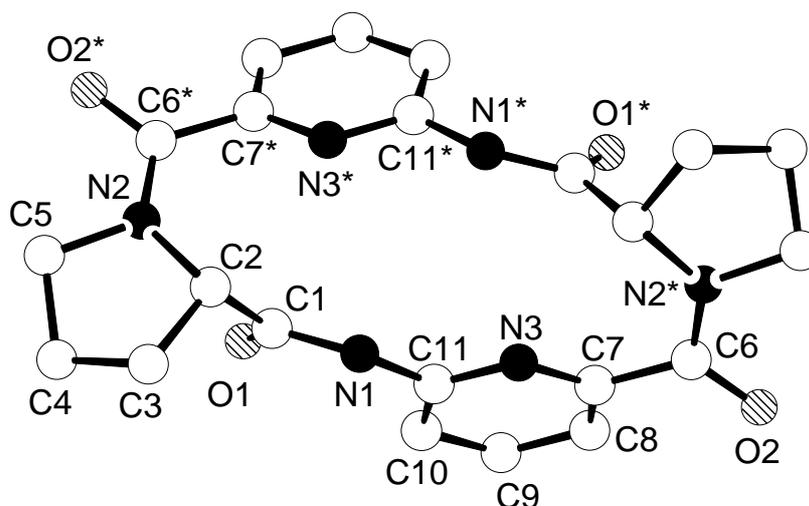


Abb. 2.15

Kristallstruktur von cyclo-[(L)Pro-AP], **49**.

Wie man sieht, orientieren sich die N-H Bindungen im Kristall, wie vorausgesagt, zum Pyridylstickstoff hin. Die relative Anordnung der Bindungen zwischen den Aromaten zueinander ist ansonsten identisch mit der in den Kristallstrukturen von **28** und **44**. Es liegt wie bei dem entsprechenden Hexapeptid **4** die *cis* Konformation am tertiären Amid vor, und das H(α) am Prolin zeigt in die gleiche Richtung wie die N-H Bindung.

Diese Strukturmerkmale werden auch in Lösung wiedergefunden. Sowohl das ^{13}C - als auch das ^1H -NMR Spektren zeigen in d_6 -DMSO einen scharfen, einfachen Signalsatz und entsprechen somit einer im zeitlichen Mittel C_2 -symmetrischen Konformation. Die chemischen Verschiebungen der C(β) und der C(γ) in d_6 -DMSO weisen auch bei **49** auf das Vorliegen von *cis*-Amiden an den Prolineinheiten hin (Tabelle 2.6).

	Shift <i>trans</i> ^{a)}	Shift <i>cis</i> ^{a)}	$\delta(\mathbf{49})$
C(β)	29,5 \pm 0,5 ppm	31,3 \pm 0,5 ppm	32,9 ppm
C(γ)	24,2 \pm 0,5 ppm	22,5 \pm 0,5 ppm	22,5 ppm

a) Literaturwerte für C(β) und C(γ) in d_6 -DMSO für *cis* und *trans* Amide an (L)Prolin in DMSO.⁵⁴

Tabelle 2.6

Zuordnung der C(β)- und der C(γ)-Shifts von **49**.

NOESY-NMR Spektrum **49** in DMSO

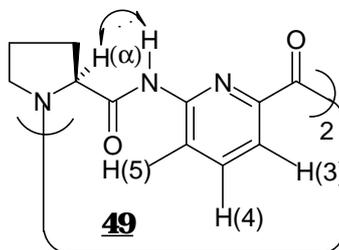
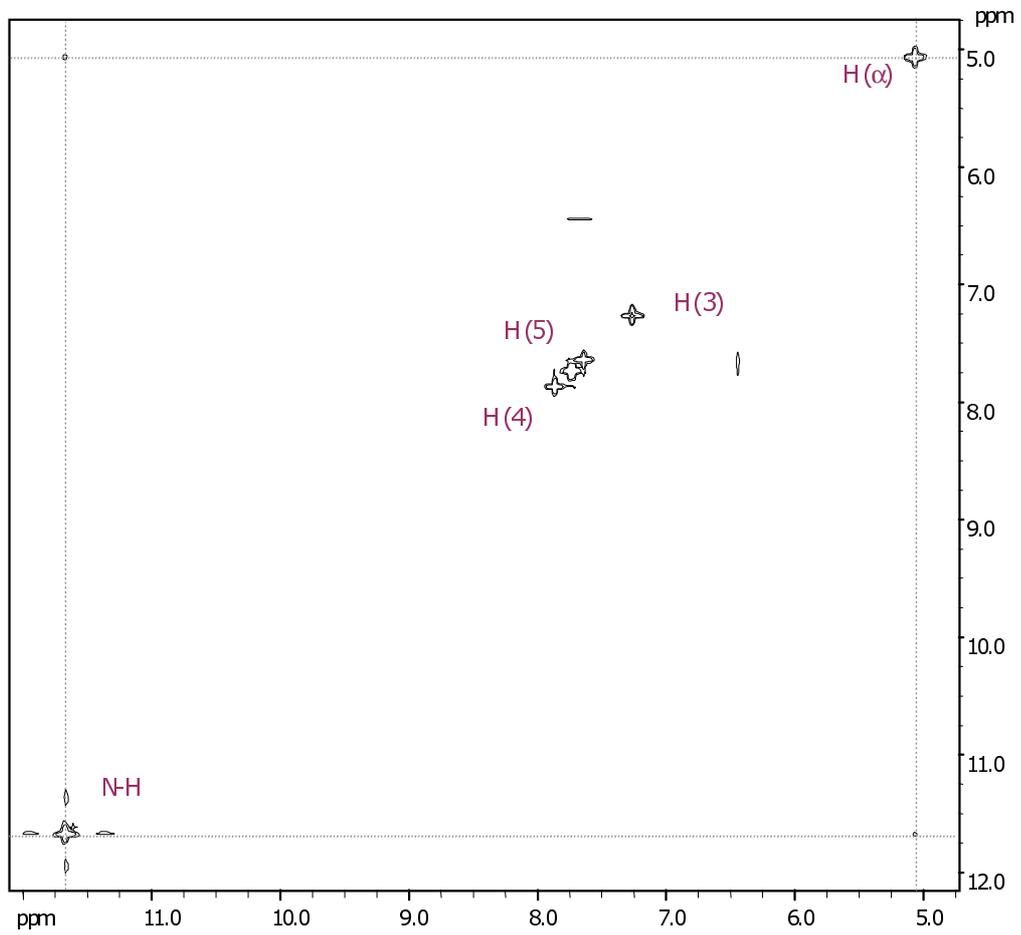


Abb. 2.16

Ausschnitt aus NOESY-NMR Spektrum von **49** in DMSO.

Im NOESY-NMR Spektrum der Verbindungen in d_6 -DMSO (Abb. 2.16) tritt ein schwacher positiver NOE Effekt zwischen dem Peptid-NH und dem H(α) am Prolin auf. Ein Kreuzsignal zwischen dem NH Proton und dem H(5) an der 6-Aminopicolinsäure (entsprechend dem H(4) an der 3-Aminobenzoessäure) wird nicht beobachtet. Auch in Lösung ist die N-H Bindung also bevorzugt zum Pyridylstickstoff hin orientiert. In einem NOESY-NMR Spektrum von **49** in Chloroform konnten die gleichen NOE Effekte beobachtet werden.

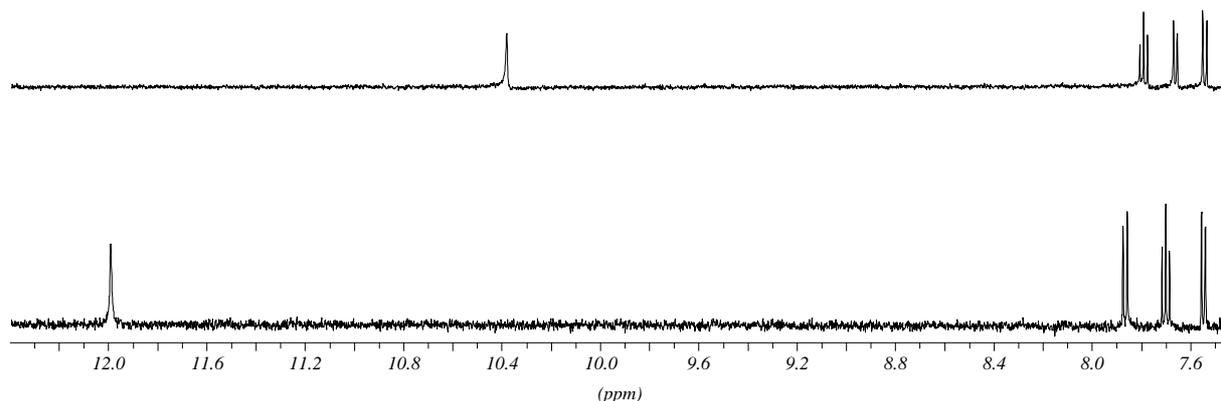


Abb. 2.17 Ausschnitt aus den Spektren von **49** in d_6 -DMSO (oben) und in $CDCl_3$ (unten).

Vergleicht man aber ein 1H -NMR Spektrum von **49** in d_6 -DMSO mit einem Spektrum in 2,5% d_6 -DMSO/ $CDCl_3$, so stellt man fest, daß das Signal des N-H Protons beim Übergang in das unpolare Lösungsmittel von etwa 10,4 ppm nach 12,1 ppm Tieffeld verschoben wird (Abb. 2.17). Außerdem wird das Signal des H(4) von 7,9 ppm nach 7,7 ppm Hochfeld verschoben, und das Signal des H(5) shiftet leicht Tieffeld von 7,8 ppm nach 7,9 ppm. Ein derartig großer Tieffeldshift des Signals eines N-H Protons ist häufig ein Indiz für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke. Auf eine Wechselwirkung mit dem Dipol des freien Elektronenpaares am Pyridylstickstoff kann dieser Effekt nicht zurückzuführen sein, denn dann müßte er auch im 1H -NMR Spektrum von N-Acetyl-6-aminopicolin in 2,5% d_6 -DMSO/ $CDCl_3$ zu beobachten sein. Hier liegt das Signal des Amidprotons aber bei 8,0 ppm, also bei wesentlich höherem Feld.

Einen weiteren Hinweis auf eine Wasserstoffbrücke gibt das IR Spektrum der Verbindung in 2,5% d_6 -DMSO/ $CDCl_3$.

IR Spektren von **28** und **49** in 2,5% d₆-DMSO/CDCl₃ im Vergleich

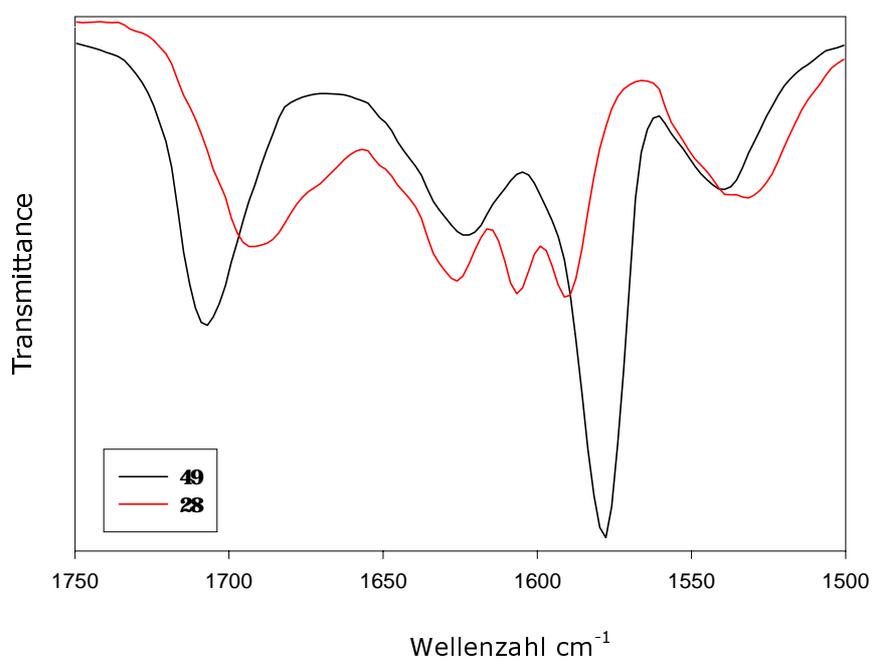
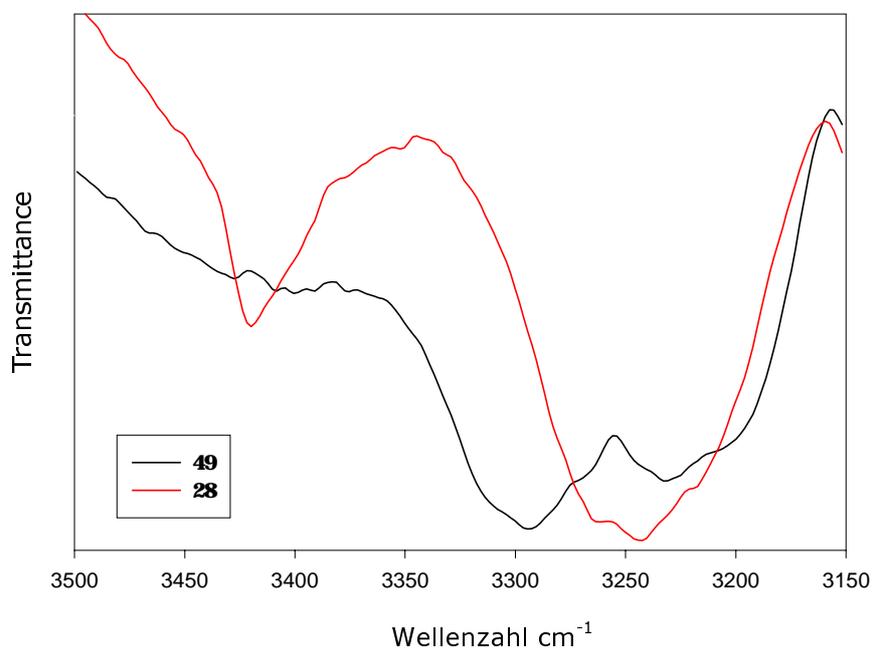


Abb. 2.18

Ausschnitte aus den IR Spektren von **28** und **49** in 2,5% DMSO/CDCl₃.

Vergleicht man nämlich das Spektrum von **49** mit dem IR Spektrum von **28** in dem gleichen Lösungsmittel (Abb. 2.18), so stellt man fest, daß die Bande der freien N-H Amidbindung im Spektrum des picolinsäurehaltigen Cyclopeptides fast völlig verschwindet und die Bande der wasserstoffverbrückten N-H Amidbindung an Intensität stark zunimmt.

28	49	Bande
3420 (m)	---	freie N-H
3255 (s)	3283 (s)	wasserstoffverbrückte N-H
1690	1708	Amid I von sek. Amid, $\nu(\text{C}=\text{O})$
1632	1631	Amid I von tert. Amid, $\nu(\text{C}=\text{O})$
1578	1591	Amid II von sek. Amid, N-H bend

Die beiden Amid I Banden hingegen werden nicht zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Es ist daher nicht anzunehmen, daß die Carbonylfunktionen an der Wasserstoffbrücke beteiligt sind.

Da die Kristallstruktur keinen Hinweis auf eine intramolekulare Wasserstoffbrücke gibt, wurde überprüft, ob intermolekulare Wasserstoffbrücken bei **49** in Chloroform zu Selbstassoziation führen. In diesem Fall müßten sich auf Grund der Konzentrationsabhängigkeit einer Selbstassoziation NMR Spektren unterschiedlich konzentrierter Lösungen von **49** deutlich unterscheiden. Daher wurden ^1H -NMR Spektren einer Reihe von Lösungen von **49** in 2,5% d_6 -DMSO/ CDCl_3 , deren Konzentration von 2 mM bis 0,02 mM variierte, aufgenommen. Es konnte jedoch keine signifikante Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale von der Konzentration der Lösung beobachtet werden, und man muß daher annehmen, daß bei **49** in Chloroform intramolekulare Wasserstoffbrücken auftreten, an der die Amid N-H Bindungen teilhaben, nicht jedoch die Amid C=O Bindungen. Durch Molecular Modeling Studien (ChemDraw3D, PM3) konnte tatsächlich eine Struktur berechnet werden (Abb. 2.19), in der entsprechende Wasserstoffbrücken möglich sind und die um etwa 5 kcal stabiler ist als die Konformation der Kristallstruktur von **49**. Es ist wahrscheinlich, daß **49** in Chloroform diese durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisierte Konformation bevorzugt. Bei Kristallisation von **49** aus einem methanolhaltigen Lösungsmittelgemisch sind intermolekulare Wechselwirkungen der N-H Gruppen mit Lösungsmittelmolekülen wahrscheinlich stärker, so daß im Kristall eine andere Konformation resultiert.

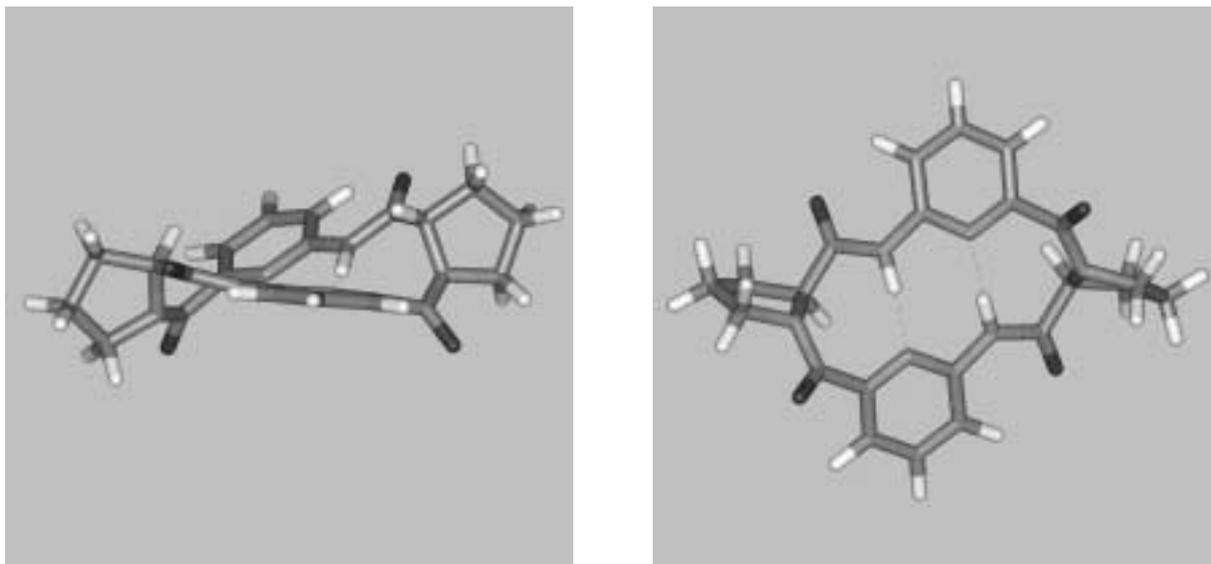


Abb. 2.19 Struktur von **49** in CDCl_3 : Seitenansicht (links), von oben (rechts).

Das Vorliegen intramolekularer Wasserstoffbrücken in Chloroform zeigen indirekt auch die unterschiedlichen Bindungseigenschaften von **49** in DMSO und in Chloroform. Tabelle 2.7 zeigt die Ergebnisse meiner Untersuchungen der Rezeptoreigenschaften von **49** im Vergleich zu denen von **28**.

Ganz allgemein läßt sich hier sagen, daß in DMSO **49** wie erwartet Anionen besser bindet als **28**, wobei die Assoziationskonstanten K_a um den Faktor 3,5 (Phosphat) bis 6,5 (Benzoat) größer sind als die von **28** mit den selben Anionen. Die Voraussage, daß **49** in Lösung entsprechend besser zur Erkennung von Anionen vororganisiert ist, wird damit bestätigt. In Chloroform verhält es sich jedoch gerade umgekehrt. Hier ist **28** der bessere Rezeptor mit K_a , die um den Faktor 4,5 (Bromid) bis 10 (Sulfat) mal größer sind als die von **49**. Auffällig ist bei den Untersuchungen in Chloroform besonders der Shift der Amidprotonensignale in den NMR Spektren. Bei **28** werden diese bei allen Untersuchungen in Gegenwart eines Anions um mehr als + 1,0 ppm tieffeldverschoben, bei **49** ist die Verschiebung deutlich kleiner. Bei den schwach bindenden Anionen Bromid und Sulfat kehrt sich das Vorzeichen von $\Delta\delta_{\max}$ sogar um und das Signal wird leicht hochfeldverschoben. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz für das Auftreten der beiden intramolekularen Wasserstoffbrücken in Tetrapeptid **49** in Chloroform (Abb. 2.19). Diese Wasserstoffbrücken müssen erst aufgebrochen werden, bevor ein Anion gebunden werden kann, was wahrscheinlich die Ursache für die geringe Anionenaffinität von **49** in Chloroform ist.

Anion	28 in Chloroform ^{a)}	49 in Chloroform ^{a)}	28 in DMSO	49 in DMSO
Br ⁻	$K_a^{b)} = 1580 \text{ M}^{-1}$ (4%) $\Delta\delta_{\max}(\text{N-H})^c) = +1,1 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(2)) = +0,1 \text{ ppm}$	$K_a = 320 \text{ M}^{-1}$ (11%) $\Delta\delta_{\max}(\text{N-H}) = -0,8 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(\alpha)) = +1,0 \text{ ppm}$	Keine Wechselwirkung	Shift sehr klein ^{d)}
Benzoat	$K_a = 18200 \text{ M}^{-1}$ (4%) $\Delta\delta_{\max}(\text{N-H}) = +2,8 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(2)) = -0,1 \text{ ppm}$	$K_a = 4110 \text{ M}^{-1}$ (4%) $\Delta\delta_{\max}(\text{N-H}) = +0,6 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(\alpha)) = +1,0 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(5)) = -0,2 \text{ ppm}$	$K_a = 65 \text{ M}^{-1}$ (11%) $\Delta\delta_{\max}(\text{N-H}) = +0,8 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(\alpha)) = +0,3 \text{ ppm}$	$K_a = 440 \text{ M}^{-1}$ (6%) $\Delta\delta_{\max}(\text{N-H}) = +2,0 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(\alpha)) = +0,3 \text{ ppm}$
HSO ₄ ⁻	$K_a = 5760 \text{ M}^{-1}$ (20%) $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(2)) = +0,07 \text{ ppm}$	$K_a = 550 \text{ M}^{-1}$ (25%) $\Delta\delta_{\max}(\text{N-H}) = -0,6 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(5)) = +0,09 \text{ ppm}$	Keine Wechselwirkung	Shift sehr klein ^{d)}
H ₂ PO ₄ ⁻	$K_a = 27500 \text{ M}^{-1}$ (8%) $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(\alpha)) = +1,4 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(2)) = -0,2 \text{ ppm}$	$K_a = 3050 \text{ M}^{-1}$ (3%) $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(\alpha)) = +1,2 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(5)) = -0,3 \text{ ppm}$	$K_a = 340 \text{ M}^{-1}$ (9%) $\Delta\delta_{\max}(\text{N-H}) = +1,4 \text{ ppm}$	$K_a = 1230 \text{ M}^{-1}$ (4%) $\Delta\delta_{\max}(\text{N-H}) = +2,1 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\max}(\text{H}(\alpha)) = +0,4 \text{ ppm}$

a) 2,5% d₆-DMSO/CDCl₃. b) Fehler von $K_a < 20\%$. c) Es wurden jeweils die Signale zur Auswertung herangezogen, die über den gesamten Meßbereich verfolgt werden konnten und dabei einen genügend großen Shift aufwiesen relativ zur Meßgenauigkeit des Spektrometers. d) Shift $< 0,01 \text{ ppm}$, daher Auswertung nicht möglich. Titrationskurve läßt aber auf sehr schwache Wechselwirkung schließen ($K_a \ll 100 \text{ M}^{-1}$)

Tabelle 2.7 Bindungskonstanten von **28** und **49** mit verschiedenen Anionen.

Für den Vergleich der Bindungseigenschaften des Tetrapeptides **49** zu denen des analogen Hexapeptides **4** wurde die Wechselwirkung mit Anionen außerdem in 20% d₄-Methanol/D₂O untersucht. Das Hexapeptid **4** komplexiert in diesem polaren Medium Anionen wie Halogenide oder Sulfat durch Wasserstoffbrücken mit den sekundären Amid N-H Gruppen.³⁴ Dabei wird das Anion von zwei Cyclopeptiden komplexiert, die das Anion so umschließen, daß es effektiv vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt wird. Die Triebkraft für die Anionenkomplexierung ist daher auch ein solvophober Effekt. Ein schneller Austausch der N-H Protonen in dem protischen Medium verhindert eine Beobachtung des N-H Signals, die Wechselwirkung mit dem Anion kann aber durch einen Tieffeldshift der H(α) Signale von **4** im ¹H-NMR Spektrum verfolgt werden. Im ¹H-NMR Spektrum von **49** in 20% d₄-Methanol/D₂O treten jedoch nach Zugabe von Chlorid, Iodid oder Tosylat als Natriumsalz keine signifikanten Änderungen auf. Das kleinere Tetrapeptid ist also nicht in der Lage, diese Anionen in wäßrigem Medium zu binden.

Durch die Einführung von 6-Aminopicolinsäure als aromatischen Baustein in das cyclische Tetrapeptid habe ich dessen Konformation also gezielt so beeinflussen können, daß der Rezeptor **49** in DMSO in einer zur Anionenerkennung günstigen Konformation fixiert wird

(Abb. 2.21 a)). Diese Präorganisation bewirkt dementsprechend eine erhöhte Anionenaffinität des Rezeptors in diesem Lösungsmittel.

In Chloroform wird dieses Cyclopeptid interessanterweise durch intramolekulare Wasserstoffbrücken in einer Konformation fixiert, die einer verdrillten „8“ ähnelt. Da dieser Effekt sich nachteilig auf die Anionenerkennung in Chloroform auswirkt, habe ich nach einer alternativen Methode gesucht, um die Amidbindung in der gewünschten Konformation zu stabilisieren. Zu diesem Zweck wurde Cyclopeptid **51** hergestellt (Abb. 2.20).

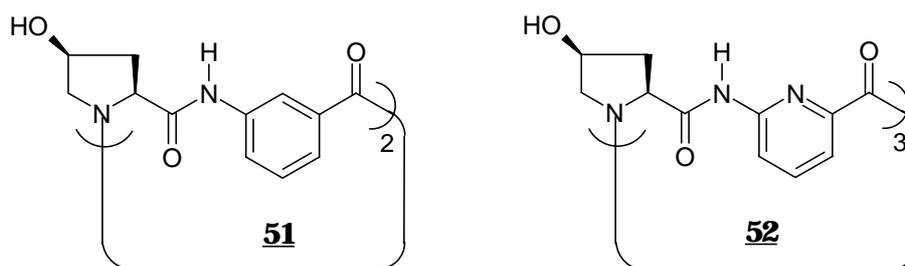


Abb. 2.20 Cyclopeptide *cyclo-[(S,S)Hyp-AB]₂*, **51** und *cyclo-[(S,S)Hyp-AP]₃*, **52**.

Untersuchungen an dem cyclischen Hexapeptid **52** (Abb. 2.20) aus *S_αS_γ*-Hydroxyprolin ((*S,S*)Hyp) und 6-Aminopicolinsäure haben nämlich gezeigt, daß die Hydroxylgruppe eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zum N-H Amid ausbilden kann, jedoch nur, wenn die tertiären Amide gleichzeitig die *trans* Konformation einnehmen. Die Ausrichtung der N-H Bindungen parallel zum lone pair am aromatischen Stickstoff bleibt dabei erhalten (Abb. 2.21 b).⁶³

Bei **51** könnten die OH Gruppen an den Hydroxyprolinuntereinheiten dementsprechend auf Grund intramolekularer Wechselwirkungen ein Konformation begünstigen, die für die Anionenkomplexierung vororganisiert ist, wie zum Beispiel die Konformation in Abbildung 2.21 c), die zu der bevorzugten Konformation von **52** analog ist.

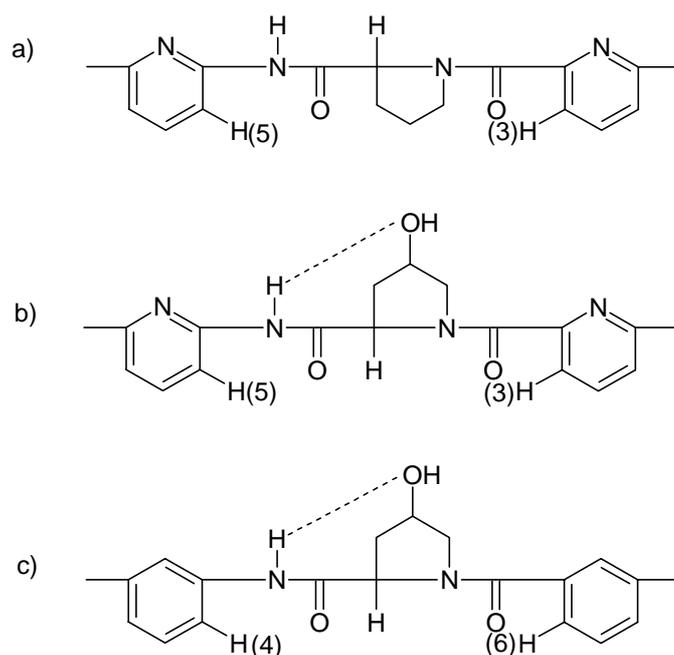
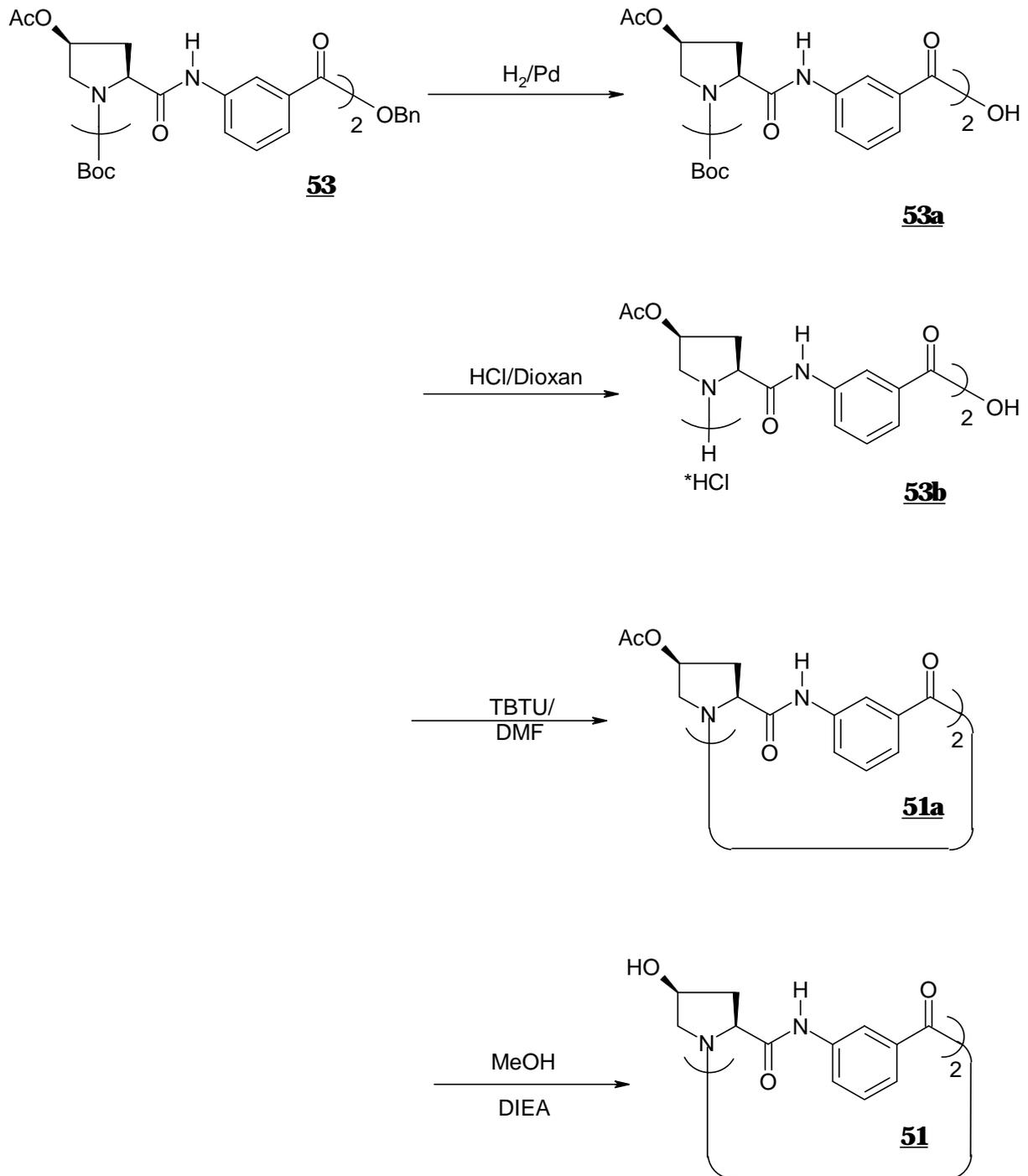


Abb. 2.21 Bevorzugte Konformation a) im cyclischen Tetra- und Hexapeptid mit Picolinsäure (49+4) b) im Cyclohexapeptid mit AP und mit (S,S)Hyp (52) c) mögliche Konformation von Cyclopeptiden mit AB und (S,S)Hyp (51).

Gleichzeitig kann man auf diese Weise überprüfen, ob in den von mir untersuchten cyclischen Tetrapeptiden *trans* Amide möglich sind. Bei Hexapeptid 52 erzwingt nämlich die intramolekulare Wasserstoffbrücke von der Hydroxylgruppe zum N-H Amid eine *all-trans* Konformation, obwohl auch im entsprechenden cyclischen Hexapeptide mit Picolinsäure- und Prolinuntereinheiten die *cis* Konformation an den tertiären Prolinamiden bevorzugt ist.

Die Synthesestrategie zur Darstellung von 51 ist in Schema 2.21 abgebildet. Das lineare Tetrapeptid 53 wurde mir freundlicherweise von G. Heinrichs überlassen, so daß bei der Synthese dieses Tetrapeptids nicht die Direktcyclisierung angewandt wurde. Die Hydroxylgruppe wurde während der Synthese als Acetat geschützt und nach der Cyclisierung mit DIEA in trockenem Methanol entschützt. Auch dieses Tetrapeptid kristallisierte aus Methylchlorid/Methanol in dicken farblosen Prismen. Die Kristallstruktur von 51 ist in Abbildung 2.22 wiedergegeben.



Schema 2.21

Synthese von *cyclo-[(S,S)Hyp-AB]*, 51.

Sie zeigt, daß 51 ebenfalls in einer C_2 -symmetrischen Konformation mit einem Molekül Wasser pro Peptideinheit kristallisiert. Wie bei allen bisher synthetisierten cyclischen Tetrapeptiden liegt am tertiären Amid die *cis* Konformation vor. Die N-H Bindung ist zum H(4) des aromatischen Ringes hin orientiert und weist in die gleiche Richtung wie das H(α) am Hydroxyprolin.

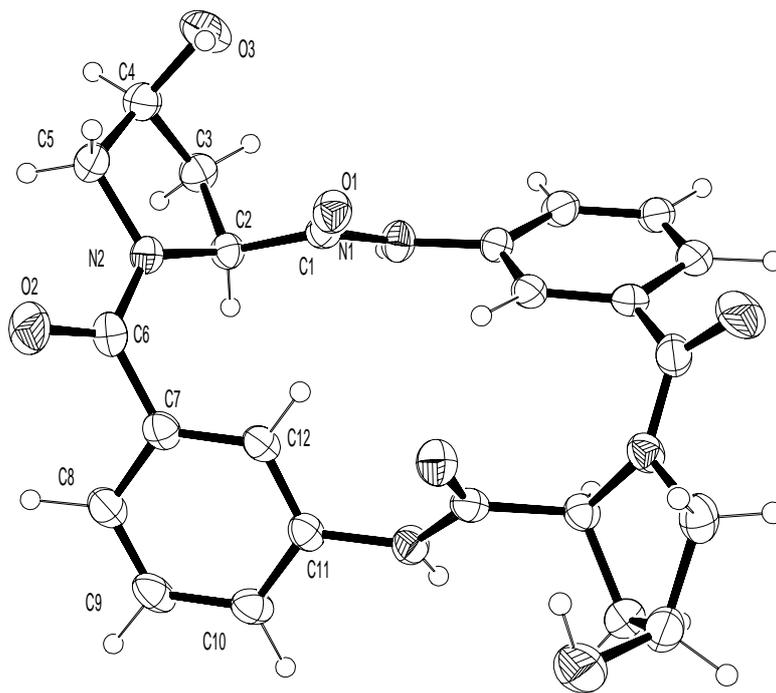


Abb. 2.22

Kristallstruktur von 51.

Betrachtet man die Kristallstruktur von 51 und von 28 nebeneinander, so stimmen beide Strukturen fast völlig überein, wie in Abbildung 2.23 veranschaulicht wird.

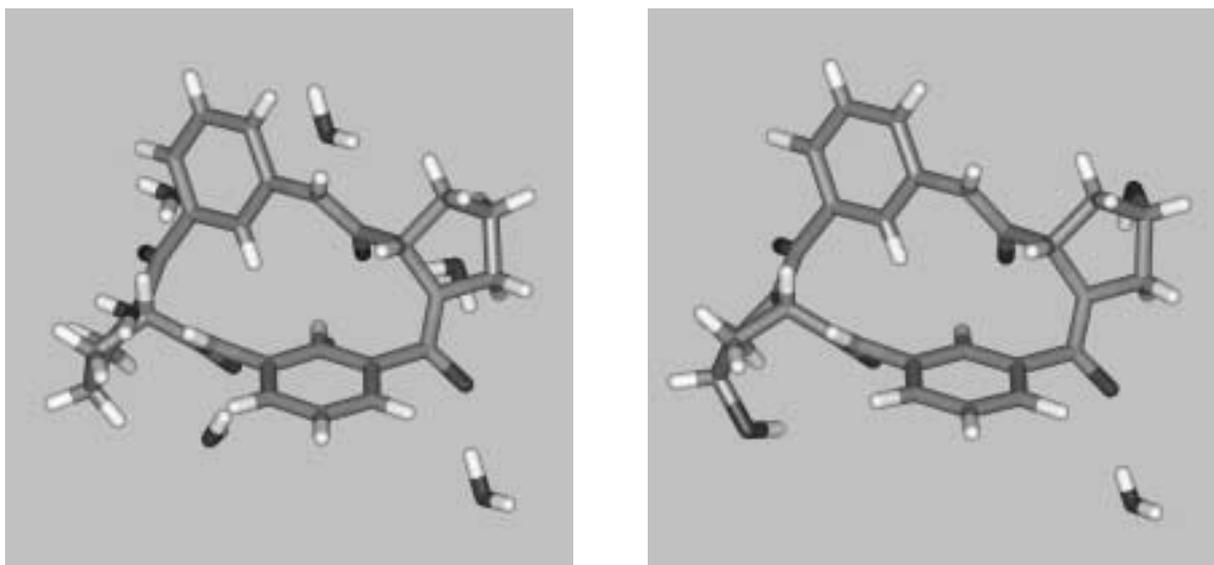


Abbildung 2.23

Vergleich der Kristallstrukturen von 28 (links) und 51 (rechts).

Die Torsionswinkel zwischen den Bindungsebenen in beiden Kristallstrukturen unterscheiden sich dementsprechend ebenfalls kaum:

Bindung:	Winkel in 28	Winkel in 51
C1-N1-C11-C12	43°	37°
N2-C6-C7-C12	51°	55°
N1-C1-C2-N2	167°	171°
C1-C2-N2-C6	-91°	-91°
C10-C11-N1-C1	-140°	-148°
C8-C7-C6-N2	130°	125°

Auf die Festkörperstruktur von **51** hat die Hydroxylgruppe also keinen Einfluß. Wie die Untersuchungen mit **49** jedoch gezeigt haben, können durchaus in Lösung intermolekulare Wechselwirkungen auftreten, die im Festkörper durch Packungseffekte verhindert werden. Daher wurde die Struktur des Cyclopeptides wie üblich auch in Lösung eingehend untersucht. Das ¹H-NMR Spektrum der Verbindung in d₆-DMSO zeigt einen scharfen, einfachen Signalsatz und entspricht somit im zeitlichen Mittel einer C₂-symmetrischen Konformation; die chemischen Verschiebungen der C(β) und der C(γ) Signale der Prolinuntereinheiten weisen wie bei den Tetrapeptiden **28** und **49** auf das Vorliegen von *cis*-Konformationen an den tertiären Amididen hin (Tabelle 2.8).

	Shift <i>trans</i> ^{a)}	Shift <i>cis</i> ^{a)}	δ(51)
C(β)	29,5 ± 0,5 ppm	31,3 ± 0,5 ppm	32,9 ppm
C(γ)	24,2 ± 0,5 ppm	22,5 ± 0,5 ppm	22,5 ppm

a) Literaturwerte für C(β) und C(γ) in d₆-DMSO für *cis* und *trans* Amide an (L)Prolin in DMSO.⁵⁴

Tabelle 2.8 Zuordnung der C(β)- und der C(γ)-Shifts von **51**.

Im ROESY-NMR Spektrum der Verbindungen in d₆-DMSO (Abb. 2.24) treten nur Kreuzsignale auf, die mit der räumlichen Anordnung der Atome in der Kristallstruktur übereinstimmen, das heißt N-H mit H(4) und N-H mit H(α). Auch ein Kreuzsignal zwischen N-H und H(2) tritt auf. Der Makrocyclus wird also auch in Lösung nicht in einer bestimmten Konformation fixiert, die eine Rotation des sekundären Amids unterbindet.

ROESY-NMR Spektrum von **51** in DMSO

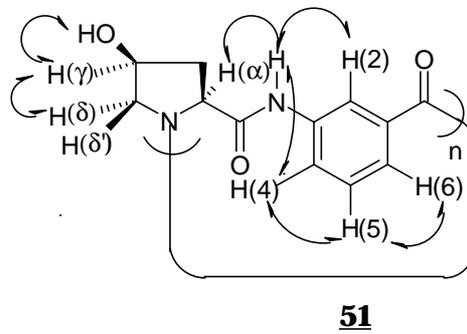
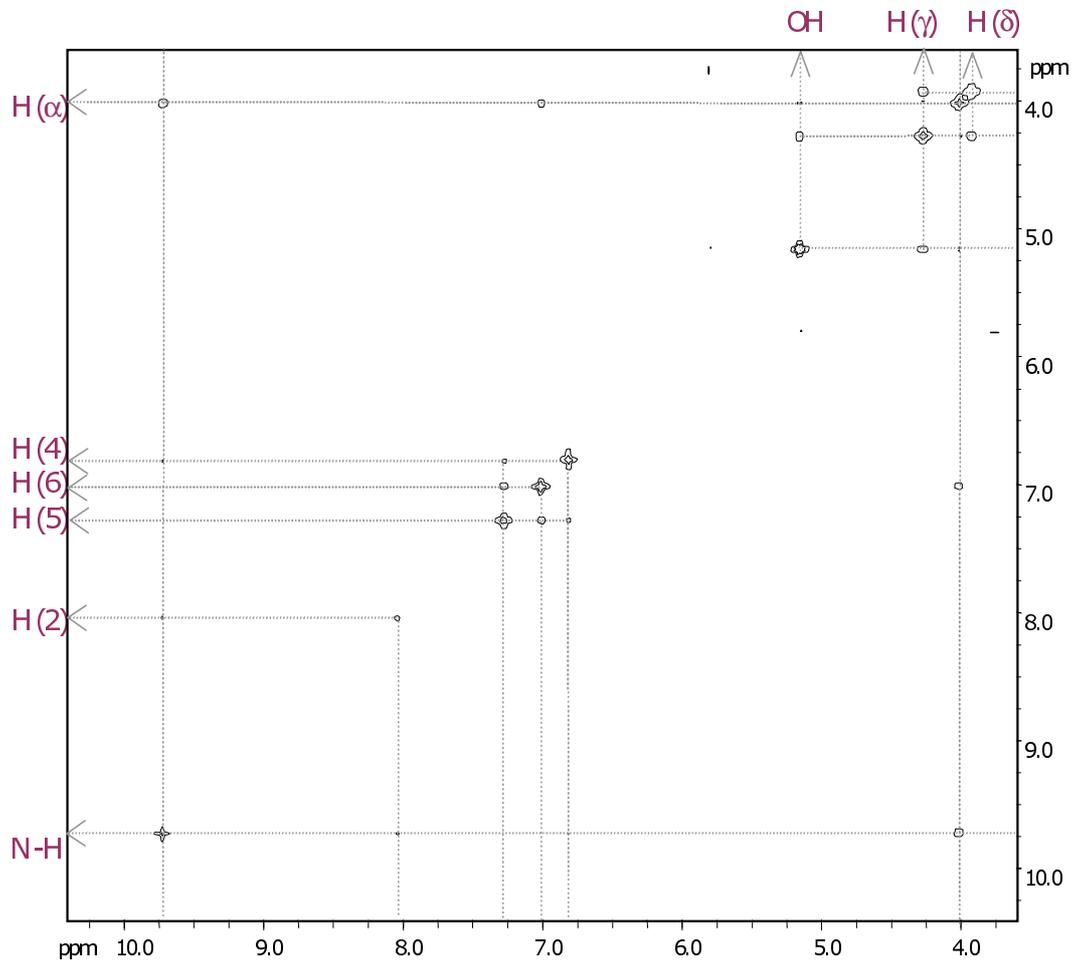


Abb. 2.24

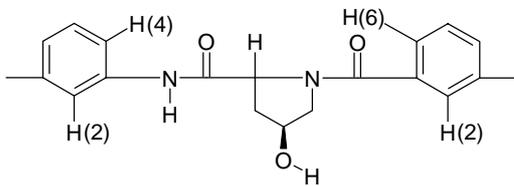
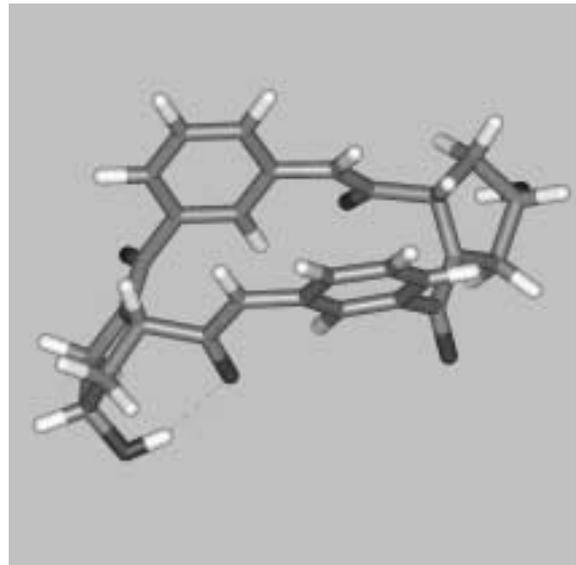
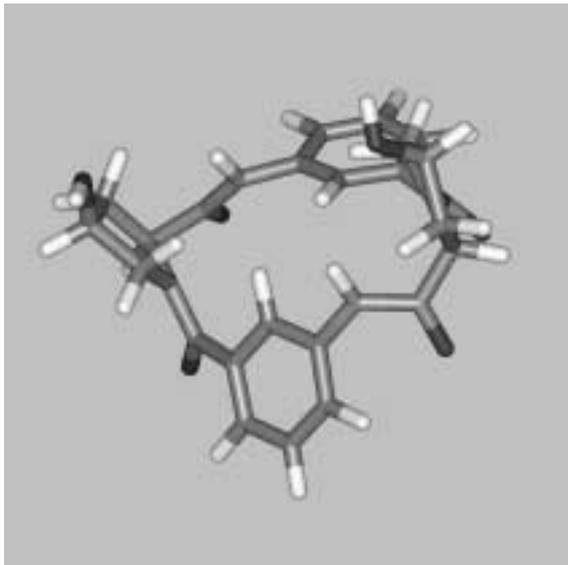
Ausschnitt aus ROESY-NMR Spektrum von **51** in DMSO.

Somit hat die Hydroxylgruppe am C(γ) des Prolinrings auch in Lösung keinen Einfluß auf die Konformation des cyclischen Tetrapeptides.

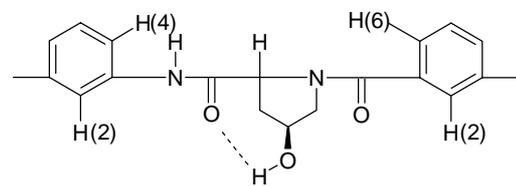
Dieses Ergebnis kann mehrere Ursachen haben. Entweder reicht der Energiegewinn, der bei Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke aufträte, nicht aus, um eine Umwandlung des tertiären Amids in die *trans* Konformation zu bewirken, oder die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen den Hydroxylgruppen am C(γ) der Prolinringe und den N-H Amiden ist aus geometrischen Gründen in dem kleineren Tetrapeptid gar nicht möglich.

Um letztere Möglichkeit auszuschließen, wurde eine Konformationsanalyse von **51** durchgeführt (ChemDraw3D, PM3), bei der verschiedene symmetrische Konformationen von **51** berechnet und im Hinblick auf ihre Energie und den Abstand N-H O-H verglichen wurden. Die erhaltenen Ergebnisse sind natürlich kritisch zu betrachten, da sie das Verhalten des Peptides im Festkörper oder in Lösung nicht exakt simulieren können. So weicht z.B. die berechnete Struktur in Abbildung 2.25 b), die der Konformation von **51** im Festkörper entspricht, etwas von der beobachteten Festkörperstruktur ab: Der Winkel zwischen den aromatischen Ringen ist deutlich flacher und der C(1)=O H-O Abstand verringert sich um 0,50 Å gegenüber der Kristallstruktur auf 2,20 Å. Dementsprechend wurde in dieser berechneten Struktur eine Wasserstoffbrücke C(1)=O H-O gefunden werden.

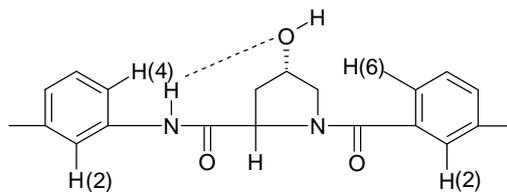
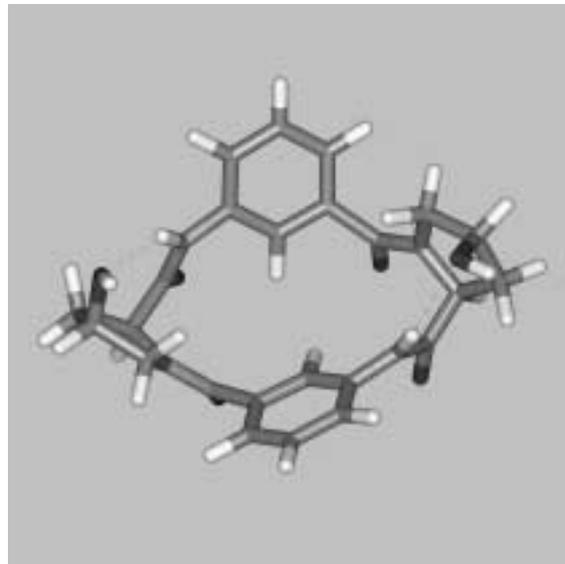
Bei dieser Konformationsanalyse zeigte sich aber auch, daß sich die Festkörperkonformation des Hexapeptides **52** tatsächlich nicht auf das Tetrapeptid übertragen läßt, wie in Abbildung 2.25 a) dargestellt ist. Nimmt man eine analoge Struktur für das Tetrapeptid an, so führt die Berechnung zu einer Konformation, in der zwar die relative Anordnung der Bindungen mit der in Hexapeptid **52** übereinstimmen, der Abstand N-H O-H beträgt hier allerdings 3,56 Å. Das sind 1,34 Å mehr als im entsprechenden Hexapeptid **52** und gut 0,75 Å mehr als der durchschnittliche N-H O-H Abstand, den man in Kristallstrukturen von Peptiden findet.⁶⁴ Es scheint also, daß sich in dem kleineren, gespannteren Tetrapeptid das N-H Proton und der Sauerstoff der Hydroxylgruppe am Prolin in dieser Konformation nicht nahe genug kommen können, um eine intramolekulare Wasserstoffbrücke auszubilden. Nach meinen Berechnungen ist diese Struktur daher um 16 kcal/mol benachteiligt. Es konnte aber durchaus eine Konformation berechnet werden, bei der intramolekulare N-H····OH Wasserstoffbrücken gefunden wurden (Abb. 2.25 c).



a) zur Kristallstruktur des Hexapeptides **52**
analoge Konformation (-148 kcal/mol).



b) Konformation der Festkörperstruktur von **51**
(-164 kcal/mol).



c) Berechnete Konformation von **51**, bei der Wasserstoffbrücken gefunden wurden (-147 kcal/mol).

Wie erwartet, ist diese Konformation eine *all-trans* Konformation. Der Abstand N-H O-H ist mit 2,38 Å etwas länger als in der Festkörperstruktur des Hexapeptides **52**, wo der Abstand 2,22 Å beträgt. Trotz der beiden Wasserstoffbrücken ist diese berechnete Konformation gegenüber der Konformation, die tatsächlich im Festkörper vorliegt (Abb. 2.25 b) um 17 kcal/mol benachteiligt, wahrscheinlich weil der Energieaufwand für die konformative Umordnung und die *cis/trans* Isomerisierung die bei der Bildung der Wasserstoffbrücken freiwerdende Bindungsenergie überwiegt.

Diese Berechnungen zeigen also, daß eine intramolekulare Wasserstoffbrücke in **51** im Prinzip geometrisch möglich, energetisch aber unvorteilhaft ist. Damit stehen die berechneten Daten in gutem Einklang mit den Ergebnissen meiner Untersuchung und geben einen weiteren Hinweis auf die Notwendigkeit von *cis* Amidinen zur Bildung dieser cyclischen Tetrapeptide mit aromatischen Bausteinen.

Welches Potential besitzen die von mir vorgestellten Tetrapeptide nun, das über die Anionenerkennung hinausgeht? Der Hohlraum der Tetrapeptide ist zum Einschluß von Gästen zu klein, und eine Variation der α -Aminosäure, um den Abstand zwischen den Aromaten und damit den Hohlraum zu vergrößern, bietet sich nicht an, da offensichtlich gerade Prolin für die Bildung dieser cyclischen Tetrapeptide nötig ist. Nachdem verschiedene Möglichkeiten, die Konformation der Makrocyclen durch Variation der Peptiduntereinheiten zu beeinflussen, untersucht worden waren, erschien mir die Einführung weiterer Bindungszentren als ein erfolgversprechendes Konzept zur Gewinnung neuer interessanter Rezeptoren auf Basis meiner cyclischen Tetrapeptide. Die Einführung von Harnstoff als zusätzliches Bindungszentrum im bereits bekannten Hexapeptid **2** war von Beginn an geplant. Durch die gewonnenen Erkenntnisse über die Struktur und die eingeschränkte Flexibilität der cyclischen Tetrapeptide eröffnen sich mir nun ganz neue Möglichkeiten, durch Substitution mit Harnstoff oder anderen funktionellen Gruppen, molekulare Pinzetten auf Basis cyclischer Tetrapeptide herzustellen. Meine diesbezüglichen Untersuchungen und Ergebnisse sind im folgenden Kapitel beschrieben.

2.6 Tetrapeptide mit aromatischen Substituenten

Die ersten Arbeiten aus unserer Gruppe zur Einführung weiterer Bindungszentren in cyclische Hexapeptide aus (L)Prolin und 3-Aminobenzoesäure waren die Untersuchungen von J. Bitta zur Synthese und den Rezeptoreigenschaften von **5** und seinen Derivaten.⁵² Mein ursprünglicher Plan war es, aufbauend auf diese Arbeiten Hexapeptid **7** herzustellen und seine Bindungseigenschaften im Vergleich mit anderen cyclischen Hexapeptiden zu untersuchen. Erste Versuche zur Einführung von Harnstoffsubstituenten haben schon gezeigt, wie die Darstellung von **7** aus dem Hexapeptid **25** zu realisieren sei. Die Untersuchungen zur Struktur und den Rezeptoreigenschaften der cyclischen Tetrapeptide haben jedoch ergeben, daß diese Cyclopeptide neue Perspektiven für die Darstellung von Rezeptoren bieten, die sich deutlich von denen der Hexapeptide unterscheiden. In den Tetrapeptiden sind die aromatischen Untereinheiten nämlich recht beweglich zwischen zwei Peptidbrücken aufgehängt, deren Konformation eher starr ist (Abb. 2.26).

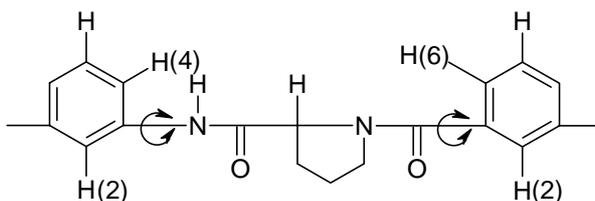


Abb. 2.26

Bewegliche Bindungen in den cyclischen Tetrapeptiden.

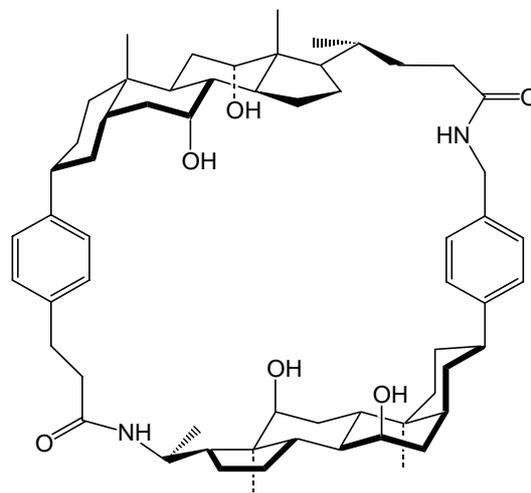
Man kann die Peptidbindungen daher mit einem Scharnier vergleichen, an dem die aromatischen Ringe hin und her schwingen können. Als Momentaufnahmen möglicher Konformationen kann man die Kristallstrukturen von **44** und **49** betrachten. Meine Idee war nun, solche Tetrapeptide als Gelenk für die Darstellung *molekularer Pinzetten* zu nutzen.

Der Begriff „molekulare Pinzette“ wurde von Whitlock⁶⁵ für Rezeptoren mit zwei aromatischen Chromophoren geprägt, die kovalent durch einen Spacer verknüpft sind und aromatische Gäste durch π -Stapelwechselwirkungen binden können.⁶⁶ Inzwischen wird er etwas allgemeiner für Systeme verwendet, in denen zwei Bindungsarme über einen Spacer verbunden sind.⁶⁷ Durch Anbringen von Bindungszentren in 5-Position der aromatischen Aminosäure wollte ich nun Rezeptoren herstellen, bei denen zwei an das „Cyclopeptidscharnier“ gebundene funktionelle Gruppen wie eine Pinzette Gäste umfassen und erkennen können. Aus diesem Grund habe ich mich bei meinen Untersuchungen zur

Einführung weiterer Bindungszentren im folgenden ganz auf die cyclischen Tetrapeptide konzentriert und basierend auf Tetrapeptid **44** neue Cyclopeptide mit verschiedenen aromatischen Substituenten hergestellt.

2.6.1 Cyclische Tetrapeptide mit Cholsäuresubstituenten

Davis hat mit der Darstellung der *Cholaphane* demonstriert, daß Cholsäure als Baustein für neue Kohlenhydratrezeptoren⁶⁸ geeignet ist.⁶⁹ In diesen von ihm beschriebenen makrocyclischen Rezeptoren sind zwei bis drei Cholsäureeinheiten amidisch über einen aromatischen Spacer verknüpft. Die Hydroxylgruppen der Cholsäure und die N-H Protonen der Amidbrücken weisen in Chloroform ins Innere des von den Cholsäureeinheiten aufgespannten Hohlraums und können dort Zucker durch Wasserstoffbrücken binden. Bei Untersuchungen der Bindungseigenschaften von Cholaphan **53** (Abb. 2.27) mit Octylglucopyranosiden in Chloroform zeigt der chirale Hohlraum eine deutliche Präferenz für das β -D-Anomer gegenüber dem α -D-Anomer. Die gemessenen Bindungskonstanten liegen im Bereich $3 \cdot 10^2$ bis $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.^{69b)}



53

Abb. 2.27

Cholaphan **53**.

Bei den Cholaphanen und verwandten Kohlenhydratrezeptoren⁷⁰ ist die Cholsäure selbst Bauelement des Makrocyclus und nicht als zusätzliches Bindungszentrum an einem aus anderen Untereinheiten aufgebauten makrocyclischen Hohlraum angebracht. Pinzettenartige

Rezeptoren, in der Cholsäuresubstituenten als Bindungsarme dienen, wurden bisher als Enzym Mimetika und als Podanden zur Solvatisierung von Perylen in Wasser eingesetzt.

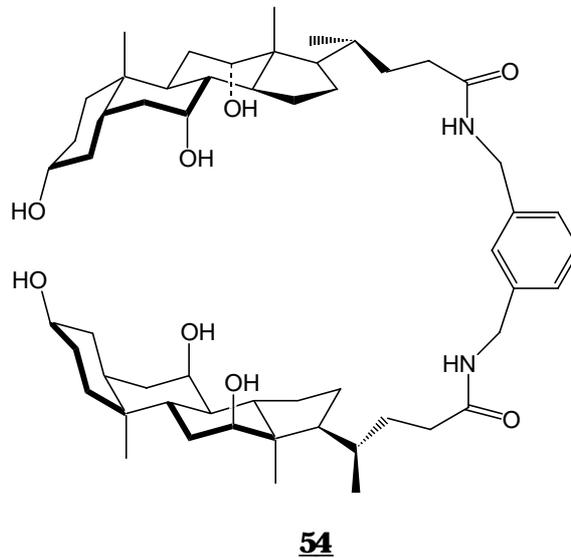


Abb. 2.28 *Acyclischer Zuckerrezeptor auf Cholsäurebasis.*

Der von Burrows als Vorläufer der Cholaphane beschriebene acyclische Wirt **54** bevorzugt allerdings, wie in Abbildung 2.28 dargestellt, eine pseudo-makrocyclische Konformation und kann ebenfalls Zuckermoleküle in den Hohlraum aufnehmen.⁷¹ Der CH₂-Spacer zwischen dem Aromaten und dem Amidanker in **54** läßt jedoch eine Verdrillung der Cholsäureeinheiten weg von dem Hohlraum zu, wodurch die Bindungseigenschaften verschlechtert werden. Durch Anbindung von Cholsäureeinheiten an die von mir entwickelten Tetrapeptide könnte man analoge pinzettenartige Kohlenhydratrezeptoren erhalten, in denen die Orientierung der Bindungsarme durch eine direkte Fixierung an die aromatischen Tetrapeptiduntereinheiten von der Bewegung des Cyclopeptidscharniers beeinflußt wird. Dies könnte eine effektivere Anpassung des Rezeptors an ein gegebenes Substrat ermöglichen. Um dies zu überprüfen, habe ich Cyclopeptid **55** dargestellt (Abb. 2.29).

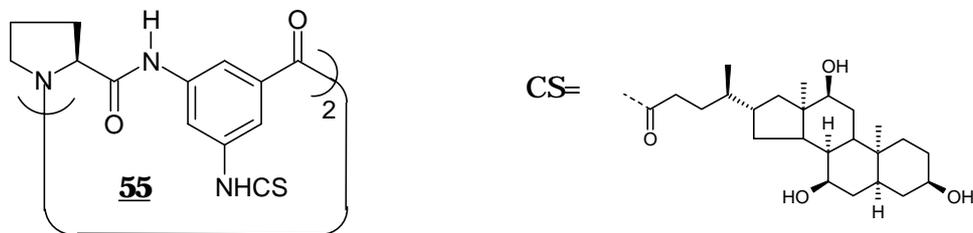
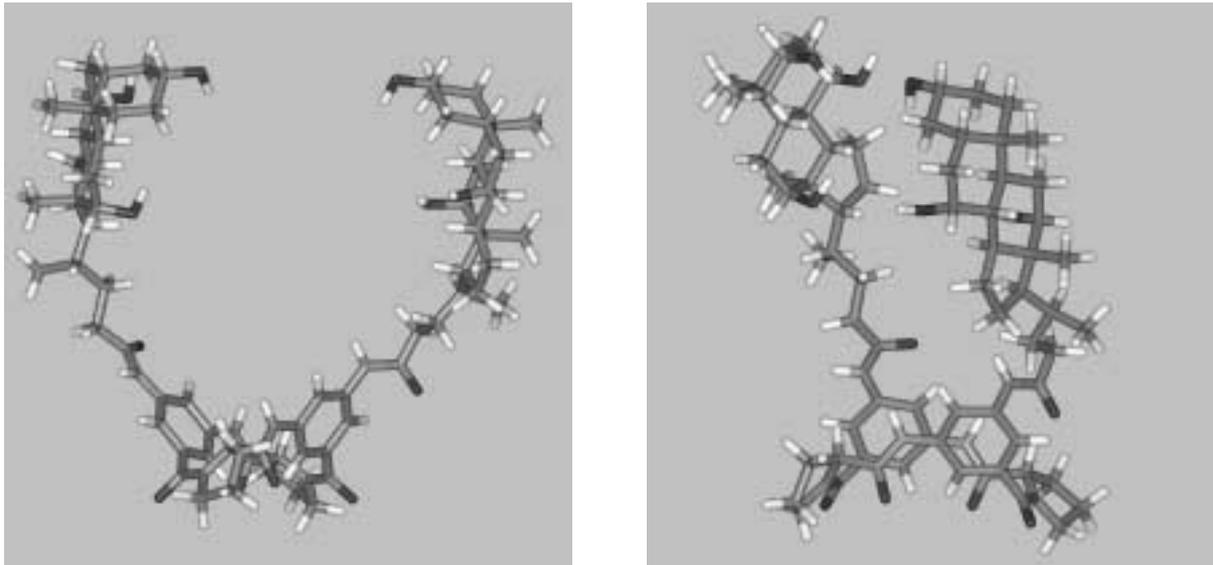
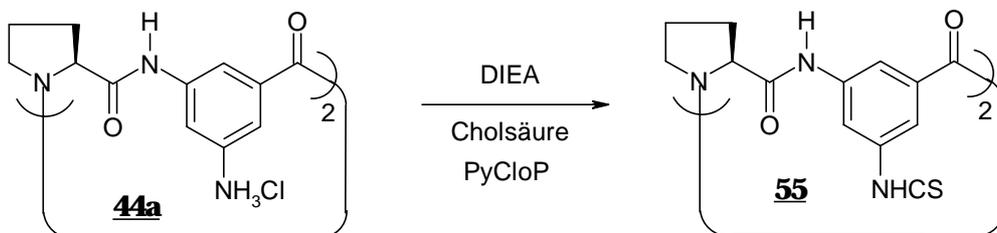


Abb. 2.29 $\text{Cyclo-}[(L)\text{Pro-AB}(5\text{NHCS})]_4$, **55**; oben: energieminierte Darstellung (Cerius², Dreiding 2.21) Blick auf die Cholsäure von der Seite (links) und auf das Grundgerüst von der Seite (rechts).

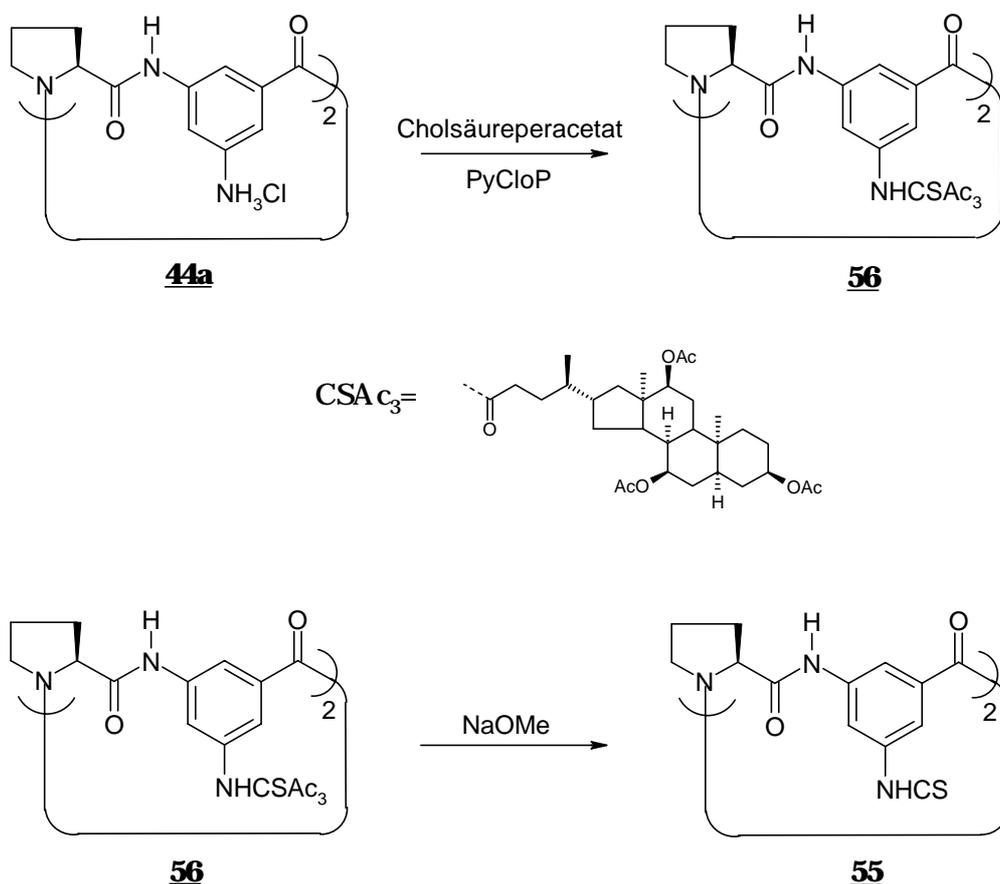
Zur Synthese von **55** wurde das Hydrochlorid **44a** mit Cholsäure gekuppelt (Schema 2.22). Als Kupplungsreagenz wurde wie bei allen reaktionsträgen aromatischen Aminen PyCloP verwendet. Daher mußte die Reaktion in Methylenchlorid durchgeführt werden. Auf Grund der schlechten Löslichkeit der beiden Edukte in Methylenchlorid lief die Reaktion sehr langsam ab, nach 2 Wochen war sie jedoch beendet.



Schema 2.22 $\text{Synthese von cyclo-}[(L)\text{Pro-AB}(5\text{-NHCS})]_2$, **55**.

Die Aufarbeitung erwies sich allerdings als schwierig, da die Abtrennung des Produktes **55** von überschüssiger Cholsäure auf Grund der ähnlichen Polarität beider Verbindungen nicht gelang. Nur eine geringe Menge des Produktes konnte analysenrein erhalten werden.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen wurden die Cholsäure bei einem zweiten Versuch als Peracetat eingesetzt, da sich das acetylgeschützte Cyclopeptid **56** auf Grund seiner geringeren Polarität wesentlich leichter von den Edukten abtrennen lassen sollte und man es anschließend durch basische Hydrolyse sauber und vollständig entschützen können müßte.^{69c)+d),70a)} Schema 2.23 zeigt diesen Syntheseweg. Das Peracetat wurde nach der Methode von Nakanishi⁷² dargestellt und erwies sich als gut löslich im Reaktionsmedium Methylchlorid. Wie erwartet, ließ sich der acetylgeschützte Rezeptor **56** nach der Kupplung problemlos von den Verunreinigungen abtrennen und kristallisierte aus Methanol/Wasser als Heptahydrat aus.



Schema 2.23

Alternative Synthese von cyclo-[L]Pro-AB(5-NHCS)₂, **55**.

Als schwierig erwies sich jedoch die Verseifung der Acetatschutzgruppen. Auch bei der Darstellung der Cholaphane wurde acetylgeschützte Cholsäure eingesetzt und die Schutzgruppen am Ende der Synthese mit starken Basen im wäßrigen Medium verseift. Bei

Cyclopeptid **56** ist diese Methode ungünstig, da unter solchen Bedingungen mit einer Hydrolyse der etwas labileren tertiären Amide zu rechnen ist. Als mildere Variante wurde die Hydrolyse der Acetatgruppen mit Natriummethanolat in trockenem Methanol gewählt. Unter diesen Bedingungen gelang die Abspaltung der ersten beiden Acetatgruppen schnell, die Spaltung der restlichen vier Schutzgruppen war jedoch sehr langsam. Nach einer Woche war die Reaktion jedoch auch auf diesem Weg beendet und der freie Rezeptor **55** konnte nach chromatographischer Abtrennung der Salze über eine Kieselgelsäule mit Methylenchlorid/Methanol sauber isoliert werden. Die Struktur der beiden Cyclopeptide in Lösung wurde wie bei den vorangegangenen Untersuchungen durch ^{13}C -, ^1H -NMR und NOESY Spektroskopie analysiert. Dabei zeigte sich, daß die Cholsäuresubstituenten auf die Geometrie des Cyclopeptidringes keinen signifikanten Einfluß haben: Bei **55** und **56** wurden in DMSO ähnliche Konformationen gefunden wie für das unsubstituierte Grundgerüst **44**.

Zur Analyse der Bindungseigenschaften dieser potentiellen neuen Kohlenhydratrezeptoren wurde, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, die ^1H -NMR Spektroskopie genutzt. So zeigte das NMR Spektrum einer 2mM Lösung von **55** in 20% d_6 -DMSO/ CDCl_3 nach Zugabe einer äquivalenten Menge α -D-Methylglucosid eindeutige Veränderungen, die auf eine Wechselwirkung des Cyclopeptides mit dem Zucker zurückgeführt werden können: Die chemischen Verschiebungen der Hydroxylprotonen des α -D-Methylglucosids shiften nach Zugabe von einem Äquivalent **55** alle um etwa + 0,015 ppm Tieffeld. Ein solcher Tieffeldshift ist üblicherweise ein Hinweis darauf, daß die Hydroxylgruppe Wasserstoffbrücken, zum Beispiel zu Hydroxyl- oder den Amidgruppen eines Wirtes, ausbilden. Ein analoger Shift der Signale der Hydroxylprotonen in Wirt **55** konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, da diese Signale mit den Gastsignalen überlagern. Interessanterweise tritt aber ein Tieffeldshift des Signals des N-H Protons des Cholsäureamids von + 0,014 ppm auf. Diese Amidbindung könnte also möglicherweise ebenfalls eine Wasserstoffbrücke zum dem eingelagerten Gast ausbilden. Eine solche Beteiligung der Amidgruppen an der Zuckererkennung war auch bei den Cholaphanen beobachtet worden. Für eine Bestimmung der Assoziationskonstante durch NMR-Titration waren die beobachteten Shifts allerdings im Verhältnis zur Meßgenauigkeit des NMR-Spektrometers zu klein. Auf Grund der schlechten Löslichkeit von **55** in Chloroform konnte der DMSO Anteil im Lösungsmittelgemisch nicht weiter gesenkt werden, um dadurch die Wirt-Gast-Wechselwirkung und gleichzeitig die Entschirmung der Gastprotonen zu erhöhen. Daher ist eine exakte Bestimmung der Bindungskonstanten leider nicht möglich. Eine zur Abschätzung

der Größenordnung der Wechselwirkung durchgeführte NMR Titration läßt aber auf eine sehr schwache Wechselwirkung mit $K_a \ll 100 \text{ M}^{-1}$ schließen.

Ein möglicher Grund für die schlechteren Bindungseigenschaften von **55** im Vergleich zu den Cholaphanen könnte der hohe DMSO-Gehalt des von mir verwendeten Lösungsmittels sein. Alle bislang beschriebenen Zuckerrezeptoren mit Cholsäureuntereinheiten sind in reinem Chloroform untersucht worden und bereits der Wechsel des Lösungsmittels zu Methylenchlorid resultierte bei einigen Untersuchungen in einer drastischen Abnahme der Bindungskonstanten. Die Ursache für die schlechteren Rezeptoreigenschaften cholsäurehaltiger Rezeptoren in polaren Lösungsmitteln ist die schlechte Präorganisation der Bindungstasche in diesem Medium. Je polarer das Lösungsmittel nämlich ist, desto größer die Tendenz der Hydroxylgruppen der Cholsäure, sich weg vom Hohlraum der Rezeptoren in Richtung des umgebenden Lösungsmittels zu orientieren.⁷³

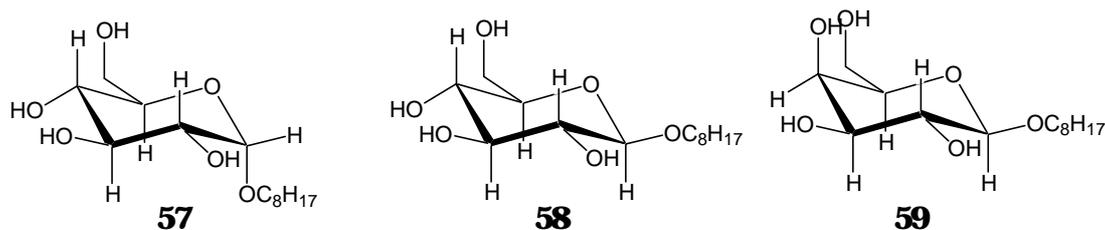


Abb. 2.30 Verwendete Zucker: α -D-Octylglucopyranosid **57**, β -D-Octylglucopyranosid **58**, β -D-Octylgalactopyranosid **59**.

Da der acetylgeschützte Rezeptor **56** in Chloroform viel besser löslich ist, habe ich die Affinität dieser Verbindung für Kohlenhydrate untersucht. Die Shifts der O-H Signale der beiden anomeren D-Octylglucoside **57** und **58** (Abb. 2.30) nach Zugabe von einem Äquivalent **56** zu einer 2 mM Lösung dieser Gäste in 0,5% d_6 -DMSO/ CDCl_3 war bei beiden Anomeren signifikant: Die Signale der O-H Gruppen wurden alle um etwa $+ 0,12 \pm 0,01$ ppm Tieffeld verschoben, eine Tieffeldverschiebung also, die fast um den Faktor 10 größer ist als der von **55** induzierte Shift. Darüber hinaus ist im Spektrum des Rezeptors ein Tieffeldshift der Signale der Acetylprotonen von $+ 0,001$ ppm zu beobachten. Auf die Zugabe von 0,5% DMSO kann verzichtet werden, wenn man die Konzentration der Rezeptorstammlösung auf 1 mM reduziert. Eine präzise Bestimmung der Bindungskonstanten durch NMR Titration war jedoch auch bei Rezeptor **56** nicht möglich, da die Wechselwirkung mit den Kohlenhydraten ebenfalls schwach ist. Die schlechten Bindungseigenschaften des acetylgeschützten Rezeptors

sind sicherlich darauf zurückzuführen, daß freie Hydroxylgruppen notwendig sind, um durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den Cholsäureuntereinheiten die zur Zuckererkennung geeignete pseudo-makrocyclische Konformation in Abbildung 2.28 zu stabilisieren.⁷³ Dieses Präorganisation wird durch die Acetylschutzgruppen in **56** verhindert. Dennoch ist die Tatsache, daß **56** mit verschiedenen Zuckern wechselwirkt, bemerkenswert: Bei der vollständig und der einfach acetylgeschützten Vorstufe des Cholaphans **53** konnte keine Wechselwirkung mit Zuckern nachgewiesen werden.^{69a} Wenn also bereits der acetylgeschützte Rezeptor **56** in Chloroform mit verschiedenen Zuckern eine schwache Bindung eingeht, so kann man erwarten, daß **55** in reinem Chloroform ein leistungsfähiger Kohlenhydratrezeptor sein könnte.

Man könnte sich nun überlegen, durch gezielte strukturelle Veränderungen an **55** seine Löslichkeit in Chloroform zu erhöhen. Die vorliegende Literatur gibt auch Beispiele, wie die Löslichkeit cholsäurehaltiger Makrocyclen in Chloroform durch das Einführen hydrophober Reste erhöht werden kann.^{69d)} Oberste Priorität dieses Projektes war aber nicht die Darstellung eines Zuckerrezeptors, es sollte vielmehr erst der Nachweis erbracht werden, daß die Darstellung molekularer Pinzetten mit den von mir entwickelten Tetrapeptiden überhaupt möglich ist. Die schwachen Effekte von **55** und **56** mit den verschiedenen Zuckern sind dafür keine ausreichender Beweis. Daher habe ich die Arbeiten zur Zuckererkennung an dieser Stelle zurückgestellt.

2.6.2 Cyclische Tetrapeptide mit Harnstoffsubstituenten

Bei der zweiten Strategie zur Synthese pinzettenartiger Rezeptoren auf Basis des Tetrapeptids **44** wurde die Einführung von Harnstoffsubstituenten in die aromatischen Peptiduntereinheiten untersucht, um damit eine verbesserte Anionenaffinität auch in polaren Medien zu erreichen. Von den unsubstituierten Tetrapeptiden **28** und **49** werden in DMSO nur Anionen mit einem $pK_b \leq 12$ komplexiert, nicht basische Anionen wie Halogenide, Tosylat und Sulfat werden jedoch nicht gebunden (Tabelle 2.7). Da sich Harnstoffsubstituenten bewährt haben, um auch in polaren Lösungsmitteln wie DMSO noch Anionen mit $K_a \geq 10^3 \text{ M}^{-1}$ zu binden,^{37b-d} erschienen sie mir als Bindungszentren für die Darstellung von Cyclopeptiden mit verbesserter Anionenaffinität besonders geeignet.

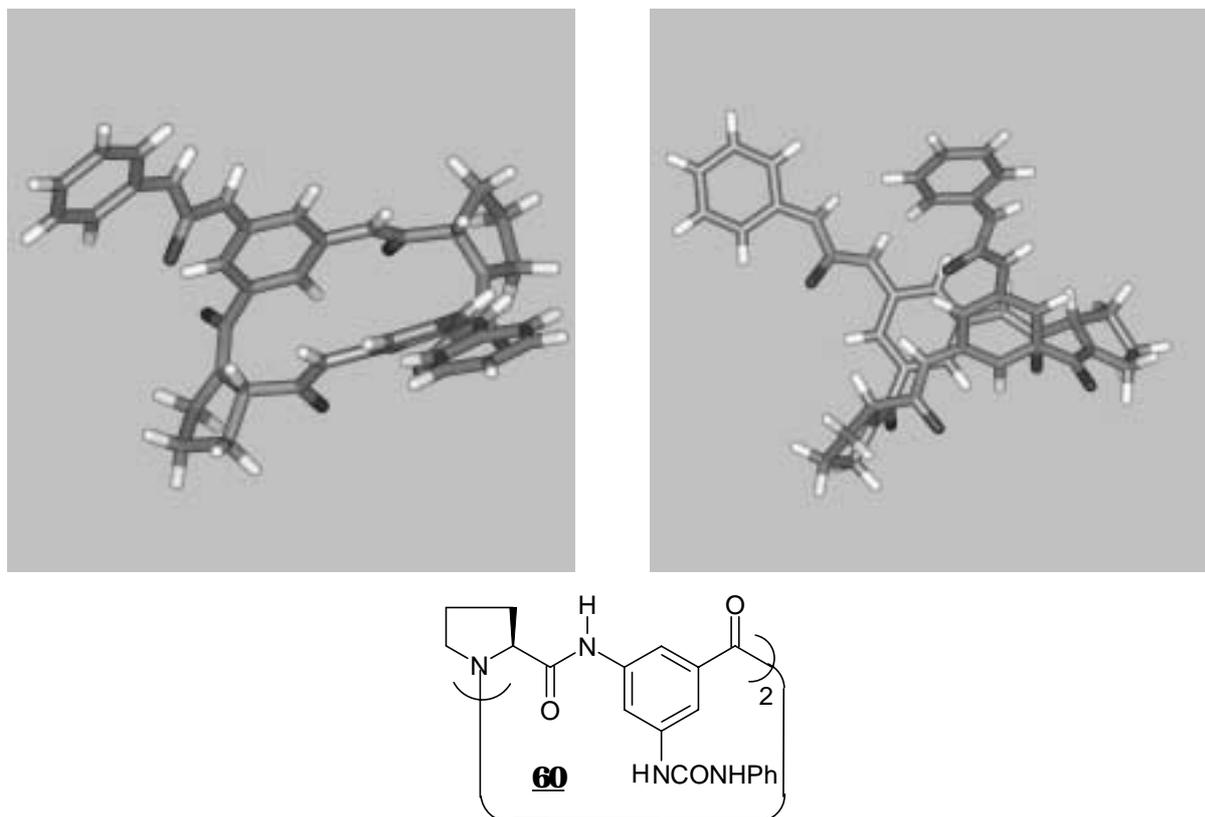


Abb. 2.31 $\text{Cyclo-}[(L)\text{Pro-AB}(5\text{NHCONHPh})]_4$, **60**: oben: energieminierte Darstellung (Cerius², Dreiding 2.21) Ansicht von oben (links) und von der Seite (rechts).

Mit der Darstellung von Cyclopeptid **60** (Abb. 2.31) könnte darüber hinaus eine Diskriminierung von Anionen nach ihrer Geometrie möglich sein, da **60**, um einem Anion zwischen den beiden Harnstoffen Raum zu geben, eine Konformation mit einem vergrößerten

Öffnungswinkel zwischen den beiden Aminobenzoessäureeinheiten einnehmen muß. Durch die direkte Anbindung des Harnstoffs an das aromatische Amin ohne Spacer wird dieser Öffnungswinkel unmittelbar auf die Bindungsarme übertragen. Infolgedessen können sich die beiden Harnstoff N-H Bindungen nicht mehr linear ausrichten (Abb. 2.32), um z. B. sphärische Anionen wie Halogenide durch lineare Wasserstoffbrücken zu binden. Man kann daher erwarten, daß Rezeptor **60** trigonale und tetraedrische Anionen wie Nitrat, Phosphat und Sulfat bevorzugt bindet, welche durch ihre Geometrie mit den N-H Bindungen der Harnstoffe optimal wechselwirken können.

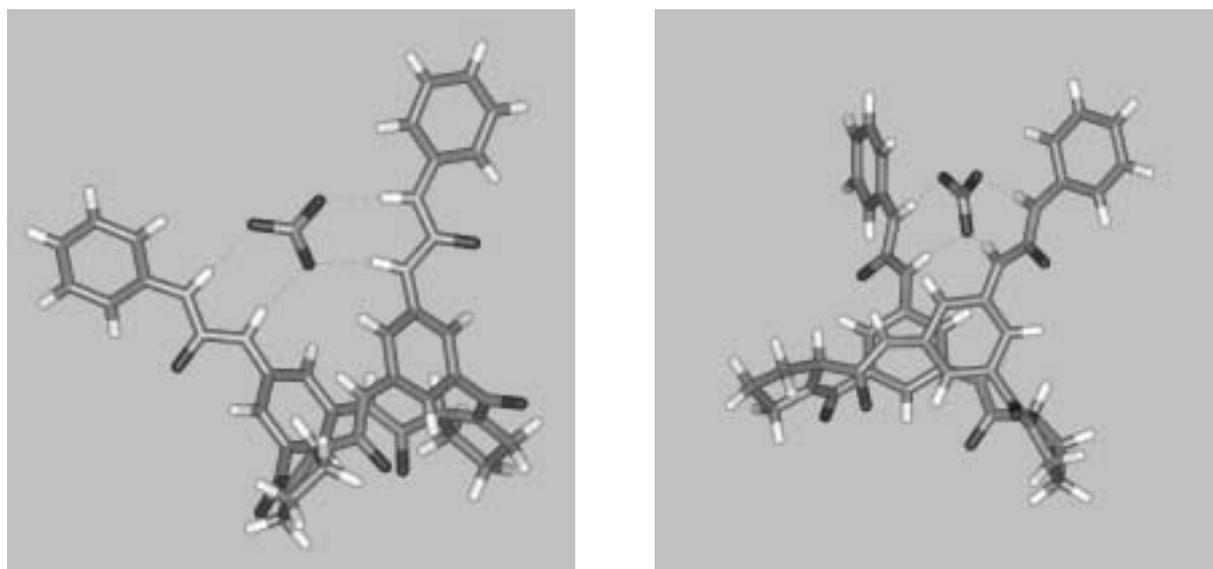
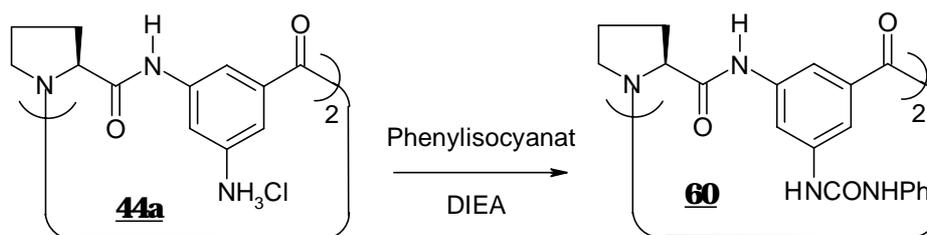


Abb. 2.32 Energieminimierter Komplex von cyclo-[(L)Pro-AB(5NHCONHPh)]₄, **60**-Nitrat, von vorne (links), von der Seite (rechts), (Cerius², Dreiding 2.21).

Die Synthese von **60** ist in Schema 2.24 dargestellt. Das Hydrochlorid desamins **44a** wurde nach Standardmethoden aus dem geschützten Derivat **44** erhalten. Unter Schutzgasatmosphäre wurde das Amin freigesetzt und direkt mit Phenylisocyanat in DMF umgesetzt. Das Produkt **60** wurde mit 64% Ausbeute als leicht gelblicher Feststoff analysenrein erhalten. Auch bei diesem Cyclopeptid konnte kein Einfluß der Substituenten auf die Struktur des Grundgerüsts festgestellt werden. Durch temperaturabhängige ¹H-NMR Spektroskopie wurde außerdem überprüft, ob die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen den beiden Harnstoffuntereinheiten in DMSO möglich ist. Die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung amidischer N-H Protonen in Cyclopeptiden ist nämlich ein guter Indikator dafür, ob die N-H Bindung in einer intramolekularen Wasserstoffbrücke involviert ist.



Schema 2.24

Synthese von *cyclo-[(L)Pro-AB(5-NHCONHPh)]₂*, **60**.

Im Falle einer stabilen intramolekularen Wasserstoffbrücke ist der Temperaturgradient $\Delta\delta/T$ der Resonanz eines N-H Protons in DMSO $< 3 \cdot 10^{-3}$ ppm/K, ansonsten beobachtet man einen Wert $\Delta\delta/T > 4 \cdot 10^{-3}$ ppm/K.⁵⁴ Bei **60** wurde der Temperaturgradient der Harnstoff N-H Protonen über einen Meßbereich von 18° C bis 100° C zu jeweils $3,7 \cdot 10^{-3}$ ppm/K bestimmt. Unter der Annahme, daß sich die empirischen Grenzwerte, die aus Temperaturgradienten für peptidische N-H Protonen ermittelt wurden, auf die Protonen am Harnstoff übertragen lassen, spricht der gefundene Temperaturgradient für eine schwache Wechselwirkung zwischen den gegenüberliegenden Harnstoffen. Eine Selbstassoziation des Cyclopeptides durch intermolekulare Wasserstoffbrücken wurde in DMSO ausgeschlossen: Die chemischen Verschiebungen im ¹H-NMR Spektrum der Verbindung zeigen im Konzentrationsbereich 2 - 0,02 mM keine Abhängigkeit von der Konzentration der Lösung.

Zur Untersuchung der Anionenaffinität von **60** wurde eine 2 mM Lösung des Peptids in d₆-DMSO hergestellt und die Änderung der chemischen Verschiebung der N-H Protonen nach Zugabe von einem Äquivalent verschiedener Anionen als Tetrabutylammoniumsalz beobachtet. Wird ein Anion durch Wasserstoffbrücken zu den Harnstoffprotonen gebunden, so sollte dies durch einen Tieffeldshift der N-H Signale im ¹H-NMR Spektrum sichtbar werden. Tabelle 2.9 faßt die Ergebnisse der Untersuchung zusammen.

Alle verwendeten Anionen verursachen in der Tat eine Tieffeldverschiebung der N-H Protonen. Dabei ist der Shift des N-H(2), das sich in 5-Position an der 3-Aminobenzoesäure befindet, stets etwas kleiner als der des N-H(1).

Anion	$\Delta\delta(\text{N-H}(1))$	$\Delta\delta(\text{N-H}(2))$
Iodid	+ 0,055 ppm	+ 0,054 ppm
Nitrat	+ 0,063 ppm	+ 0,061 ppm
Bromid	+ 0,087 ppm	+ 0,085 ppm
Acetat	+ 1,346 ppm	+ 1,321 ppm

Tabelle 2.9 Tieffeldshift der Signale der N-H Protonen nach Zugabe diverser Anionen in d_6 -DMSO.

Nun wurden vier Anionen unterschiedlicher Geometrie ausgewählt, um durch Job-Plots die Stöchiometrie der mit **60** gebildeten Komplexe zu untersuchen. Anhand der Stöchiometrie sollte sich unterscheiden lassen, ob der Gast wie gewünscht in einem 1:1 Komplexes pinzettenartig von beiden Bindungsarmen umfaßt wird, oder ob beide Harnstoffuntereinheiten unabhängig voneinander ein Anion binden, also ein $2_{\text{Gast}}:1_{\text{Wirt}}$ Komplex ausgebildet wird.

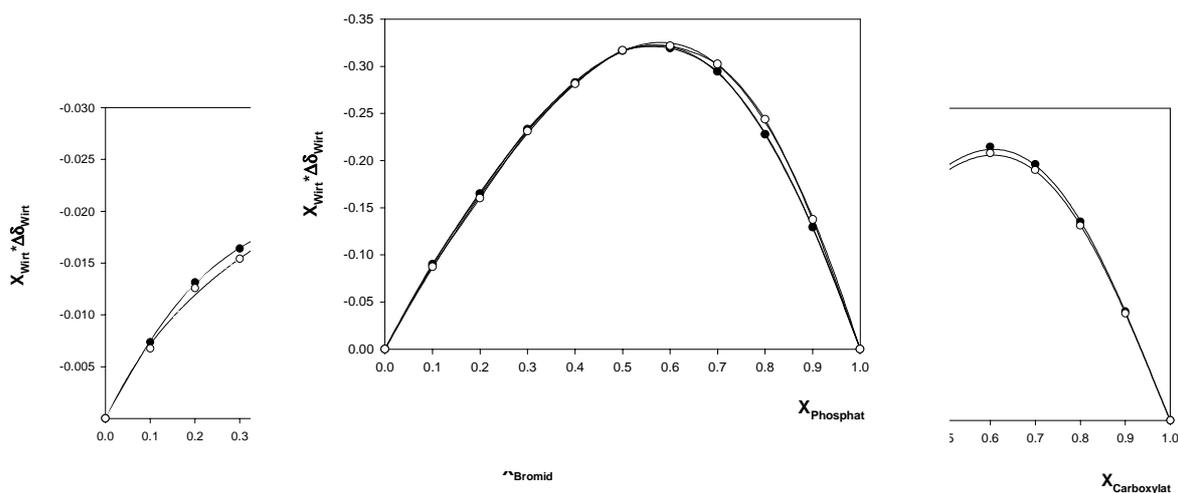


Abb. 2.33 Job-Plots von **60** mit Bromid (oben links), mit Benzoat (oben rechts) und mit Phosphat (unten).

Diese Job-Plots (Abb. 2.33) zeigten, daß alle untersuchten Anionen, also Bromid (sphärisch), Nitrat (trigonal planar), Phosphat (tetraedrisch) und Benzoat, eindeutig in DMSO $2_{\text{Gast}}:1_{\text{Wirt}}$

Komplexe mit **60** bilden. Auf den ersten Blick scheint dies klar darauf hinzudeuten, daß es sich bei **60** nicht um eine Pinzette handelt, sondern daß die Harnstoffuntereinheiten unabhängig als isolierte Bindungszentren agieren. Da ich aber zeigen konnte, daß das Peptidgrundgerüst der cyclischen Tetrapeptide auch ohne die Harnstoffsubstituenten fähig ist, mit Anionen zu wechselwirken, muß man die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß **60** das erste Anion durch kooperative Wechselwirkung mit den beiden Harnstoffsubstituenten komplexiert und das zweite Anion, wie es bei **28** und **49** beobachtet wurde, an die Peptid N-H Gruppen bindet. Einen Hinweis darauf gibt ein geringer Tieffeldshift des Peptid N-H Signals, der durch alle Anionen in unterschiedlichem Umfang hervorgerufen wird und auf eine veränderte Ausrichtung der Amidbindungen im Komplex, aber auch auf eine schwache Wasserstoffbrücke eines Anions zu den Amidprotonen zurückzuführen sein kann.

Wie die Untersuchungen an Tetrapeptid **28** gezeigt haben, kann eine Anionenkomplexierung an den Peptid N-H Protonen im NOESY-NMR Spektrum des Komplexes nachgewiesen werden. Ähnliches müßte für **60** ebenfalls möglich sein, denn auch in diesem Peptid müßten sich die Amidprotonen, wenn sie mit einem Anion wechselwirken, zum H(2) der Aminobenzoesäureeinheiten hin orientieren und dadurch eine Verstärkung des NOE Effektes zwischen dem H(2) und dem Amid N-H Proton bewirken. Um diese zu überprüfen wurden Anionen gewählt, die besonders stark mit dem Peptid wechselwirken, und zwar Benzoat und Phosphat. Es zeigte sich, daß das NOESY-NMR Spektrum von 2 mM **60** in DMSO durch Zugabe von 2 Äquivalenten der beiden Anionen keine signifikante Veränderung erfährt (Tabelle 2.10).

NOE-Effekte:	N-H _{Amid} zu H(4)	N-H _{Amid} zu H(2)	N-H _{Amid} zu H(α)	N-H _{Amid} zu H(β)
60	+ 16%	+ 3%	+ 8%	----
60 +Benzoat	+ 16%	+ 2%	+ 8%	----
60 +Phosphat	+ 16%	+ 2%	+ 8%	----

Tabelle 2.10 NOE-Effekte von **60** und **60**+Gast in DMSO.

Die Spektren geben also keinen Hinweis darauf, daß sich die Amid N-H Bindungen während der Anionenkomplexierung verstärkt zum H(2) hin ausrichten. Damit scheint es eher plausibel, daß beide Harnstoffuntereinheiten von **60** jeweils ein einzelnes Anion binden und **60** nicht als molekulare Pinzette wirkt. Um diese These zu erhärten, wurde das „einarmige“ Cyclopeptid **61** dargestellt (Abb. 2.34).

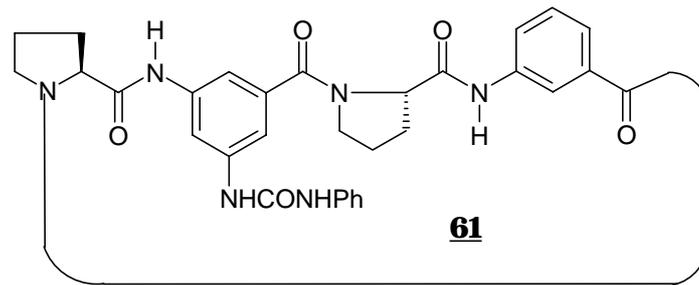
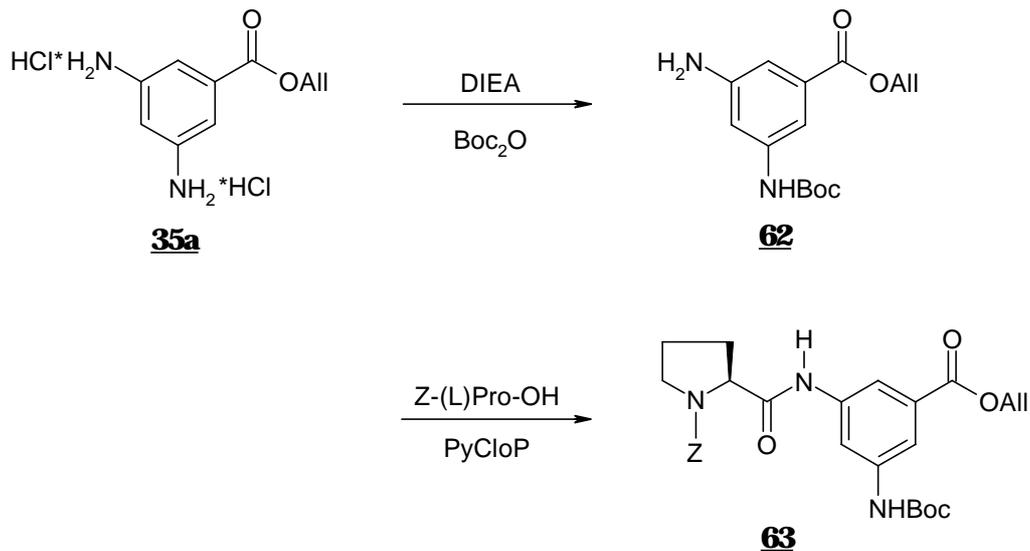
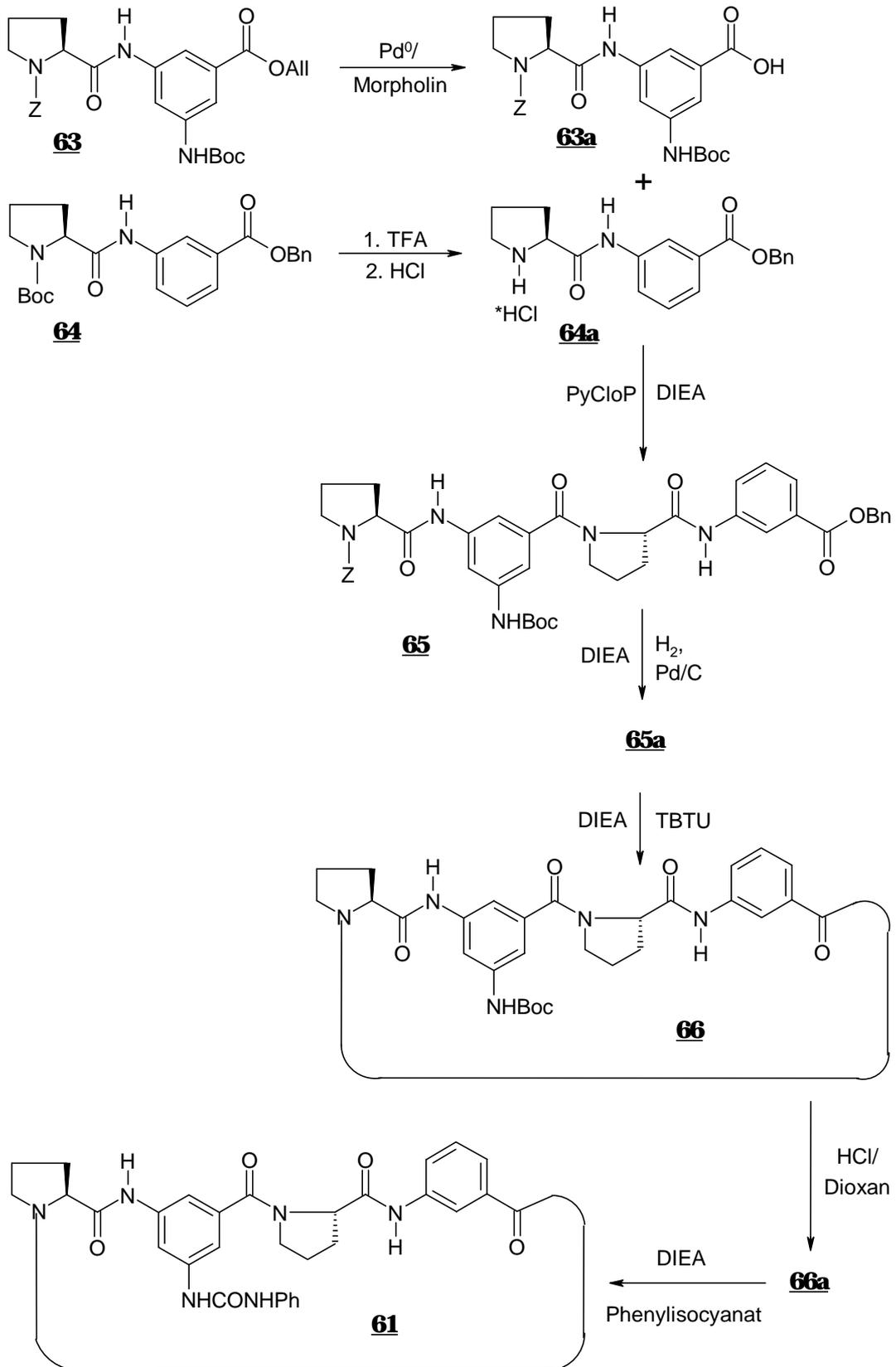


Abb. 2.34 Cyclopeptid *cyclo-[(L)Pro-AB(5-NHCONHPh)-(L)Pro-AB]*, **61**

Wenn die Anionenkomplexierung von **60**, wie vermutet, nur durch die Harnstoffuntereinheiten erfolgt, dann sollte **61** in DMSO 1:1 Komplexe bilden. Die Synthese des Peptids ist in Schema 2.25 und 2.26 beschrieben.



Schema 2.25 Darstellung des Dipeptides *Z-(L)Pro-AB(5-NHBoc)-OAll*, **63**.



Schema 2.26 Darstellung des Cyclopeptides cyclo-[*(L)*Pro-AB(5-NHCONHPh)-*(L)*Pro-AB], **61**.

Zunächst wurde das Dipeptid **63** aus Z-(L)Pro-OH und dem Allylester **35a** hergestellt, welcher bei den Untersuchungen zur Direktcyclisierung verwendet worden war. Im Unterschied zu **43** wurde bei **63** der Allylester statt des Benzylesters gewählt, um die Carbonsäure selektiv in Gegenwart des Benzylcarbamates entschützen zu können (Schema 2.25). Das entschützte Dipeptid **63a** wurde dann mit dem unsubstituierten Dipeptid **64a**, das nach der Methode von S. Kubik³¹ dargestellt und entschützt worden war, zum linearen Tetrapeptid **65** gekuppelt. Dieses konnte dann wieder in einem Schritt am N- und am C-Terminus entschützt und anschließend cyclisiert werden. Das Cyclopeptid **66** wurde dann genau wie **44** an der aromatischen Aminofunktion entschützt und direkt mit Phenylisocyanat umgesetzt. Das Produkt **61** kristallisierte aus Wasser/Methanol in feinen weißen Nadeln. Die Charakterisierung von **61** mittels ¹³C-, ¹H-NMR und NOESY Spektroskopie bestätigte die wesentlichen Strukturmerkmale von **44** auch bei diesem Tetrapeptid.

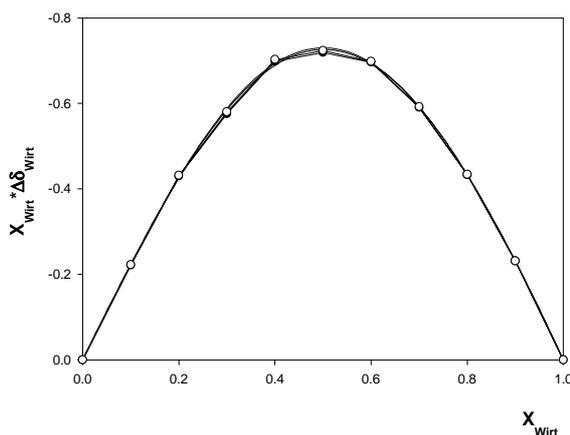


Abb. 2.35

Job-Plot von **61** mit Benzoat in DMSO.

Der Job-Plot von **61** mit Benzoat in DMSO (Abb. 2.35) zeigt eine eindeutige 1:1 Stöchiometrie des gebildeten Komplexes. Außerdem weist der große Tieffeldshift der Signale der Harnstoff N-H Protonen von + 2,3 ppm gegenüber dem kleinen Tieffeldshift der Signale der Peptid N-H Protonen von + 0,05 ppm darauf hin, daß das Anion durch Wasserstoffbrücken an den Harnstoff und nicht an das Peptid selbst gebunden wird. Für diese Untersuchungen habe ich das Benzoat gewählt, da dieses Anion von dem unsubstituierten Rezeptor **28** auch in DMSO noch über die Peptid N-H Bindungen gebunden wird. Wenn also das Benzoat von **61** nur über die Harnstoffuntereinheit gebunden wird, so ist es sehr

wahrscheinlich, daß auch andere Anionen nur an die Harnstoffbindungsarme in diesen cyclischen Tetrapeptiden und nicht an die Peptid N-H Gruppen gebunden werden.

Warum ist aber die 2:1 Stöchiometrie bei den Anionenkomplexen von **60** bevorzugt? Die Zahl der gebildeten Wasserstoffbrücken ist ja gegenüber der 1:1 Stöchiometrie nicht höher, dafür sind 2:1 Komplexe entropisch auf jeden Fall benachteiligt. Eine Antwort auf diese Frage kann eigentlich nur ein schlechter Fit der Gäste zwischen die beiden Bindungsarme des Rezeptors sein. Zur Komplexierung der untersuchten Anionen muß sich das Peptidscharnier möglicherweise so weit öffnen, daß keine wirksamen Wasserstoffbrücken zu den Harnstoffsubstituenten aufgebaut werden können. Diese Vermutung konnte ich durch Einbeziehung von Chlorid in meine Bindungsstudien bestätigen. Der Job-Plot mit Chlorid³ zeigt, daß das kleine Chloridanion tatsächlich einen 1:1 Komplex mit **60** bildet (Abb. 2.36). Die NMR Titration ergab eine Bindungskonstante $K_a = 145 \pm 40 \text{ M}^{-1}$ und einen maximalen Shift $\Delta\delta_{\text{max}} = + 1,51 \pm 0,39 \text{ ppm}$.

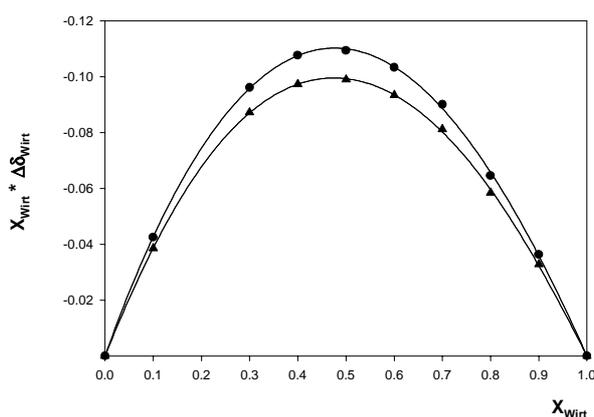


Abb. 2.36

Job-Plot von **60** mit Chlorid in DMSO.

Durch Job-Plots von **60** mit verschiedenen Dicarboxylaten (**67**, **68a-c**, **69**) (Abb. 2.37) habe ich versucht herauszufinden, ob das Cyclopeptid in der Lage ist, in einer weit geöffneten Form, entsprechend etwa einer Konformation wie der in der Kristallstruktur von **28** (Abb. 2.7), bidentate Anionen zu binden.

[3] Von einer Untersuchung mit Tetrabutylammoniumfluorid wurde abgesehen, da dieses Salz extrem hygroskopisch und daher sehr schwer zu handhaben ist.

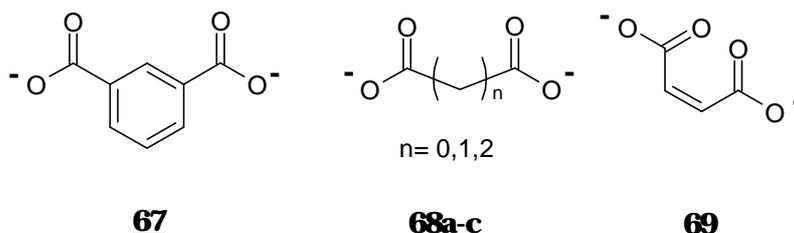


Abb. 2.37

Untersuchte Dicarboxylate.

In so einer Konformation, in der die beiden aromatischen Untereinheiten einen Winkel von über 100° zueinander einnehmen, ist durch den großen Abstand der Harnstoffsubstituenten zueinander eine kooperative Wechselwirkung der beiden Bindungsarme mit einem einzelnen Anion sicherlich nicht möglich. Ein Gast, der ebenfalls zwei räumlich isolierte Bindungszentren besitzt, die durch einen geeigneten Spacer miteinander verbunden sind, könnte also zur kooperativen Bindung an beide Harnstoffuntereinheiten eines Cyclopeptides geeignet sein. Die Gäste **67** – **69** bilden jedoch ebenfalls $2_{\text{Gast}}:1_{\text{Wirt}}$ Komplexe mit **60**, weil das Peptidgerüst offensichtlich einen Fit beider Bindungszentren an ein einziges Gastmolekül nicht gestattet.

Mit der direkten Anbringung der Harnstoffsubstituenten an die aromatischen Untereinheiten des Cyclopeptidgerüsts habe ich also nicht die gewünschte Selektivität für trigonale und tetragonale Anionen erreicht. Wahrscheinlich wird eine optimale Ausrichtung der Harnstoff N-H Bindungen zur Ausbildung kooperativer Wasserstoffbrücken auf Grund eines ungünstigen Öffnungswinkels zwischen den aromatischen Untereinheiten verhindert.

Molecular Modeling Studien (ChemDraw3D, PM3) zeigten jedoch, daß der Einbau einer rotierbaren Bindung zwischen dem aromatischen Ring und dem Harnstoff den Bindungsarmen einen zusätzlichen Rotationsfreiheitsgrad gibt, der es möglich machen sollte, den ungünstigen Winkel, den die Öffnung des Peptidscharniers zwischen den gegenüberliegenden Harnstoff N-H Bindungen verursacht, zu kompensieren. Um auf diese Weise die Anpassungsfähigkeit der Harnstoff-Bindungsarme an eine bestimmte Gastgeometrie zu verbessern, habe ich in Cyclopeptid **70** einen Methylenspacer zwischen Makrocyclus und Bindungszentrum als zusätzliches Gelenk eingebaut (Abb. 2.38).

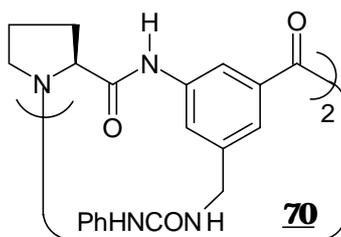


Abb. 2.38

*Cyclopeptid cyclo-[(L)Pro-AB(5-CH₂NHCONHPh)]₂, **70**.*

Abbildung 2.39 zeigt die energieminierte Struktur von **70** mit Benzoat. Die darin vorliegenden gegabelten N-H·····O Wasserstoffbrücken wurden bereits von Anslyn et al. in der Festkörperstruktur eines Acetatkomplexes mit einem Cyclophanrezeptor nachgewiesen.³⁸

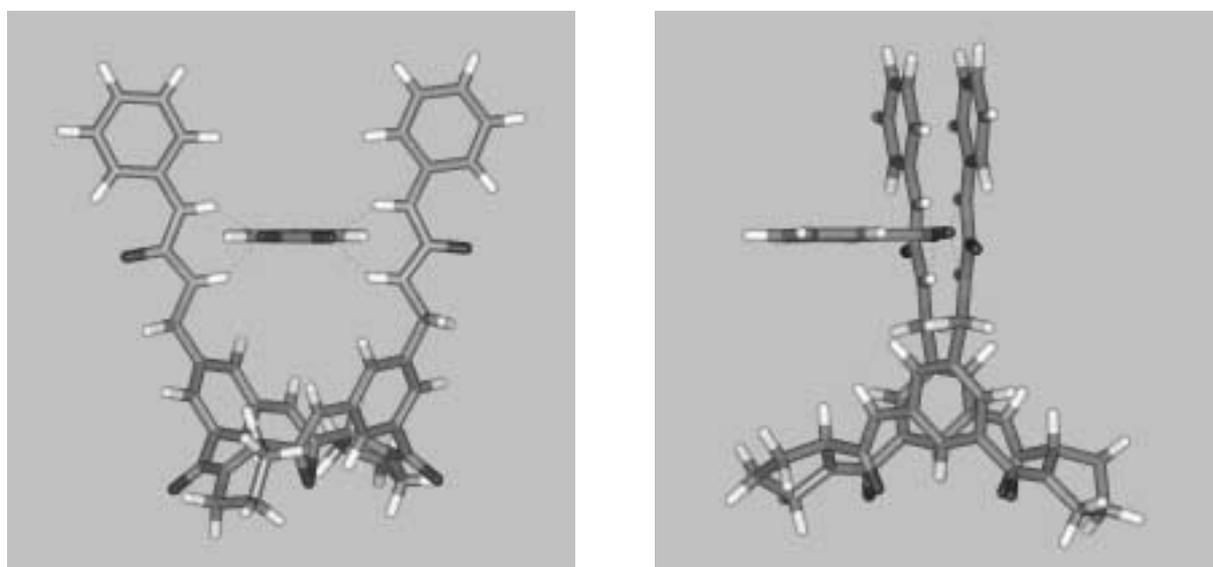
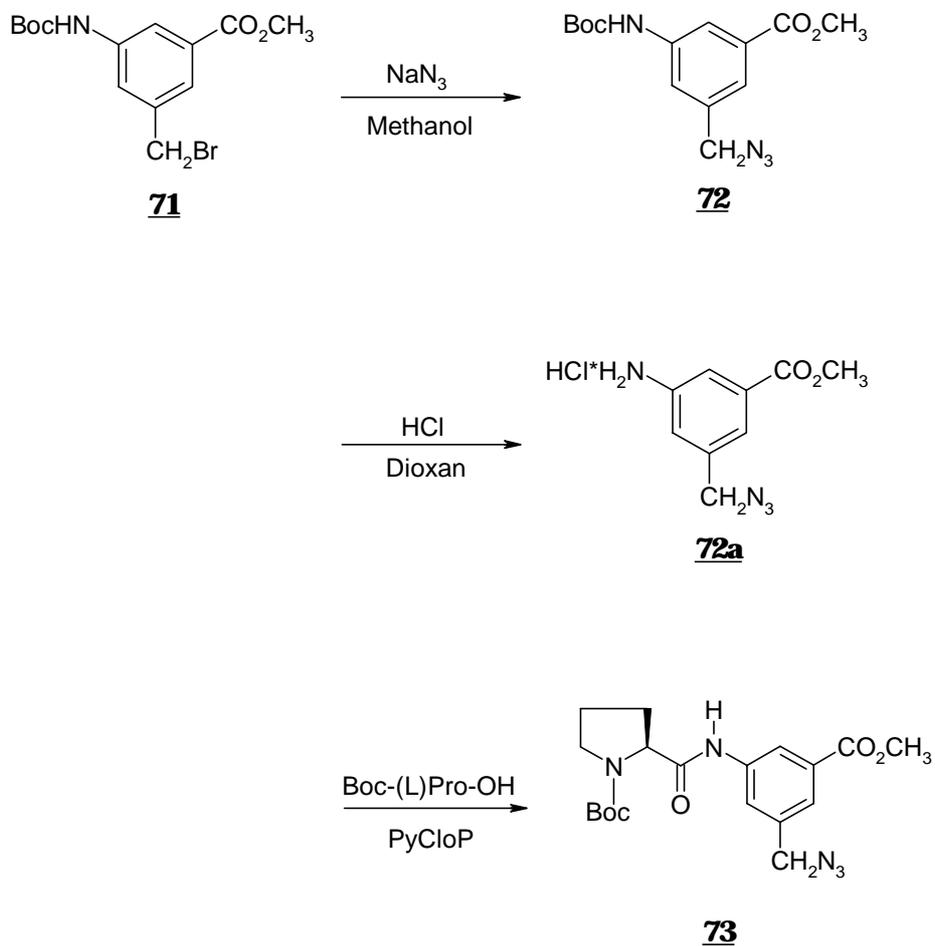


Abb. 2.39

*Energeminimierte Struktur des Komplexes von **70** mit Benzoat (ChemDraw3D, PM3).*

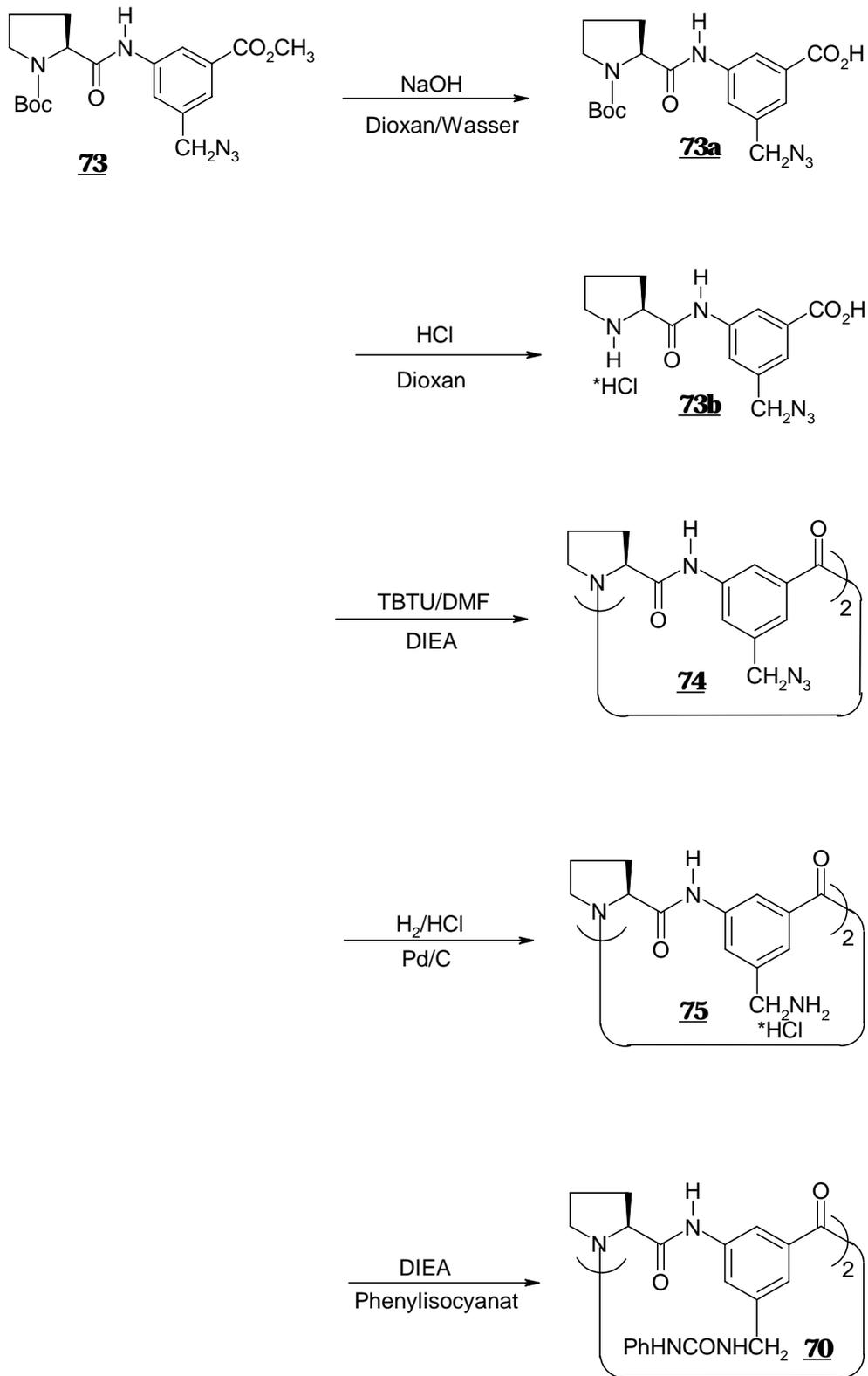
Die Synthese von **70** ist in Schema 2.27 und 2.28 dargestellt. Das Bromid **71** habe ich ausgehend von 2-Iod-3-methyl-5-nitrobenzoesäure, die mir freundlicherweise von D. Kubik zur Verfügung gestellt wurde, nach einer von S. Kubik entwickelten Methode dargestellt. Durch Umsetzung mit Natriumazid in trockenem Methanol wurde das Bromid zum Azid **72** umgesetzt. Dann wurde das Azid entschützt und mit Boc-(L)Pro-OH zum Dipeptid **73** gekuppelt. Dieses wurde nach Standardmethoden vollständig entschützt und unter den Bedingungen der Direktcyclisierung zum Tetrapeptid **74** cyclisiert. Das Azid **74** wurde dann unter einer Wasserstoffatmosphäre in Methanol mit einem Äquivalent Salzsäure zum Amin hydriert, das Amin als Hydrochlorid **75** isoliert und sofort mit Phenylisocyanat zum Produkt

70 umgesetzt. Die Gesamtausbeute der Synthese war recht unbefriedigend, was vor allen Dingen auf die schlechte Ausbeute der ersten und der letzten Stufe zurückzuführen ist. Aus Zeitgründen wurde die Synthese allerdings nicht weiter optimiert.



Schema 2.27

Darstellung von Boc-(L)Pro-AB(5-CH₂N₃)-OMe, **73**.



Schema 2.28

Darstellung von cyclo-[(L)Pro-AB(5-CH₂NHCONHPh)]₂, **70**.

Mit den geringen Mengen erhaltenen Produktes **70** konnten erste Bindungsstudien durchgeführt werden. Eine Charakterisierung des Produkts mittels ^{13}C -, ^1H -NMR und NOESY Spektroskopie zeigte, daß sich die relative Anordnung der Bindungen in **70** nicht von den anderen cyclischen Tetrapeptiden unterscheidet: An den tertiären Amidien liegt die *cis* Konformation vor und die NOE Effekte sprechen für eine relative Anordnung der Bindungen zueinander, wie sie bis jetzt bei allen anderen Tetrapeptiden auf Basis von 3-Aminobenzoessäure gefunden wurde.

Um zu überprüfen, ob **70** fähig ist, in der gewünschten Weise als molekulare Pinzette zu agieren, wurden Job-Plots unter Verwendung von Benzoat bzw. Bromid in DMSO aufgenommen. Als Gegenion wurde wie immer das Tetrabutylammoniumion eingesetzt. Dabei ergab sich, daß **70** im Gegensatz zu **60** mit Benzoat eindeutig einen 1:1 Komplex bildet (Abb. 2.40). Die Stabilitätskonstante wurde in DMSO zu $K_a = 740 \pm 50 \text{ M}^{-1}$ bestimmt. Diese Bindungskonstante ist um den Faktor 10 größer als die entsprechende Bindungskonstante des Komplexes zwischen dem unsubstituierten Tetrapeptid **28** und Benzoat im gleichen Lösungsmittel.

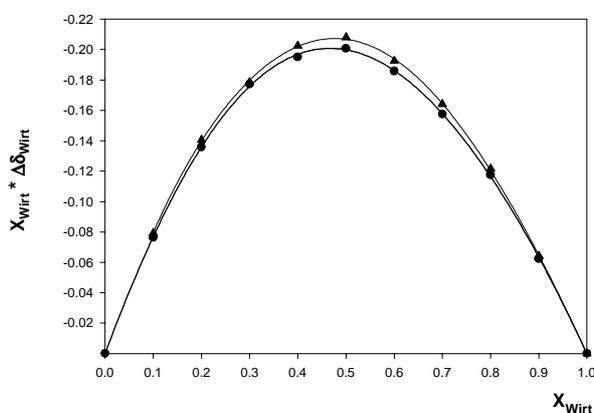


Abb. 2.40

Job-Plot von **70** mit Benzoat in DMSO.

Die Untersuchung mit Bromid zeigte dagegen keinerlei Wechselwirkung zwischen Anion und Rezeptor: Die chemischen Verschiebungen der N-H Protonen im ^1H -NMR Spektrum des Cyclopeptides blieben bei kontinuierlicher Gastzugabe unverändert. Diese Beobachtung war erstaunlich. Wenn Rezeptor **60**, der nicht in der Lage ist, Bromid in einem 1:1 Komplex durch kooperative Wasserstoffbrücken zu binden, dennoch eine deutlich meßbare Wechselwirkung

mit Bromid zeigt, warum sollte dieser Effekt bei **70** nicht auftreten? Selbst wenn die Geometrie der Harnstoffpinzette eine kooperative Bindung des sphärischen Bromids durch beide Bindungsarme nicht zuläßt, sollte eine Wechselwirkung des Bromids mit den einzelnen Harnstoffuntereinheiten immer noch möglich sein, es sei denn, die Harnstoffe sind z. B. durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke derart fixiert, daß sie für eine solche Wechselwirkung mit dem Anion nicht mehr zur Verfügung stehen.

Durch temperaturabhängige $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie wurde daher überprüft, ob die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen den beiden Harnstoffuntereinheiten, wie in Abbildung 2.41 dargestellt, in DMSO auftritt.

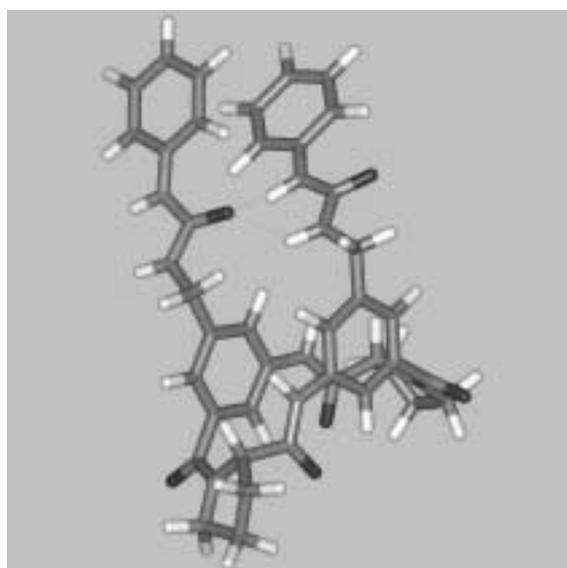


Abb. 2.41 Intramolekulare Wasserstoffbrücke in Cyclopeptid **70**, berechnet mit ChemDraw3D, PM3.

Im Vergleich zu Cyclopeptid (**60**), in dem der Methylenspacer zwischen den Harnstoffen und den aromatischen Untereinheiten fehlt, sprechen die Meßdaten bei **70** eindeutig für eine intramolekulare Wasserstoffbrücke an den Harnstoff N-H Protonen: Der Temperaturgradient der Harnstoff N-H Protonen wurde über den gleichen Meßbereich zu $2,3 \cdot 10^{-3}$ ppm/K für das benzyliche Amid und zu $1,4 \cdot 10^{-3}$ ppm/K für das aromatische Amid bestimmt. Da IR-spektroskopische Untersuchungen in diesem Lösungsmittel nicht möglich waren, konnte leider nicht nachgewiesen werden, daß auch die Carbonylfunktion des Harnstoffs an dieser Wasserstoffbrücke partizipiert. Die Geometrie des Rezeptors läßt allerdings eine intramolekulare Wasserstoffbrücke mit einer anderen Carbonylfunktion nicht zu, so daß die wasserstoffverbrückte Struktur in Abbildung 2.41 als die plausibelste erscheint.

Kann man auf Grund dieser Befunde mit Sicherheit sagen, daß Rezeptor **70** tatsächlich als molekulare Pinzette für Benzoat agiert? Es wäre immerhin denkbar, daß sich das Benzoat zum Beispiel ohne vorherigen Bruch der intramolekularen Wasserstoffbrücke in **70** an die freien N-H Bindungen der einen Harnstoffuntereinheit anlagert, wie in Abbildung 2.42 dargestellt ist. Die Bindung des Anions durch **70** wäre dann genausowenig kooperativ wie die durch **60**. In diesem Fall wäre aber nicht verständlich, warum eine analoge Wechselwirkung von Bromid mit den Harnstoffsubstituenten überhaupt nicht auftritt. Die Untersuchungen mit Rezeptor **60** haben schließlich gezeigt, daß eine einzelne Harnstoffuntereinheit in DMSO Bromid durchaus binden kann. Eine plausible Erklärung für die beobachtete Wechselwirkung von **70** mit Benzoat wäre also, daß die intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen den beiden Harnstoffuntereinheiten zur Erkennung dieses Anions aufgebrochen wird.

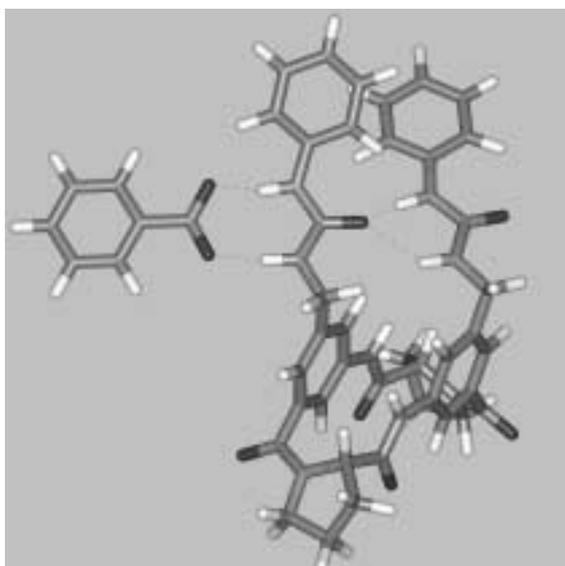


Abb. 2.42 Alternative Geometrie des Komplexes von **70** mit Benzoat (ChemDraw3D, PM3).

Einen starken Hinweis hierauf gibt die Verbreiterung des Signals des Methylenspacers während der Benzoatkomplexierung (Abb. 2.43). Vor Zugabe des Benzoats beobachtet man im Spektrum von **70** für die beiden diastereotopen CH₂ Protonen ein AB System, in dem jede Linie auf Grund der Kopplung zum N-H Proton aufgespalten ist. Bei Zugabe des Benzoats fallen die acht Linien mehr und mehr zusammen und werden gleichzeitig zu hohem Feld verschoben. Ein ähnliches Bild beobachtet man bei Temperaturerhöhung einer Lösung von **70** ohne Gastzugabe. Bei 50° C ist die Aufspaltung der Signale mit dem Spektrum von **70** mit 5 Äquivalenten Gast identisch, bei 100° C stimmt sie mit dem Spektrum mit 10 Äquivalenten Gast überein. Die Zugabe des Benzoats hat also den gleichen Effekt wie die Erhöhung der

Temperatur: Die Wasserstoffbrücke zwischen den Harnstoffen wird gelöst und die Rotation um die CH₂-Gruppe damit erleichtert.

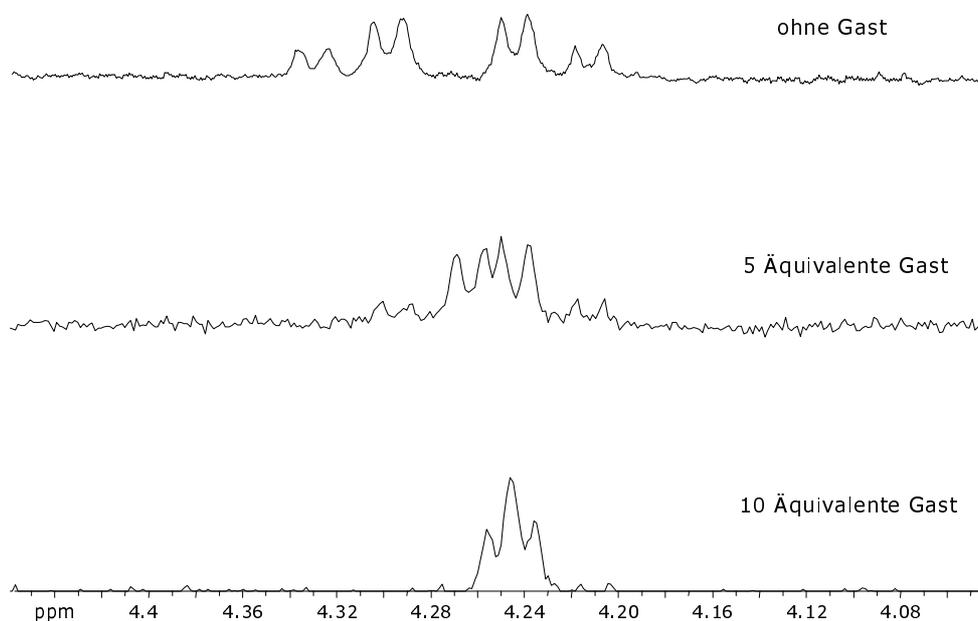


Abb. 2.43 Veränderung des Signals der CH₂ Gruppe von **70** im ¹H-NMR Spektrum bei Zugabe von Benzoat.

Da die Bindungsenergie des Bromids offensichtlich den Energieaufwand zum Aufheben der Wasserstoffbrücke nicht kompensieren kann, findet mit diesem Anion keine Wechselwirkung statt. Das basischere Benzoat dagegen wird stark genug gebunden, um ein Aufbrechen der Wasserstoffbrücke zu ermöglichen.

Damit konnte ich zeigen, daß Cyclopeptid **28** als Grundgerüst für den Aufbau molekularer Pinzetten verwendet werden kann. Eine entscheidende Voraussetzung dafür ist jedoch ein genügendes Spiel zwischen den angebrachten Bindungsarmen und dem Peptidgerüst, das ich in **70** durch Einführung der Methylengruppen zwischen den aromatischen Peptiduntereinheiten und den Harnstoffsubstituenten erreichte.

3 Zusammenfassung und Ausblick

In unserer Gruppe beschäftigen wir uns mit der Entwicklung neuer makrocyclischer Rezeptoren, die aus natürlichen α -Aminosäuren und verschiedenen 3-Aminobenzoesäurederivaten in alternierender Sequenzen aufgebaut sind. Durch gezielte strukturelle Veränderungen am Grundgerüst dieser synthetischen Cyclopeptide ist es uns gelungen, Rezeptoren für sehr unterschiedliche Gäste zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich zunächst mit der Frage befaßt, inwieweit durch Einbau des starren, cyclischen 2*S*-Aminosuccinimid als natürlichem Baustein in das cyclische Hexapeptid **8** (Abb. 3.1) die Rigidität des Makrocyclus erhöht werden kann und ob sich dadurch die Rezeptoreigenschaften gegenüber Cyclopeptiden mit weniger starren Bausteinen verbessern lassen. Dabei ist es mir gelungen, eine Methode zu entwickeln, mit der der Dipeptidgrundbaustein **9** (Abb. 3.1) dieses Cyclopeptides enantiomerenrein hergestellt werden kann. Aus diesem Grundbaustein habe ich das Cyclopeptid **8** sequentiell aufgebaut. Allerdings ist **8** so stark gespannt, daß es sich bereits bei der Aufreinigung auf Kieselgel zersetzt und sich dadurch einer weiteren Aufreinigung entzog.

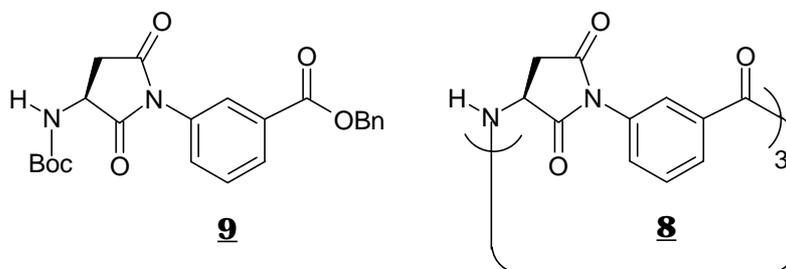


Abb. 3.1 Dipeptid **9** und Cyclopeptid **8** mit 2*S*-Aminosuccinimid als natürlichem Baustein.

Durch die von mir entwickelte „Direktcyclisierung“ habe ich dann die in unserer Gruppe entwickelte Peptidsynthese vereinfachen können: Bisher wurden die cyclischen Hexapeptide aus dem Dipeptid über das lineare Tetra- und das Hexapeptid sequentiell aufgebaut. Mir ist es gelungen, cyclische Hexapeptide aus (L)Prolin und verschiedenen 3-Aminobenzoesäurederivaten direkt aus dem Dipeptid unter den üblichen Kupplungsbedingungen der Peptidsynthese herzustellen und die Synthese damit deutlich zu verkürzen. Unter den Bedingungen dieser Direktcyclisierung konnte ich darüber hinaus

erstmals die Bildung prolinhaltiger cyclischer Octapeptide nachweisen. Vor allem aber habe ich zum ersten Mal zeigen können, daß die Darstellung cyclischer Tetrapeptide mit starren aromatischen Untereinheiten möglich ist. Diese kleinen Makrocyclen unterscheiden sich deutlich in ihrer Struktur und ihren Rezeptoreigenschaften von ihren größeren Analoga:

- Im Gegensatz zu den bis dahin bekannten Hexapeptiden erzwingt der kleinere und gespanntere Makrocyclus an den tertiären Amididen die *cis* Konformation.
- Auf Grund des verkleinerten Hohlraums sind die Tetrapeptide reine Anionenrezeptoren, also zur Komplexierung von Alkylammoniumionen im Gegensatz zu den größeren Hexapeptiden nicht in der Lage.

Die Anionenaffinität des einfachen Tetrapeptids **28** (Abb. 3.2) aus (L)Prolin und 3-Aminobenzoesäure habe ich in Chloroform eingehend untersucht und konnte nachweisen, daß **28** Anionen nicht nur nach ihrer Basizität, sondern auch nach ihrer Größe und Geometrie unterscheiden kann. Dabei wurde in Chloroform folgende Reihenfolge der Komplexstabilität beobachtet: I^- (470 M^{-1}) < NO_3^- < Br^- < Tosylat < Cl^- < Hydrogensulfat \ll Benzoat < Dihydrogenphosphat < Phenylphosphonat (80.000 M^{-1}). In dem kompetitiven Lösungsmittel DMSO ist die Anionenaffinität deutlich geringer.

Eine Analyse der Geometrie der Anionenkomplexierung von **28** durch 2D-NMR Spektroskopie zeigte, daß sich zur Komplexierung eines Anions die N-H Amidbindungen zum H(2) der aromatischen Untereinheiten ausrichten. Tetrapeptid **28** ist allerdings in Lösung nicht in dieser zur Anionenerkennung geeigneten Konformation präorganisiert. Eine solche Präorganisation habe ich bei Cyclopeptid **49** (Abb. 3.2) durch Einbau von 6-Aminopicolinsäure als aromatischen Baustein erreichen können und damit die Anionenaffinität im Vergleich zu **28** in DMSO deutlich verbessert.

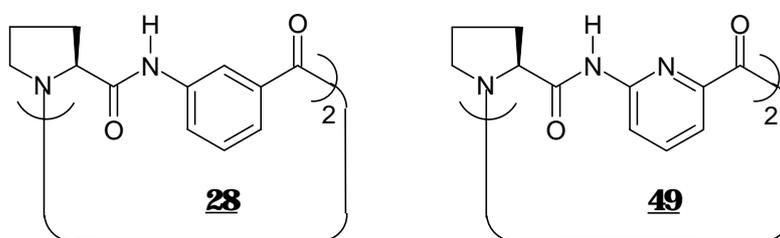


Abb. 3.2 Cyclische Tetrapeptide mit verschiedenen aromatischen Untereinheiten.

Benzoat und Dihydrogenphosphat werden von **49** z.B. mit Bindungskonstanten im Bereich 10^2 - 10^3 M^{-1} komplexiert. In Chloroform dagegen erschwert eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen den Amidprotonen und den lone pairs der gegenüberliegenden

Pyridylstickstoffatome in **49** eine optimale Ausrichtung der Amidbindungen (Abb. 2.19). Die Anionenaffinität von **49** ist deswegen in Chloroform deutlich schwächer als die von **28**.

Durch Analyse der Struktur und der Flexibilität der cyclischen Tetrapeptide in Lösung habe ich zeigen können, daß diese Cyclopeptide relativ starr sind: Nur die aromatischen Ringe bewegen sich frei zwischen den Peptidbrücken, während die Anordnung der anderen Bindung zueinander recht fixiert ist. Man kann diese cyclischen Tetrapeptide also als eine Art Scharnier betrachten, in dem die aromatischen Untereinheiten auf und zu klappen können (Abb. 2.26). Durch Anbringen von Harnstoffresten als zusätzliche Bindungsarme an den Aminobenzoesäureuntereinheiten konnte ich zeigen, daß sich diese Grundstruktur demzufolge als Grundgerüst zur Darstellung molekularer Pinzetten eignet.

Das zuerst untersuchte Cyclopeptid **60** (Abb. 3.3) umfaßt das Chloridanion wie eine Pinzette. Alle größeren Anionen werden allerdings als $2_{\text{Gast}}:1_{\text{Wirt}}$ Komplexe gebunden. Da nämlich der Öffnungswinkel zwischen den aromatischen Untereinheiten in **60** unmittelbar auf die Bindungsarme übertragen wird, ist bei allen Anionen, für deren Komplexierung ein größerer Öffnungswinkel der aromatischen Untereinheiten notwendig ist, eine optimale Anordnung der Wasserstoffbrücken um den Gast, die eine kooperative Bindung beider Harnstoffsubstituenten erlaubt, nicht möglich.

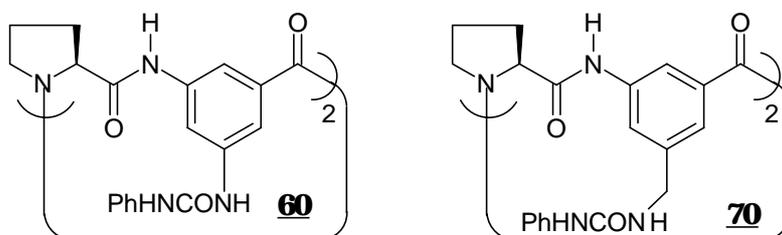


Abb. 3.3 Cyclische Tetrapeptide mit Harnstoffsubstituenten.

Durch Einbau eines Methylenspacers als zusätzliches Gelenk habe ich in Cyclopeptid **70** (Abb. 3.3) eine optimale Anordnung der Wasserstoffbrücken aber auch bei einem größeren Öffnungswinkel zwischen den aromatischen Untereinheiten ermöglicht. Dieser Rezeptor bindet Benzoat in der in Abbildung 3.4 illustrierten Art und Weise mit einer Bindungskonstante von 740 M^{-1} in DMSO. Diese Bindungskonstante ist um den Faktor 10 größer als die des einfachen Tetrapeptides **28** mit Benzoat in DMSO. Dabei bindet **70** selektiv nur Anionen, die bessere Wasserstoffbrückenakzeptoren sind als Harnstoff selbst, da die

selbstkomplementären Harnstoffuntereinheiten im freien Rezeptor in einer intramolekularen Wasserstoffbrücke gebunden sind.

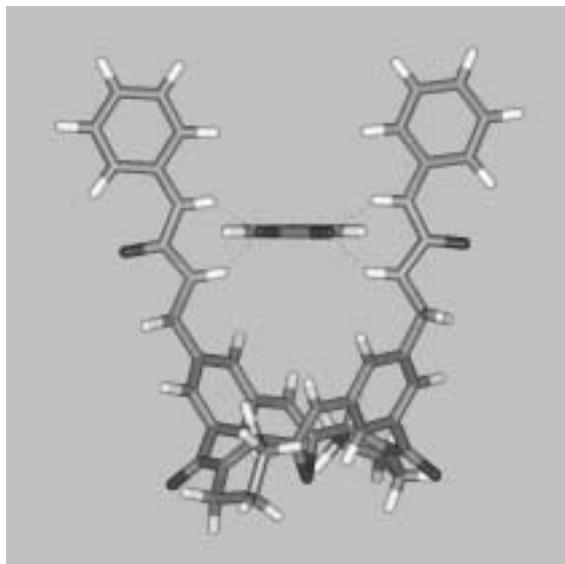


Abb. 3.4

Molekulare Pinzette 70-Benzoat

Ausgehend von den von mir entwickelten funktionalisierten cyclischen Tetrapeptiden lassen sich in Zukunft sicherlich noch weitere interessante Pinzettenmoleküle darstellen, etwa durch Einführen von kurzen Peptidarmen⁷⁴, Zuckerresten⁷⁵ oder Boronsäuren⁷⁶ als Bindungszentren. Dabei wäre auch ein kombinatorischer Ansatz denkbar. Aufbauend auf dem zu 44 analogen Hexapeptid 45 können zu vergleichenden Studien auch die entsprechenden dreiarmligen Rezeptoren mit den gleichen Bindungszentren hergestellt werden. Auch die weitere Untersuchung der von mir vorgestellten Zuckerrezeptoren mit Cholsäureuntereinheiten ist sicherlich erfolgversprechend, wenn es gelingt, die Löslichkeit des Rezeptors 55 (Abb. 2.29) in Chloroform durch Einführen unpolarer Reste zu erhöhen.

Ich habe also in dieser Arbeit das vielseitige Potential solcher cyclischen Tetrapeptide aus (L)Prolin und 3-Aminobenzoensäuren aufzeigen können und damit den Grundstein für weitere Untersuchungen mit diesen neuen Rezeptoren gelegt.

4 Experimenteller Teil

4.1 Allgemeines

Apparatives

¹ H-NMR-Spektroskopie:	Bruker DRX 500 (500 MHz) Varian VXR 300 (300 MHz)
¹³ C-NMR-Spektroskopie:	Bruker DRX 500 (125,7 MHz) Varian VXR 300 (75,4 MHz)
IR-Spektroskopie:	Bruker Vektor 22 FT-IR
Massenspektrometrie:	Varian MAT 8200 (FAB) Bruker Daltonics 3000 Esquire (ESI)
C, H, N-Elementaranalyse:	Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf
Schmelzpunktbestimmung:	Schmelzpunktapparatur Büchi 510
Drehwertbestimmung:	Perkin Elmer 241 MC Polarimeter
Säulenchromatographie:	Kieselgelsäulen: Kieselgel 60 (230-400 Mesh ASTM) von Merck RP-Säulen: Lobar® Fertigsäule von Merck, Größe B (310-25) Lichroprep®, RP-8 (40-63µm)

HPLC: Waters 600E Multisolvent Delivery System
Waters 486 UV Absorbance Detektor
Chiralcel OD

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminiumfolie (Merck)
RP-8 F₂₅₄ auf Glasträger (Merck)

Chemikalien

Acros: Benzylalkohol
N,N-Dimethylaminopyridin
Palladium auf Aktivkohle
p-Toluolsulfonylchlorid

Aldrich: Allylbromid
DIEA
Isophthalsäure
Kaliumhexafluorophosphat
Tetrabutylammoniumhydroxid 1M in Methanol
Tetramethylsilan

Bachem: O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU)

Eurisotop: CDCl₃
d₆-Dimethylsulfoxid
D₂O
d₇-DMF
d₄-Methanol
d₁-Trifluoressigsäure

Fluka: 3-Aminobenzoessäure
Celite® Filter Gel
Isopropanol, p.A.
Natriumbisulfit
Phosphorpentachlorid
Salzsäure, rauchend (37%)

	Trifluoressigsäure
Grüssing:	Natriumsulfat
	Triethylamin
Janssen Chimica:	p-Toluolsulfonsäure Monohydrat
Merck:	Benzylbromid
	Chlorameisensäurebenzylester 50% in Toluol
	3,5-Diaminobenzoessäure
	DMF, p.A.
	Di-tert.-butyldicarbonat
	Kaliumhydrogensulfat
	Natriumazid
	Natriumcarbonat
	Natriumhydrogencarbonat
	Pyrrolidin
	Phenylisocyanat
Nova Biochem:	alle verwendeten α -Aminosäuren
Riedel-de Haën:	Natriumdisulfit
	Phosphoroxidchlorid

Neben TBTU wurde auch PyCloP als Kupplungsreagenz verwendet, das nach der Methode von Coste, Frérot und Jovin⁷⁷ aus Py₃PO⁷⁸ hergestellt wurde. Der Benzylester der 3-Aminobenzoessäure (**10**) wurde als Tosylat nach der Methode von S. Kubik hergestellt.³⁰

Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Die Lösungsmittel, die trocken benötigt wurden, sind nach den literaturbekannten Standardmethoden getrocknet worden.

Gäste für Wirt-Gast Experimente

Alle Glukoside wurden bei Aldrich gekauft mit Ausnahme von α -D-Octylglucosid, das bei Cerestar erworben wurde. Auch die einfachen Tetrabutylammoniumsalze wurden bis auf das Sulfat und das Benzoat, die bei Fluka erhältlich waren, bei Aldrich gekauft. Selber hergestellt habe ich die Salze der mehrfach geladenen Anionen PhPO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} und der Dicarboxylate. Dafür wurde eine exakte Menge des einfachen Salzes, oder bei den Dicarbonsäuren, der freien Säure eingewogen und mit genau einem oder zwei Äquivalenten Tetrabutylammoniumhydroxid als 1M Lösung in trockenem Methanol versetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mehrfach in trockenem Methylenchlorid aufgenommen und erneut zur Trockne eingeengt. Der Feststoff wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend mit soviel d_6 -DMSO aufgefüllt, daß eine Lösung mit 1 μmol Salz/10 μl erhalten wurde. Zum Ansetzen der Stammlösungen für die NMR-Experimente wurde dann die benötigte Menge in einer Hamilton Mikroliterspritze abgemessen und mit dem entsprechenden Lösungsmittel aufgefüllt. Die Konzentration der Salzlösung war so hoch gewählt, daß in den Stammlösungen mit d_6 -DMSO/ CDCl_3 Mischungen ein DMSO Gehalt von 2,5% durch die Salzlösung nicht überschritten wurde.

Die Gäste zur Kationenerkennung waren käuflich nicht erhältlich. Das *N*-Butyltrimethylammoniumpikrat wurde mir freundlicherweise von S. Kubik überlassen, das *N*-Methylpyridiniumpikrat habe ich aus dem *N*-Methylpyridiniumiodid hergestellt, welches ich zuvor nach der Methode von Kosover⁷⁹ synthetisiert hatte. Die Überführung in das Pikrat erfolgte mit Silberoxid und Pikrinsäure in wäßrigem Methanol. Zur Reinigung wurde das Pikrat mit wenig Methanol in Chloroform gelöst und mit Ether in der Siedehitze zur Kristallisation gebracht.

4.2 NMR-Experimente

Alle NMR-Experimente wurden mit dem Bruker DRX 500 (500 MHz) in CDCl_3 durchgeführt. Für die NMR-Titrationen⁵⁹ wurden jeweils zwei Stammlösungen angesetzt: Die Stammlösung I enthielt die Verbindung, deren Protonen während der Titration beobachtet werden sollten. Von dieser Verbindung wurde eine Lösung erstellt, die 1 μmol der Verbindung auf 1 ml Lösungsmittel enthielt. Bei allen Titrationen zur Anionenerkennung war

dies das Cyclopeptid, bei den Titrationsen mit Zuckern oder Alkylammoniumionen war dies der jeweilige Gast. Stammlösung II enthielt dann das jeweilige Anion oder bei den Titrationsen zur Kationen- und Kohlenhydraterkennung das jeweilige Cyclopeptid. Diese zweite Lösung wurde mit einer Konzentration von 0,5 μmol , 1 μmol oder 2 μmol der Verbindung pro 800 μl Lösungsmittel angesetzt, je nachdem, ob bis 5, 10 oder 20 Äquivalente titriert werden sollte. War das Lösungsmittel eine Mischung aus mehreren Komponenten, so wurde eine dritte Stammlösung mit dem Lösungsmittelgemisch hergestellt. Alle drei Stammlösungen enthielten stets das gleiche Lösungsmittel oder das gleiche Lösungsmittelgemisch, nur die Stammlösung I enthielt 10 μl TMS (auf jeweils etwa 4 ml Lösung). Mit diesen Stammlösungen wurden 11 Proben angesetzt, in denen jeweils 100 μl Stammlösung I vorgelegt wurden. Dann wurden den Proben unterschiedliche Mengen der Stammlösung II zugesetzt (0-800 μl in Schritten von jeweils 80 μl). Die Proben wurden mit dem Lösungsmittel oder der Stammlösung des Lösungsmittelgemisches auf 1 ml aufgefüllt und bei 298 K vermessen. Zur Auswertung herangezogen wurden nur Signale, die über alle 11 Spektren der Titration hinweg eindeutig abgelesen werden konnten. Die Berechnung der Assoziationskonstanten aus $\Delta\delta$ erfolgte mit durch nichtlineare Regression der erhaltenen Titrationskurve. Alle Messungen wurden mindestens einmal reproduziert.

Für die Aufnahme der Job-Plots^{59,60} wurde jeweils eine 1 mM Lösung von Wirt und Gast in dem entsprechenden deuterierten Lösungsmittel angesetzt. Mit diesen Lösungen wurden dann 10 Proben angesetzt, bei denen der Molenbruch der Komponente, deren Protonen im NMR Spektrum verfolgt werden sollten, kontinuierlich von 1 bis 0,1 in 0,1-ser Schritten variierte. Von dieser Komponente wurden in der ersten Probe also 1000 μl der angesetzten Stammlösung vorgelegt, in der zweiten 900 μl in der dritten 800 μl etc. bis zur letzten Probe, in der 100 μl vorgelegt wurden. Alle Proben wurden dann mit der Stammlösung der zweiten Komponente auf 1000 μl aufgefüllt und bei 298 K vermessen.

4.3 Allgemeine Arbeitsweisen

Trocknen von p-Toluolsulfonsäure. Die p-Toluolsulfonsäure wurde 4 h bei 100° C im Vakuum über P₄O₁₀ getrocknet. Dann wurde zügig die benötigte Menge abgewogen und sofort umgesetzt.

Abspalten der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure. Das Boc-geschützte Peptid oder die Aminosäure wurden in 4 ml trockenem CH₂Cl₂ pro 1 mmol Verbindung vorgelegt, die Lösung in einem Eisbad abgekühlt. Dann wurden das gleiche Volumen Trifluoressigsäure langsam zugetropft und 1,5 h in der Kälte weitergerührt. Nach Ende der Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung bei einer Badtemperatur < 40° C eingeeengt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit 10% Na₂CO₃ - Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen, getrocknet, mit einem Äquivalent (in Bezug auf die freien Aminogruppen) HCl in Form von 37%iger Salzsäure versetzt und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Das zurückbleibende Öl wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Abspalten der Boc-Schutzgruppe mit 6N HCl. Das Boc-geschützte Peptid oder die Aminosäure wurden in 10 ml trockenem Dioxan pro 3 mmol Verbindung vorgelegt und die Lösung in einem Eisbad abgekühlt. Dann wurde das doppelte Volumen 6N HCl in trockenem Dioxan langsam zugetropft und 2 h in der Kälte weitergerührt. Nach Ende der Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung bei einer Badtemperatur < 40° C eingeeengt und der Rückstand mit Petrolether 60/80 angerieben, abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Abspalten der Benzylschutzgruppe. Eine Lösung aus dem benzylgeschützten Peptid in 50 ml Methanol wurde mit 100 mg 10% Pd/C versetzt und unter einer Wasserstoffatmosphäre hydriert, bis im DC kein Edukt mehr zu beobachten war. Der Katalysator wurde dann über Celite abfiltriert, mit Methanol gewaschen und das Filtrat im Vakuum eingeeengt, bis das Lösungsmittel vollständig entfernt war. Mit Petrolether 60/80 wurde der Rückstand angerieben, abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Abspalten der Allylschutzgruppe. In einem Stickstoffkolben wurde das allylgeschützte Peptid eingewogen. Der Kolben wurde dann dreimal sekuriert, wobei auf ein Ausheizen des Kolbens verzichtet wurde, um ein thermisches Abspalten der Boc-Schutzgruppe zu verhindern. Als Schutzgas wurde Stickstoff verwendet. Im Stickstoffgegenstrom wurden dann

nacheinander pro Mol Peptid jeweils 20 ml trockenes THF und 3,2 Äquivalente Morpholin zugesetzt. Zwischen jeder Zugabe wurde kurz mit Stickstoff gespült. Dann wurde eine Spatelspitze des Katalysators Tetrakis[4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl-diphenylphosphin]palladium(0), den ich nach der Methode von J. Bitta⁵² hergestellt habe, zur Reaktionslösung gegeben. Nach 20 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde das Beenden der Reaktion mit einem DC überprüft. Bei unvollständiger Umsetzung wurde eine weitere Spatelspitze Katalysator zugegeben und weitere 30 Minuten gerührt. Zeigte sich im DC vollständige Umsetzung oder keine Verbesserung des Reaktionsumsatzes mehr, so wurde die Reaktion abgebrochen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase zweimal mit 10% KHSO₄ Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Ethylacetat wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Hexan angerieben, abfiltriert und getrocknet.

4.4 Synthesen

4.4.1 Synthesen zu Kapitel 2.2

1.) Versuche zur Darstellung von Boc-(L)Suc-AB-OBn, **9** nach der Methode von Samukov et al.⁴⁷, [Schema 2.3]:

Darstellung von Boc-(L)Asp-(OBn)-AB-OBn, 11: In 100 ml trockenem Methylenchlorid wurden 5,00 g Boc-(L)-Asp-(OBn)-OH (15,50 mmol), 4,12 g **10** (10,30 mmol) und 6,53 g PyCloP (15,50 mmol) gelöst und nach Zugabe von 7,16 ml DIEA (41,20 mmol) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden vereinigt, im Vakuum zur Trockne eingeeengt und mit Ethylacetat/Hexan umgefällt. Das saubere Produkt wurde abfiltriert, mit Hexan gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 3,00 g (91% d. Th.)

mp: 105° C

$[\alpha]_D^{25}$: -17,7° c=2, Methanol

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,46 (s, 9H, Boc), 2,79 + 2,93 (2m, 1H + 1H, AspCHCH₂), 4,58 (bs, 1H, AspCHCH₂), 5,18 + 5,43 (2s, 2H + 2H, 2BnCH₂), 7,31-7,59 (m, 12H, 10Bn-H + Asp-NHBoc + H(5)), 7,76 (d, ³J_H= 7.9 Hz, 1H, H(6)), 7,97 (d, ³J_H= 7.3 Hz, 1H, H(4)), 8,34 (s, 1H, H(2)), 10,36 (s, 1H, ArylNHCO)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3318 (s), 2976 (w), 1724 (s), 1685 (m), 1668 (m), 1543 (m), 1529 (m), 1368 (m), 1287 (s), 1168 (s), 754 (s), 698 (m)

C, H, N	ber	C: 67,66%	H: 6,06%	N: 5,26 %	C ₃₀ H ₃₂ N ₂ O ₇
	gef	C: 67,40%	H: 6,01%	N: 5,26%	F _w : 532,59

Darstellung von Boc-Suc-AB-OBn, 9: 3,74 g 11 (7,00 mmol) wurden in 100 ml DMF p. A. gelöst und nach Zugabe von 3,14 ml DBU (21,00 mmol) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde im Ölpumpenvakuum abkondensiert und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Nachdem die organische Phase zweimal mit 10% Kaliumhydrogensulfatlösung und dreimal mit Wasser gewaschen worden war, wurde sie über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) gereinigt, die sauberen Produktfraktionen vereinigt, im Vakuum zur Trockne eingengt und mit Ethylacetat/Hexan umgefällt. Das saubere Produkt wurde abfiltriert, mit Hexan gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Durch HPLC auf einer chiralen stationären Phase wurde das Verhältnis der beiden Enantiomere zu 1:1 bestimmt. Das gleiche Ergebnis erhielt man bei Umsetzung mit einem Äquivalent DIEA statt DBU.

Ausbeute: 2,42 g (82% d. Th.)

$[\alpha]_D^{25}$: 0° c=2, Methanol

2.) Versuch zur Darstellung von 9 über das Anhydrid 12,⁴⁸ [Schema 2.5]:

Darstellung von Boc-Suc-AB-OBn, 9: In 10 ml trockenem Methylenchlorid wurden 480 mg 10 (1,20 mmol), 340 mg 12 (1,56 mmol), das nach der Methode von Schroeder et al.⁴⁸ hergestellt worden war, und 20 mg DMAP (120 µmol) bei 0° C vorgelegt. Nach Zugabe von 700 µl DIEA (2,40 mmol) wurde 4h in der Kälte und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Nachdem die organische Phase zweimal mit 10% Kaliumhydrogensulfatlösung und dreimal mit Wasser gewaschen worden war, wurde sie über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Zwischenprodukt, die Mischung aus beiden Regioisomeren 13 + 14, wurde im Exsikkator über Phosphorpentoxid und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet. Dann wurden 600

mg davon (1,20 mmol) mit 510 mg PyCloP (1,20 mmol) und 420 ml DIEA (2,40 mmol) in 20 ml trockenem Methylenchlorid über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurde die Reaktionsmischung dünnschichtchromatographisch untersucht. Es zeigte sich, daß das eine Regioisomer vollständig reagiert hatte, das andere fast gar nicht. Es wurden weitere 260 mg PyCloP (0,6 µmol) und 210 µl DIEA (1,20 mmol) zugegeben und noch zwei Tage gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingengt. Das erhaltene Öl wurde mit Hexan angerieben, abfiltriert, mit Hexan gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Durch HPLC auf einer chiralen stationären Phase wurde das Verhältnis der beiden Enantiomere zu 8:1 bestimmt (gewünschtes Stereoisomer im Überschuß).

Ausbeute: 300 mg (58% d. Th.)

3.) Darstellung des Dipeptides **9** über den Allylester **15**, [Schema 2.7]:

Darstellung von Boc-(L)Asp-(OAll)-OH, **16:** Zu einer Lösung von 5,08 g HCl-(L)Asp-(OAll)-OH (**15**) (24 mmol), das nach der Methode von Belshaw hergestellt worden war,⁴⁹ in 30 ml Wasser wurden 6,31 ml Boc₂O (29 mmol) in 30 ml Dioxan gegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und unter Rühren wurden 7,01 ml Triethylamin (50 mmol) langsam zutropft. Danach ließ man über Nacht bei Raumtemperatur rühren und extrahierte anschließend zweimal mit Hexan, um überschüssiges Boc₂O zu entfernen. Nun wurde die wäßrige Lösung auf etwa 20 ml eingengt. Unter Kühlung im Eisbad wurde der pH der Lösung mit 1N Salzsäure auf etwa 2 gebracht, dann wurde das Produkt dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt an der Ölpumpe getrocknet. Die Verbindung entsprach dem von Belshaw charakterisierten Boc-(L)Asp-(OAll).⁴⁹

Ausbeute: 6,24 g (93% d. Th.)

Darstellung von Boc-(L)Asp-(OAll)-AB-(OBn), **17:** 5,59 g **16** (20 mmol) wurden mit 4,80 g **10** (20 mol) und 8,42 g PyCloP (20 mmol) in 100 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Nach

Zugabe von 10,43 ml DIEA (60 mmol) wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden zur Trockne eingengt und das zurückbleibende Öl im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 5,85 g (61% d. Th.)

mp: 64° C

$[\alpha]_{D=25}^{25}$ -22,3° c=2, Methanol

¹H-NMR [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,46 (s, 9H, Boc), 2,74 (dd, ²J_H=16,3 Hz, ³J_{aa}=8,7 Hz, 1H, AspCHCH₂), 2,90 (dd, ²J_H=16,3 Hz, ³J_{ac}= 5,7 Hz, 1H, AspCHCH₂), 4,63 (s, 2H, CH₂CH=CH₂), 4,54 – 4,67 (m, 1H, AspCHCH₂), 5,26 (dd, ²J_H= 1,6 Hz, ³J_H= 10,6 Hz, 1H, CH₂CH=CH₂, *cis* H), 5,38 (dd, ²J_H= 1,6 Hz, ³J_H= 17,3 Hz, 1H, CH₂CH=CH₂, *trans* H), 5,43 (s, 2H, BnCH₂), 5,92 – 5,60 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 7,35 (d, ³J_H= 7,9 Hz, 1H, Asp-NHBoc), 7,44 (m, 1H, H(5)), 7,48 – 7,56 (m, 5H, Bn-H), 7,76 (d, ³J_H= 7.9 Hz, 1H, H(6)), 7,97 (d, ³J_H= 7,3 Hz, 1H, H(4)), 8,34 (s, 1H, H(2)), 10,36 (s, 1H, Aryl-NHCO)

IR (KBr) cm⁻¹ 3327 (s), 2982 (m), 1734 (s), 1715 (s), 1670 (s), 1596 (m), 1537 (s), 1523 (s), 1489 (m), 1371 (s), 1301 (s), 1236 (m), 1167 (s), 750 (s), 695 (m)

C,H,N	ber	C: 64,72	H: 6,14	N: 5,81	C ₂₆ H ₃₀ N ₂ O ₇
	gef	C: 64,59	H: 6.27	N: 5,94	F _w : 482,53

Abspalten der Allyl-Schutzgruppe: 5,85 g **17** (12,12 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift in THF entschützt. Das Produkt **13** fiel als Öl an und wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 5,60 g (100% d. Th.)

Kupplung zum Succinimid 9: 5,60 g **13** (12,12 mmol) wurde mit 5,11 g PyCloP (12,12 mmol) und 4,21 ml DIEA (24,24 mmol) in 100 ml trockenem Methylenchlorid über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat/Hexan, 1:1). Die sauberen Fraktionen wurden im Vakuum zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit Hexan angerieben, abfiltriert und im Exsikkator getrocknet. Durch HPLC auf einer chiralen stationären Phase konnte gezeigt werden, daß das Produkt enantiomerenrein erhalten worden war.

Ausbeute: 4,28 g (83% d. Th.)

mp: 117° C

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +7,0° c=2, Methanol

¹H-NMR [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,47 (s, 9H, Boc), 2,73 (dd, ²J_H=17,7Hz, ³J_{ac}=5,7Hz, 1H, AspCHCH₂), 3,20 (dd, ²J_H=17,7 Hz, ³J_{aa}= 9,5 Hz, 1H, AspCHCH₂), 4,57–4,63 (m, 1H, AspCHCH₂), 5,46 (s, 2H, BnCH₂), 7,43 (d, ³J_H= 7,6 Hz, 1H, Asp-NHBoc), 7,47 – 7,56 (m, 5H, Bn-H), 7,63 (d, ³J_H= 8,2 Hz, 1H, H(6)), 7,77 (m, 1H, H(5)), 7,95 (s, 1H, H(2)), 8,13 (d, ³J_H= 7,6 Hz, 1H, H(4))

IR (KBr) cm⁻¹ 3394 (m, b), 2978 (m), 1721 (s, b), 1591 (m), 1518 (m), 1453 (m), 1387 (s), 1274 (s), 1165 (s), 755 (s), 699 (w)

C,H,N	ber	C: 65,08	H: 5,70	N: 6,60	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₆
	gef	C: 65,09	H: 5,75	N: 6,54	F _w : 424,45

4.) Darstellung des cyclischen Hexapeptides cyclo-[(L)Suc-AB]₃, **8**, [Schema 2.8]

Abspalten der Benzylschutzgruppe: 2,67 g **9** (6,37 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift in Methanol entschützt nach mehrfachem Einengen mit Methylenchlorid als freie Carbonsäure **9a** isoliert.

Ausbeute: 2,02 g (95%)

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 1,33 g **9** (3,18 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift mit TFA entschützt und als Hydrochlorid **9b** isoliert.

Ausbeute: 1,00 g (87% d. Th.)

Kupplung zum Tetrapeptid Boc-[(L)Suc-AB]₂-OBn, **18:** 0,93 g **9a** (2,77 mmol), 1,00 g **9b** (2,77 mmol) und 1,40 g PyCloP (3,32 mmol) wurden in 50 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und nach Zugabe von 1,69 ml DIEA (9,70 mmol) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat/Hexan, 6:1). Die sauberen Fraktionen wurden zur Trockne eingengt und der Rückstand aus Ethylacetat/Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 1,46 g (82% d. Th.)

mp: 193° C

¹H-NMR [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,48 (s, 9H, Boc), 2,77 + 2,94 (2 dd, ²J_H= 17,7Hz, ³J_{ae}= 5,0Hz, je 1H, AspCHCH₂), 3,21 + 3,30 (2 dd, ²J_H= 17,7 Hz, ³J_{aa}= 9,5 Hz, je 1H, AspCHCH₂), 4,60 - 4,65 + 4,93-4,97 (2 m, je 1H, AspCHCH₂), 5,47 (s, 2H, BnCH₂), 7,44 (d, ³J_H= 7,6 Hz, 1H, Asp-NHBoc), 7,47 - 7,56 (m, 5H, Bn-H), 7,67 (m, 2H, H(6)), 7,74 + 7,79 (2 m, je 1H, H(5)), 7,86 (s, 1H, H(2)), 8,00 (m, 2H, H(2) + H(4)), 8,14 (d, ³J_H= 7,6 Hz, 1H, H(4)), 9,48 (d, J_H=7,6 Hz, 1H, Asp-NHCO)

IR (KBr) cm^{-1} 3422 (m, b), 2979 (m), 1719 (s), 1655 (m), 1589 (m), 1523 (m), 1488 (m), 1387 (s), 1277 (s), 1168 (s), 755 (s), 688 (w)

C,H,N	ber	C: 63,74	H: 5,03	N: 8,75	$\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_9$
	gef	C: 63,53	H: 5,12	N: 8,49	F_w : 640,65

Abspalten der Benzylschutzgruppe: 1,42 g **18** (2,22 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift in Methanol entschützt und als freie Carbonsäure **18a** isoliert.

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

Kupplung zum Hexapeptid Boc-[(L)Suc-AB]₃-OBn, 19: 0,75 g **9b** (2,22 mmol), 1,28 g **18a** (2,22 mmol) und 0,79 g TBTU (2,45 mmol) wurden in 50 ml DMF p. A. gelöst und nach Zugabe von 1,24 ml DIEA (7,14 mmol) 3h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde unter Rühren auf 400 ml Wasser gegossen und mit 1N HCl auf pH 4 gebracht. Zur Vervollständigung der Fällung wurde noch 10 min gerührt, dann wurde der Feststoff abfiltriert, gründlich mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das Rohprodukt war DC-sauber und wurde ohne weitere Aufarbeitung für die nächste Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 1,72 g (91% d. Th.)

Abspalten der Benzylschutzgruppe: 1,64 g **19** (2,00 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift in Methanol/Methylenchlorid (1:1) entschützt. Die freie Carbonsäure **19a**, die während der Reaktion auszufallen begann, wurde durch Zugabe einiger Tropfen DMF wieder in Lösung gebracht.

Ausbeute: 1,43 g (93% d. Th.)

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 1,43 g **19a** (2,00 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift mit 6N HCl in Dioxan entschützt und als Hydrochlorid **19b** isoliert.

Ausbeute: 1,43 g (100% d. Th.)

Cyclisierung zum Hexapeptid cyclo-[(L)Suc-AB]₃, **8:** 1,43 g **19b** (2,00 mmol) und 1,11 ml DIEA (6,40 mmol) wurden in 180 ml DMF p. A. gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 0,71 g TBTU (2,20 mmol) in 40 ml DMF p. A. sehr langsam zugetropft. Es wurde 3d bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt mit Methanol angerieben. Der Feststoff wurde filtriert, mit Methanol gewaschen, getrocknet und über eine Kieselgelsäule gereinigt (Methylenchlorid/ Methanol, 10:1). Das Produkt kristallisierte in den Fraktionsgläsern als Hydrat **8**·5,5H₂O aus. Der Feststoff wurde abfiltriert und im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 30 mg (2% d. Th.)

mp: >250 °C

$[\alpha]_{D=25}^{25}$ -86,4° c=2, DMF

¹H-NMR [500 MHz, 4% d₆-DMSO in CDCl₃] δ 2,87 (dd, ²J_H=18,9 Hz, ³J_{ac}= 4,4 Hz, 3H, AspCHCH₂), 3,31 (dd, ²J_H=18,9 Hz, ³J_{aa}=9,5 Hz, 3H, AspCHCH₂), 4,95 - 4,99 (m, 3H, AspCHCH₂), 7,37 (d, ³J_H= 7,6 Hz, 3H, H(6)), 7,54 (m, 3H, H(5)), 7,91 (s, 3H, H(2)), 7,99 (d, ³J_H=8,2 Hz, 3H, H(4)), 9,11 (d, ³J_H=7,6 Hz, 3H, Asp-NHCO)

¹³C-NMR [500 MHz, d₆-DMSO] δ 35,9 (AspCHCH₂), 49,9 (AspCHCH₂), 127,4 (C(2)), 128,0 (C(4)), 129,7 (C(6)), 131,5 (C(5)), 133,8 (C(3)), 134,2 (C(1)), 165,9 (Aryl-C=O), 175,1 + 175,8 (Succinimid-C=O)

IR (KBr) cm⁻¹ 3446 (s, b), 1716 (s), 1647 (m), 1587 (w), 1541 (s), 1488 (m), 1396 (s), 1339 (w), 1197 (s, b), 750 (w), 691 (w)

C,H,N	ber	C: 53,01%	H: 4,72%	N: 11,24%	C ₃₃ H ₂₄ N ₆ O ₉ ·5,5H ₂ O
	gef	C: 52,85%	H: 4,61%	N: 10,99%	F _w : 747,68

4.4.2 Synthesen zu Kapitel 2.3

1.) Synthese des Dipeptides Boc-(L)Pro-AB(5-HNCONHPh)-OBn, (24), [Schema 2.11]:

Darstellung von 3,5-Diaminobenzoesäurebenzylester, (23): 7,61 g 3,5-Diaminobenzoesäure (22) (50 mmol) wurden mit 17,21 g p-Toluolsulfonsäure (100 mmol), die vorher 4 h bei 100° C über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet worden war, und 11,40 g p-Toluolsulfonsäurechlorid (60 mmol) in 100 ml Benzylalkohol 3 h lang bei 80° C gerührt, bis die Lösung klar wurde. Dann wurde die noch warme Lösung in 800 ml Diethylether gegossen und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und in 10% Natriumcarbonatlösung aufgenommen. Es wurde dreimal mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte dreimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) gereinigt und anschließend mit Ethylacetat/Hexan umkristallisiert. Das Produkt fiel in feinen weißen Nadeln an, die abfiltriert, mit Hexan gewaschen und im Vakuum getrocknet wurden.

Ausbeute: 4,90 g (40% d. Th.)

mp: 105°-111° C

¹H-NMR: [500 MHz, CDCl₃] δ 3,68 (s, 4H, NH₂), 5,32 (s, 2H, Bn-CH₂), 6,20 (s, 1H, H(4)), 6,82 (s, 2H, H(2), H(6)), 7,31-7,45 (m, 5H, Bn-H)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3446 (s), 2957 (w), 2925 (w), 2854 (w), 1700 (s), 1618 (s), 1559 (m), 1508 (m), 1386 (s), 1246 (s), 770 (m), 756 (m), 700 (m)

C, H, N	ber	C: 69,41%	H: 5,82 %	N: 11,56%	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂
	gef	C: 69,38 %	H: 5,89%	N: 11,56%	F _w : 242,28

Darstellung von N,N'-(3-Amino-5-benzyloxycarbonylphenyl)phenylharnstoff, (21): In 70 ml trockenem Diethylether wurden 1,26 g 23 (5,20 mmol) vorgelegt. Unter Rühren wurden 570 µl Phenylisocyanat (5,20 mmol) in 10 ml trockenem Diethylether langsam zugetropft,

worauf die Lösung begann, sich durch ausfallendes Produkt zu trüben. Es wurde über Nacht gerührt, dann wurde der weiße Niederschlag abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Danach wurde das Rohprodukt in wenig Aceton aufgenommen und mit Aceton/Wasser umkristallisiert. Das Produkt fiel in feinen weißen Nadeln an, die abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet wurden.

Ausbeute: 1,81 g (96% d. Th.)

mp: 192°-206° C

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 3,31 (s, 2H, NH₂), 5,35 (m, 2H, Bn-CH₂), 6,85 (m, 3H, H_{arom}), 7,22 (m, 10H, H_{arom}), 8,32 + 8,53-9,01 (m, 2H, HNCONH)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3336 (s), 1705 (m), 1654 (m), 1599 (s), 1556 (s), 1499 (m), 1447 (s), 1312 (m), 1221 (s), 753 (m), 694 (m)

C, H, N	ber	C: 69,79%	H: 5,30%	N: 11,63%	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₃
	gef	C: 69,74%	H: 5,06%	N: 11,56%	F _w : 361,40

Darstellung des Dipeptides Boc-(L)Pro-AB(5-HNCONHPh)-OBn, (24): 1,46 g 21 (4,04 mmol) wurden mit 1,30 g Boc-(L)Pro-OH (6,07 mmol), 2,56 g PyCloP (6,07 mmol) und 2,11 ml DIEA (12,12 mmol) in 120 ml trockenem Methylenchlorid über Nacht gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) gereinigt. Das Produkt fiel zunächst als Öl an, das zweimal mit Methylenchlorid aufgenommen und wieder zur Trockne eingengt wurde. Dadurch konnte das Produkt als Feststoff erhalten werden, der im Ölpumpenvakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 2,19 g (97% d. Th.)

mp: 124° - 162°C

[α]_D²⁵: -51,6° c=2, Methanol

¹H-NMR: [300 MHz, d₆-DMSO, 100° C] δ 1,35 (s, 9H, Boc), 1,78-1,85 (m, 1H, Pro-H(β)), 1,86-1,99 (m, 2H, Pro- H(γ)), 2,16-2,21 (m, 1H, Pro-H(β)), 3,33-3,47 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,24 (dd, 1H, ³J_{ac}=4,0 Hz, ³J_{aa}=8,2 Hz, Pro-H(α)), 5,35 (s, 2H, Bn-CH₂), 7,00 + 7,29 (2 m, 1H + 2H, Ph-H), 7,30-7,46 (m, 7H, 5 Bn-H + 2 Ph-H), 7,81 + 7,85 (2 m, 1H + 1H, H(2) + H(6)), 8,07 (m, 1H, H(4)), 8,35 + 8,73 (2 bs, 1H + 1H, PhHNCONH), 9,84 (bs, 1H, HNBoc)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3337 (s), 2977 (m), 2880 (m), 1715 (s), 1668 (s), 1601, (s), 1548 (s), 1499 (m), (m), 1454 (s), 1308 (m), 1257 (m), 1221 (s), 769 (m), 752 (m), 695 (m)

C, H, N	ber	C: 66,65%	H: 6,13%	N: 10,03%	C ₃₁ H ₃₄ N ₄ O ₆
	gef	C: 66,76%	H: 6,23%	N: 9,74%	F _w : 558,63

2.) Synthese des Hexapeptides Boc-[(L)Pro-AB(5-HNCONHPh)]₃-OBn, (26), [Schema 2.12]:

Abspalten der Benzylschutzgruppe: 0,70 g 24 (1,25 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift in Methanol entschützt und das Produkt als freie Carbonsäure 24a isoliert.

Ausbeute: 0,56 g (96% d. Th.)

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 0,70 g 24 (1,25 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift in 6N HCl in Dioxan entschützt und das Produkt als Hydrochlorid 24b isoliert.

Ausbeute: 0,62 g (100% d. Th.)

Kupplung zum Tetrapeptid Boc-[(L)Pro-AB(5-NHCONHPh)]₂-OBn, 25: 0,62 g 24b (1,25 mmol), 0,56 24a (1,20 mmol), 0,63 g PyCloP (1,50 mmol) und 0,76 ml DIEA (4,38 mmol) wurden über Nacht in 30 ml trockenem Methylenchlorid gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt über eine Kieselgelsäule

(Methylenchlorid/Methanol, 10:1) gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden im Vakuum zur Trockne eingengt und mit Ethylacetat/Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 1,05 g (96% d. Th.)

¹H-NMR: [300 MHz, d₆-DMSO] δ 1,35 (s, 9H, Boc), 1,78-1,85 (m, 2H, Pro-H(β)), 1,86-1,99 (m, 4H, Pro-H(γ)), 2,16-2,21 (m, 2H, Pro-H(β)), 3,33-3,47 (m, 4H, Pro-H(δ)), 4,24 (dd, 2H, ³J_{ac}=4,0 Hz, ³J_{aa}=8,2 Hz, Pro-H(α)), 5,35 (s, 2H, Bn-CH₂), 7,00 + 7,29 (2 m, 2H + 4H, Ph-H), 7,30-7,46 (m, 9H, 5 Bn-H + 4 Ph-H), 7,81 + 7,85 (2 m, 2H + 2H, H(2) + H(6)), 8,07 (m, 2H, H(4)), 8,35 + 8,73 (2 bs, 2H + 2H, PhHNCONH), 9,84 (bs, 1H, HNBoc)

C, H, N	ber	C: 62,36%	H: 6,07%	N: 11,64%	C ₅₀ H ₅₂ N ₈ O ₉ ·3H ₂ O
	gef	C: 62,46%	H: 5,77%	N: 11,44%	F _w : 963,06

Abspalten der Benzylschutzgruppe: 1,02 g **25** (1,12 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift in Methanol entschützt und das Produkt als freie Carbonsäure **25a** isoliert.

Ausbeute: 0,92 g (100% d. Th.)

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 0,63 g **24** (1,12 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift in 6N HCl in Dioxan entschützt und das Produkt als Hydrochlorid **24b** isoliert.

Ausbeute: 0,58 g (100% d. Th.)

Kupplung zum Hexapeptid Boc-[(L)Pro-AB(5-HNCONHPh)]₃-OBn, 26: 0,58 g **24b** (1,12 mmol), 0,92 **25a** (1,12 mmol), 0,40 g TBTU (1,23 mmol) und 0,62 ml DIEA (3,58 mmol) wurden in 40 ml DMF p. A. 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde auf 400 ml Wasser gegossen und mit 1N HCl auf pH 4 gebracht. Nachdem 10 min gerührt worden war, wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule (Methylenchlorid/Methanol, 10:1) vorgereinigt, konnte aber nicht sauber isoliert werden.

Ausbeute: 1,00 g Rohprodukt

4.4.3 Synthesen zu Kapitel 2.4

1.) Direktcyclisierung von Z-(L)Pro-AB-OBn, 27, [Schema 2.13]:

Darstellung des Dipeptides Z-(L)Pro-AB-OBn, 27: In 100 ml trockenem Methylenchlorid wurden 4,33 g 3-Aminobenzoesäurebenzylester·TsOH, (10) (10,8 mmol), 4,04 g Z-(L)Pro-OH (16,2 mmol) und 6,82 g PyCloP (16,2 mmol) gelöst und nach Zugabe von 7,51 ml DIEA (43,2 mmol) bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselsäule mit Ethylacetat Hexan 1:1 gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden im Vakuum zur Trockne eingeengt. Nach Umfällen aus Methanol/Wasser wurde das Produkt sauber als weißes Pulver erhalten und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 3,00 g (62% d. Th.)

mp: 118° C

$[\alpha]_D^{25}$: -49,6° c=2, Methanol

$^1\text{H-NMR}$: [500 MHz, d_6 -DMSO] δ 1,88-2,05 (m, 3H, 1 Pro-H(β) + 2 Pro-H(γ)), 2,26-2,36 (m, 1H, Pro-H(β)), 3,47-3,63 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,39–4,45 (m, 1H, Pro-H(α)), 5,00–5,19 (m, 2H, Z-CH₂), 5,44 (m, 2H, Bn-CH₂), 7,13–7,24 + 7,36–7,56 (2m, 1H + 9H, Bn-H + Z-H), 7,29 (m, 1H, H(5)), 7,51 (m, 1H, H(6)), 7,72 (m, 1H, H(4)), 8,08 (m, 1H, H(2)), 10,36 (s, 1H, Pro-CONHArlyl)

IR: (KBr) cm^{-1} 3282 (s), 2957 (m), 2878 (w), 1716(s), 1596 (s), 1551 (m), 1488 (m), 1420 (s), 1357 (m), 1286 (s), 1176 (m), 1119 (m), 754 (s), 697 (s)

C, H, N	ber	C: 70,73%	H: 5,72%	N: 6,11%	$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$
	gef	C: 70,59%	H: 5,68%	N: 6,02%	F_w : 458,51

Vollständiges Entschützen des Dipeptides 27: 2,95 g 27 (6,44 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung von Z- und Benzylschutzgruppen in Methanol hydriert. Um ein Ausfallen des Betains aus der Lösung zu verhindern, wurden 1,2 Äquivalente DIEA zugesetzt. Das Produkt 27a wurde zum Schluß zweimal mit Methylenchlorid aufgenommen und im Vakuum zur Trockne eingengt um Reste von Methanol und Base zu entfernen

Ausbeute: 1,51 g (100% d. Th.)

Direktcyclisierung von 27a unter Standardbedingungen bei 80° C: 0,82 g 27a (3,49 mmol) wurden mit 1,94 ml DIEA (11,47 mmol) in 200 ml DMF p. A. auf 80° C erhitzt. Dann wurde eine Lösung von 1,23 g TBTU (3,84 mmol) in 40 ml DMF p. A. sehr langsam zugetropft und die Reaktionsmischung 2 h bei 80° C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand über Nacht in trockenem Ether gerührt. Der sich bildende Feststoff wurde abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Zur Isolierung des Hauptprodukts wurde das Rohprodukt zunächst über eine Kieselgelsäule (Methylenchlorid/Methanol, 10:1) vorgereinigt. Dann wurde das so erhaltene Produkt noch über eine RP-8-Säule (Wasser → Methanol/Wasser 1:5 → 1:2) gereinigt. Es eluierte mit Methanol/Wasser 1:2. Das Produkt kristallisierte über Nacht aus den offenen Fraktionsgläsern aus. Es wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über P₄O₁₀ im Exsikkator getrocknet. Im Massenspektrum konnte gezeigt werden, daß es sich um das cyclische Tetrapeptid 28 handelte.

Ausbeute: 150 mg (20% d. Th.)

Direktcyclisierung von 27a bei Raumtemperatur: 1,51 g 27a (6,44 mmol) wurden mit 2,28 g TBTU (7,08 mmol) in einem Stickstoffkolben eingewogen und dreimal sekuriert. Im Stickstoffgegenstrom wurden dann 230 ml DMF p. A., das vorher durch zweistündiges Spülen mit Stickstoff weitgehend sauerstofffrei gemacht worden war, zugegeben und die entstandene Lösung mit 2,46 ml DIEA (14,17 mmol) versetzt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das DMF im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde mit Ether angerieben, abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Über eine Kieselgelsäule (Methylenchlorid/Methanol, 15:1 → 10:1) wurde aus der Produktmischung von cyclischem Tetra-, Hexa- und Octapeptid zunächst das Tetrapeptid 28

(C(5)), 138,1 + 138,3 (C(3) + C(1)), 169,3 (Aryl-C=O), 171,7 (Pro-C=O)

IR: (KBr) cm^{-1} 3442 (m), 3274 (s), 3248 (m), 3086 (m), 2972 (m), 2875 (m), 1695 (s), 1623 (s), 1558 (s), 1449 (s), 1417 (s), 1342 (m), 1282 (s), 1261 (m), 1190 (s), 1167 (m), 897 (m), 800 (s), 748 (m), 707 (m), 633 (m), 450 (m)

C, H, N	ber	C: 66,65%	H: 5,59%	N: 12,95%	$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4$
	gef	C: 66,42%	H: 5,89%	N: 12,93%	$F_w: 432,48$

Kristallstrukturdaten von $\underline{28} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 468,5$; farblose Prismen $0,10 \times 0,16 \times 0,17$ mm, tetragonal, $P4_12_12$ [no. 92], $a = 9,5406(4)$, $c = 24,405(1)$ Å, $V = 2221,4(2)$ Å³, $T = 100$ K, $Z = 4$, $D_x = 1,401$ g cm^{-3} , $\lambda = 0,71073$ Å, $\mu = 1,02$ cm^{-1} , Nonius Kappa CCD Diffraktometer, $\theta_{\text{max}} = 27,48^\circ$, 5690 gemessene Reflexe, 2532 unabhängig, 1638 mit $I > 2\sigma(I)$. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden (SHELXS-97) gelöst und mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (SHELXL-97) verfeinert, Chebyshev Wichtung auf F_o^2 Basis, $R_I = 0,069$ [$I > 2\sigma(I)$], $wR_2 = 0,175$ (alle Daten), 165 Parameter, die H-Atome am Peptid wurden mittels eines Modells rigider Gruppen in die Verfeinerung miteinbezogen, H-Atome an einem Solvensmolekül nicht lokalisiert, $S = 0,984$; Restelektronendichte $0,38$ e Å⁻³.

2.) Direktcyclisierung von Boc-(L)Pro-AB(5-CO₂Bn)-OAll, 30, [Schema 2.14]:

Darstellung von Boc-(L)Pro-AB(5-CO₂Bn)-OAll, 30: Das Dipeptid 30 wurde nach der Methode von J. Bitta⁵² hergestellt.

Abspalten der Allylschutzgruppe: 2,50 g 30 (4,92 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift in THF entschützt und als freie Carbonsäure 30a erhalten.

Ausbeute: 2,40g (100% d. Th.)

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 2,40 g 30a (4,92 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift mit 6N HCl in Dioxan entschützt und als Hydrochlorid 30b erhalten.

Ausbeute: 2,02 g (100% d. Th.)

Direktcyclisierung des entschützten Dipeptides 30b: 2,02 g 30b (4,92 mmol) wurden mit 1,74 g TBTU (5,39 mmol) in einem Stickstoffkolben eingewogen und dreimal sekuriert. Unter Stickstoffgegenstrom wurden dann 230 ml DMF p. A., das vorher durch zweistündiges Spülen mit Stickstoff weitgehend sauerstofffrei gemacht worden war, zugegeben und die entstandene Lösung mit 3,00 ml DIEA (17,20 mmol) versetzt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das DMF im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde mit Ether angerieben, abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Über eine Kieselgelsäule (Aceton/Chloroform, 1:2) wurde aus der Produktmischung von cyclischem Tetra-, Hexa- und Octapeptid zunächst das Tetrapeptid 31 isoliert. Dieses wurde über eine RP-8-Säule (Wasser/Methanol, 5:1 → 3:1 → 1:1 → 1:2) gereinigt und mit der letzten Mischung eluiert. Das Produkt kristallisierte sauber in feinen, weißen Nadeln aus den Fraktionsgläsern aus. Die Mischung aus Hexa- und Octapeptid ließ sich auf der RP-Phase nicht trennen. Auch nach Aufziehen auf Kieselgel und Reinigung über eine Kieselgelsäule (Chloroform/Methanol, 20:1) ließ sich keine Trennung erzielen.

Ausbeute: 31: 390 mg (22% d. Th.)

3.) Direktcyclisierung von Boc-(L)Pro-AB(5-NHZ)-OAll, **37**:

a) Synthese des Dipeptides Boc-(L)Pro-AB(5-NHZ)-OAll, **37**, [Schema 2.15]:

Darstellung von 3,5-Bis(tert-butyloxycarbonylamino)benzoesäure nach Meijer,⁵³ **34:** In 200 ml Methanol wurden 7,61 g 3,5-Diaminobenzoesäure (**22**) (50 mmol), 7,93 ml Triethylamin (57 mmol) und 34,24 ml Boc₂O (160 mmol) gelöst. Nachdem die CO₂-Entwicklung etwas abgeklungen war, wurde 2 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 150 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit dem gleichen Volumen Wasser unterschichtet und mit 8,57 g Kaliumhydrogensulfat (63 mmol) versetzt. Dann wurde die Mischung kräftig geschüttelt und die wäßrige Phase abgetrennt; die organische Phase wurde noch zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend zur Trockne eingengt. Der ölige Rückstand wurde mit Methylenchlorid angerieben und der sich bildende Feststoff abfiltriert, mit Methylenchlorid gründlich gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 16,56 g (94% d. Th.)

mp: 158° C

¹H-NMR: [300 MHz, d₆-DMSO] δ 1,47 (s, 18H, Boc), 7,68 + 7,68 (2 s, 1H + 1H, H(2) + H(6)), 7,87 (s, 1H, H(4)), 9,51 (s, 2H, HNBoc)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3350 (s), 3314 (s), 2981 (m), 2933 (m), 1703 (s), 1612 (s), 1548 (s), 1452 (m), 1427 (m), 1270 (s), 1251 (s), 1158 (s), 885 (w), 774 (w), 693 (w)

C, H, N	ber	C: 57,94%	H: 6,86%	N: 7,95%	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₆
	gef	C: 57,70%	H: 6,88%	N: 8,06%	F _w : 352,39

Darstellung von 3,5-Bis(tert-butyloxycarbonylamino)benzoesäureallylester, **35.** In 150 ml DMF p. A. wurden 16,21 g **34** (46 mmol) gelöst. Nach Zugabe von 11,60 g Natriumhydrogencarbonat (138 mmol) und 12,00 ml Allylbromid (138 mmol) wurde die

entstandene Suspension 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung auf 600 ml Ethylacetat gegossen und dreimal mit je 150 ml Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan 1:1) gereinigt. Das Produkt wurde aus Ethylacetat/Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 17,70 g (98% d. Th.)

mp: 148°-157° C

¹H-NMR: [300 MHz, d₆-DMSO] δ 1,48 (s, 18H, Boc), 4,78 (d, 2H, ³J_H=5,3 Hz, CH₂CH=CH₂), 5,29 (dd, 1H, ³J_H=10,6 Hz, ²J_H=1,6 Hz, CH₂CH=CH₂, *cis*H), 5,41 (dd, 1H, ³J_H=17,3 Hz, ²J_H=1,6 Hz, CH₂CH=CH₂, *trans*H), 5,99-6,08 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 7,74 + 7,75 (2 s, 1H + 1H, H(2) + H(6)), 7,93 (m, 1H, H(4)), 9,56 (s, 2H, HNBoc)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3363 (s), 2979 (m), 2934 (m), 1708 (s), 1611 (m), 1543 (m), 1368 (m), 1235 (s), 1162 (s), 772 (w), 683 (w)

C, H, N	ber	C: 61,21%	H: 7,19%	N: 7,14%	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₆
	gef	C: 61,45%	H: 7,30%	N: 6,89%	F _w : 392,45

Abspalten der beiden Boc-Schutzgruppen: 11,90g **35** (30 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift mit Trifluoressigsäure entschützt und als Dihydrochlorid **35a** isoliert.

Ausbeute: 7,01 g (88% d. Th.)

Darstellung von 3-Amino-5-benzyloxycarbonylaminobenzoessäureallylester, (36): 3,00 g **35a** (11,30 mmol) wurden mit 3,93 ml DIEA (22,60 mmol) in 200 ml trockenem Methylenchlorid vorgelegt und auf 0° C gekühlt. Dann wurden 3,79 ml Z-Cl Lösung (50% in Toluol) (11,30 mmol) langsam zugetropft und 10 min in der Kälte gerührt. Die Lösung wurde dabei durch kontinuierliches Zutropfen von 1 ml DIEA leicht basisch gehalten. Danach wurde

über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Aus dem Rückstand wurde das Produkt durch eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) isoliert und aus Ethylacetat/Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 2,06 g (56% d. Th.)

mp: 145°-152° C

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 4,81 (d, 2H, ³J_H=5,1 Hz, CH₂CH=CH₂), 5,21 (s, 2H, Z-CH₂), 5,34 (dd, 1H, ³J_H=10,6 Hz, ²J_H=1,6 Hz, CH₂CH=CH₂, *cis*H), 5,46 (dd, 1H, ³J_H=17,3 Hz, ²J_H=1,6 Hz, CH₂CH=CH₂, *trans*H), 6,04-6,14 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 6,96 + 7,08 (2 s, 1H + 1H, H(2) + H(6)), 7,38 (m, 1H, H(4)), 7,40-7,51 (m, 5H, Z-H), 9,76 (s, 2H, HNBoc)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3472 (m), 3372 (m), 3333 (m), 1700 (s), 1611 (m), 1557 (s), 1486 (m), 1281 (m), 1251 (s), 1229 (s), 985 (m), 768 (m), 739 (m), 696 (m)

C, H, N	ber	C: 66,25%	H: 5,56%	N: 8,58%	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₄
	Gef	C: 66,07%	H: 5,49%	N: 8,49%	F _w : 326,35

Darstellung von Boc-(L)Pro-AB(5-NHZ)-OAll, (37): In 120 ml trockenem Methylenchlorid wurden 1,81 g **36** (5,55 mmol), 1,79 g Boc-(L)Pro-OH (8,33 mmol), 3,51 g PyCloP (8,33 mmol) und 2,89 ml DIEA (16,65 mmol) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Methylenchlorid gelöst und über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt aus Ethylacetat/Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 2,80 g (97% d. Th.)

mp: 148° C

$[\alpha]_D^{25}$: -51,6° c=2, Methanol

$^1\text{H-NMR}$: [500 MHz, d_6 -DMSO] δ 1,35 + 1,48 (2 s, 6H + 3H, Boc), 1,83-2,01 (m, 3H, 1 Pro-H(β) + 2 Pro-H(γ)), 2,20-2,32 (m, 1H, Pro-H(β)), 3,48-3,52 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,27 + 4,33 (2 dd, 0,6H + 0,3H, $^3J_{ae}=4,4$ Hz, $^3J_{aa}=8,2$ Hz + $^3J_{ae}=3,0$ Hz, $^3J_{aa}=8,5$ Hz, Pro-H(α)), 4,86 (d, 2H, $^3J_H=5,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,24 (s, 2H, Z- CH_2), 5,36 (d, 1H, $^3J_H=10,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, *cis*H), 5,48 (d, 1H, $^3J_H=17,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, *trans*H), 6,07-6,15 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 7,41-7,52 (m, 5H, Z-H), 7,92 + 8,06 (2 s, 1H + 1H, H(2) + H(6)), 8,16 (m, 1H, H(4)), 10,11 (s, 1H, HNZ), 10,28 + 10,30 (2 s, 0,6H + 0,3H, ArHNCO)

IR: (KBr) cm^{-1} 3363 (m), 2978 (m), 2880 (m), 1699 (s), 1682 (s), 1610 (s), 1557 (s), 1542 (s), 1456 (s), 1418 (s), 1218 (s), 985 (w), 772 (m), 698 (w)

C, H, N	ber	C: 64,23%	H: 6,35%	N: 8,03%	$\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_7$
	gef	C: 64,28%	H: 6,47%	N: 7,95%	F_w : 523,59

b) Direktcyclisierung des Dipeptides Boc-(L)Pro-AB(5-NHZ)-OAll, (37), [Schema 2.16]:

Abspalten der Allyl-Schutzgruppe: 2,00 g 37 (3,82 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift entschützt und als freie Carbonsäure 37a erhalten.

Ausbeute: 1,84 g (100% d. Th.)

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 1,84 g 37a (3,82 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift mit 6N HCl in Dioxan entschützt und als Hydrochlorid 37b erhalten.

Ausbeute: 1,87 g (100% d. Th.)

Direktcyclisierung des entschützten Dipeptides 37b: 1,87 g 37b (3,82 mmol) wurden mit 2,13 ml DIEA (12,22 mmol) in 200 ml DMF p. A. auf 80° C erhitzt. Dann wurde eine Lösung von 1,35 g TBTU (4,20 mmol) in 40 ml DMF p. A. sehr langsam zugetropft und 2 h bei 80° C gerührt. In der DC zeigte sich die Bildung eines Hauptproduktes und zweier Nebenprodukte. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand über Nacht in trockenem Ether gerührt. Der sich bildende Feststoff wurde abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Zur Isolierung des Hauptprodukts wurde das Rohprodukt zunächst über zwei Kieselgelsäulen (1.: Methylenchlorid/Methanol, 20:1; 2.: Methylenchlorid/Methanol, 10:1) vorgereinigt. Dann wurde das Hauptprodukt noch über eine RP-8-Säule (Methanol/Wasser, 1:10 → 1:5 → 1:2,5 → 1:1 → 2:1) gereinigt und mit der letzten Mischung eluiert. Das Produkt kristallisierte über Nacht aus den offenen Fraktionsgläsern aus. Es wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über P₄O₁₀ im Exsikkator getrocknet. Durch ESI-MS konnte gezeigt werden, daß es sich um das cyclische Tetrapeptid 38 handelte. Die beiden Nebenprodukte konnten als cyclisches Hexa- (39) und Octapeptid (40) identifiziert werden. Sie wurden in diesem Fall nicht weiter aufgearbeitet.

Ausbeute: 230 mg (17% d. Th.)

mp: > 250° C

[α]_D²⁵: -193,7° c=2, DMF

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,94-2,07 (m, 6H, 2 Pro-H(β) + 4 Pro-H(γ)), 2,18-2,26 (m, 2H, Pro-H(β)), 3,63-3,66 (m, 4H, Pro-H(δ)), 3,96 (m, 2H, Pro-H(α)), 5,22 (s, 4H, Z-CH₂), 7,11 + 7,14 (2 s, 2H + 2H, H(2) + H(6)), 7,41-7,52 (m, 10H, Z-H), 7,74 (s, 2H, H(4)), 9,83 (s, 2H, HNZ), 10,01 (s, 2H, ArHNCO)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3280 (s), 3091 (m), 2956 (m), 1728 (s), 1702 (s), 1678 (s), 1605 (s), 1539 (s), 1451 (s), 1410 (s), 1266 (s), 1219 (s), 1074 (m), 868 (m), 750 (m), 699 (m)

C, H, N	ber	C: 65,74%	H: 5,24%	N: 11,50%	C ₄₀ H ₃₈ N ₆ O ₈
	gef	C: 65,69%	H: 5,03%	N: 11,50%	F _w : 730,78

4.) Direktcyclisierung von Z-(L)Pro-AB(5-NHBoc)-OBn, 43

a) Synthese des Dipeptides Z-(L)Pro-AB(5-NHBoc)-OBn, 43, [Schema, 2.17]:

Darstellung von 3,5-Bis(tert-butyloxycarbonylamino)benzoesäurebenzylester, (41): 6,06 g **34** (17,20 mmol) wurden mit 4,33 g Natriumhydrogencarbonat (51,60 mmol) und 6,14 ml Benzylbromid (51,60 mmol) in 100 ml DMF p. A. 3 d gerührt. Dann wurde auf 600 ml Ethylacetat gegossen und dreimal mit je 150 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Ethylacetat in der Wärme gelöst und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Das Produkt kristallisierte in feinen, hellen Nadeln.

Ausbeute: 6,30g (83% d. Th.)

mp: 159° C

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,54 (s, 9H, Boc), 5,41 (s, 1H, Bn-CH₂), 7,41-7,54 (m, 5H, Bn-H), 7,81 (d, 2H, ⁴J_H=1,9 Hz, H(2) + H(6)), 8,05 (s, 1H, H(4)), 9,61 (s, 2H, HNBoc)

IR: (KBr) cm^{-1} 3367 (s), 2978 (m), 2933 (m), 1732 (s), 1700 (s), 1610 (s), 1539 (s), 1499 (s), 1368 (m), 1314 (s), 1157 (s), 971 (m), 869 (m), 772 (m), 748 (m), 696 (m)

C, H, N	ber	C: 65,14%	H: 6,83%	N: 6,33%	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$
	gef	C: 64,89%	H: 7,03%	N: 6,20%	$F_w: 442,51$

Abspalten der Boc Schutzgruppen: 6,30 g **41** (14,24 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift mit Trifluoressigsäure entschützt und als freies Diamin **23** isoliert.

Ausbeute: 3,44 g (100% d. Th.)

Darstellung von 3-Amino-5-tert-butyloxycarbonylaminobenzoessäurebenzylester, (42): 3,44 g **23** (14,24 mmol) wurden mit 2,48 ml DIEA (14,24 mmol) in 80 ml Methylenchlorid vorgelegt und auf 0°C gekühlt. Dann wurden 3,35 ml Boc_2O (15,66 mmol) in 80 ml Methylenchlorid langsam zugetropft und 2 h in der Kälte gerührt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt und das Lösungsmittel am nächsten Tag im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) gereinigt. Dabei wurde zunächst doppelt Boc-geschütztes Edukt **41** eluiert und dann das Produkt **42**. Durch anschließendes Eluieren mit Ethylacetat/Hexan, 2:1 konnte außerdem nicht umgesetztes Edukt **23** zurückgewonnen werden. Die rückgewonnenen Edukte wurden wieder für die Synthese eingesetzt, die sauberen Produktfraktionen wurden im Vakuum zur Trockne eingengt und mit Hexan angerieben. Der weiße Feststoff wurde abfiltriert, mit Hexan gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 3,07g (63% d. Th.)

mp: $139^\circ\text{-}141^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$: [500 MHz, d_6 -DMSO] δ 1,53 (s, 9H, Boc), 5,36 (s, 2H, NH_2), 5,41 (s, 1H, Bn- CH_2), 6,92 + 7,11 + 7,33 (3 m, 1H + 1H + 1H, H(2) + H(6) + H(4)), 7,41-7,52 (m, 5H, Bn-H), 9,33 (s, 1H, HNBoc)

IR: (KBr) cm^{-1} 3385 (m), 3342 (m), 3033 (w), 2979 (w), 1702 (s), 1607 (m), 1547 (m), 1439 (m), 1236 (s), 1161 (s), 975 (m), 867 (m), 769 (m), 757 (m), 699 (m), 678 (m)

C, H, N	ber	C: 66,65%	H: 6,48%	N: 8,18%	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$
	gef	C: 66,54%	H: 6,35%	N: 7,94%	$F_w: 342,39$

Darstellung des Dipeptides Z-(L)Pro-DAB-Boc-OBn, (43): 1,22 g **42** (3,56 mmol), 2,25 g PyCloP (5,34 mmol), 1,33 g Z-(L)Pro-OH (5,34 mmol) und 1,86 ml DIEA (10,68 mmol) wurden über Nacht in 100 ml trockenem Methylenchlorid gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden im Vakuum zur Trockne eingeeengt und der Rückstand mit Hexan angerieben. Der erhaltene Feststoff wurde abfiltriert, mit Hexan angerieben und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,00 g (98% d. Th.)

mp: 160° C

$[\alpha]_D^{25}$: -48,7° c=2, Methanol

$^1\text{H-NMR}$: [500 MHz, d_6 -DMSO] δ 1,56 (s, 9H, Boc), 1,90-2,03 (m, 3H, 1 Pro-H(β) + 2 Pro-H(γ)), 2,25-2,37 (m, 1H, Pro-H(β)), 3,48-3,60 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,42 (m, 1H, Pro-H(α)), 5,00-5,18 (m, 2H, Z- CH_2), 5,42 + 5,43 (2 s, 1H + 1H, -Bn- CH_2), 5,41 (s, 1H, Bn- CH_2), 7,17-7,54 (m, 10H, Bn-H + Z-H), 7,83 + 8,02 (2 m, 1H + 1H, H(6) + H(4)), 8,24 (m, 1H, H(2)), 9,69 (s, 1H, HNBoc), 10,32 (s, 1H, ArHNCO)

IR: (KBr) cm^{-1} 3317 (s), 3091 (w), 3033 (w), 2978 (m), 2884 (m), 1702 (s), 1608 (s), 1545 (s), 1453 (s), 1423 (s), 1356 (s), 1227 (s), 1160 (s), 1117 (s), 983 (m), 880 (m), 770 (s), 753 (s), 697 (s)

C, H, N	ber	C: 67,00%	H: 6,15%	N: 7,33%	$C_{32}H_{35}N_3O_7$
	gef	C: 66,74%	H: 6,26%	N: 7,23%	$F_w: 573,65$

b) Direktcyclisierung von Z-(L)Pro-DAB-Boc-OBn, (43), [Schema 2.18]:

Vollständiges Entschützen des Dipeptides 43: 2,00 g 43 (3,49 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung von Z- und Benzylschutzgruppen in Methanol hydriert. Um ein Ausfallen des entstehenden Betains aus der Lösung zu verhindern, wurden 1,2 Äquivalente DIEA zugesetzt. Das Produkt 43a wurde nach Entfernen des Lösungsmittels zweimal mit Methylenchlorid aufgenommen und im Vakuum zur Trockne eingengt, um Reste von Methanol und Base zu entfernen

Ausbeute: 1,23 g (100% d. Th.)

Direktcyclisierung des entschützten Dipeptides 43a: 5,00 g 43a (14,33 mmol) wurden mit 5,06 g TBTU (15,76 mmol) in einem Stickstoffkolben eingewogen und dreimal sekuriert. Unter Stickstoffgegenstrom wurden dann 500 ml DMF p. A., das vorher durch zweistündiges Spülen mit Stickstoff weitgehend sauerstofffrei gemacht worden war, zugegeben und die entstandene Lösung mit 5,48 ml DIEA (31,52 mmol) versetzt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das DMF im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde mit Ether angerieben, abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Über eine Kieselgelsäule (Aceton/Chloroform, 1:1) wurde aus der Produktmischung von cyclischem Tetra-, Hexa- und Octapeptid zunächst das Tetrapeptid 44 abgetrennt. Die Mischung aus Hexa- 45 und Octapeptid 46 wurde auf Kieselgel aufgezogen und über eine zweite Kieselgelsäule (Chloroform/Methanol, 15:1) getrennt. Alle drei Cyclopeptide wurden aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 44: 1,92 g 39% d. Th.
 45: 260 mg 5% d. Th.
 46: 110 mg 2% d. Th.

Massenspektrum:	44 : [FAB + NBA]	663 (M + H ⁺ , 45%)
		551 (M - 2 tBu + H ⁺ , 100%)
	45 : [FAB + NBA]	994 (M + H ⁺ , 15%)
		938 (M - tBu + H ⁺ , 6%)
		826 (M - 3 tBu + H ⁺ , 40%)
	46 : [FAB + NBA + NaI]	1347 (M + Na ⁺ , 100%)
		1247 (M - Boc + Na ⁺ , 6%)
		947 (M - 4Boc + Na ⁺ , 14%)

Charakterisierung 44:

mp: > 250° C

$[\alpha]_D^{25}$: -201,8° c=2, DMF

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,54 (s, 18H, Boc), 1,91 - 2,05 (m, 6H, 2 Pro-H(β) + 4 Pro-H(γ)), 2,19 - 2,24 (m, 2H, Pro-H(β)), 3,64 (m, 4H, Pro-H(δ)), 3,96 (dd, 2H, ³J_{aa}=8,5Hz, ³J_{ac}=1,6Hz, Pro-H(α)), 7,10 (s, 2H, H(6)), 7,16 (s, 2H, H(4)), 7,71 (s, 2H, H(2)), 9,62 (HNBoc), 9,80 (Pro-COHNArlyl)

¹³C-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 22,7 (Pro-C(γ)), 28,1 (Boc-CH₃), 31,2 (Pro-C(β)), 46,7 (Pro-C(δ)), 61,6 (Pro-C(α)), 79,4 (Boc-C(CH₃)₃), 107,9 (C(4)), 109,8 (C(6)), 111,1 (C(2)), 138,5 + 138,6 (C(3) + C(5)), 140,1 (C(1)), 152,7 (Boc-C=O), 169,2 (Aryl-C=O), 171,7 (Pro-C=O)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3494 (w), 3337 (m), 3271 (m), 3107 (w), 2983 (m), 1736 (s), 1683 (s), 1627 (s), 1602 (s), 1557 (s), 1453 (s), 1417 (s), 1366 (m), 1272 (m), 1238 (m), 1162 (s), 1081 (m), 876 (m), 758 (m), 712 (m)

C, H, N	ber	C: 59,99%	H: 6,51%	N: 12,35%	C ₃₄ H ₄₂ N ₆ O ₈ ·H ₂ O
	gef	C: 59,63%	H: 6,59%	N: 12,27%	F _w : 680,76

Kristallstrukturdaten von 44•H₂O: C₃₄H₄₂N₆O₈•2H₂O, M_w= 680,8; farblose Prismen 0,16×0,16×0,36 mm, tetragonal, P4₃2₁2 [no. 96], a=12,5767(2), c=21,4083(7) Å, V=3386,2(1) Å³, T=100 K, Z=4, D_x=1,335 g cm⁻³, λ=0,71073 Å, μ=0,98 cm⁻¹, Nonius Kappa CCD Diffraktometer, θ_{max}=30,18°, 17664 gemessene Reflexe, 4645 unabhängig, 2644 mit I>2σ(I). Die Struktur wurde Direkten Methoden (SHELXS-97) gelöst und mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (SHELXL-97) verfeinert, Chebyshev Wichtung auf F_o² Basis, R_I=0,051 [I>2σ(I)], wR₂=0,095 (alle Daten), 226 Parameter, die H-Atome am Peptid wurden mittels eines Modells rigider Gruppen in die Verfeinerung miteinbezogen, H-Atom an Solvensmolekül verfeinert mit isotropem adp (U_H=0,043(8) Å²), S=0,870; Restelektronendichte 0,24 e Å⁻³.

Charakterisierung 45:

mp: > 250° C

[α]²⁵_D: + 4,6° c=2, DMF

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,57 (s, 27H, Boc), 1,89 - 2,07 (m, 9H, 3 Pro-H(β) + 6 Pro-H(γ)), 2,32 – 2,39 (m, 3H, Pro-H(β)), 3,55 (m, 6H, Pro-H(δ)), 4,72 (m, 3H, Pro-H(α)), 7,18 (s, 3H, H(6)), 7,54 (s, 3H, H(4)), 8,09 (s, 3H, H(2)), 9,60 (s, 3H, HNBoc), 10,34 (s, 3H, Pro-COHNArlyl)

¹³C-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 24,9 (Pro-C(γ)), 28,5 (Boc-CH₃), 29,8 (Pro-C(β)), 49,7 (Pro-C(δ)), 60,0 (Pro-C(α)), 79,7 (Boc-C(CH₃)₃), 109,3 (C(4)), 110,6 (C(6)), 112,4 (C(2)), 138,8 (C(1)), 139,8 + 140,0 (C(3) + C(5)), 153,1 (Boc-C=O), 169,0 (Aryl-C=O), 170,8 (Pro-C=O)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3447 (s), 3286 (s), 3098 (m), 2978 (m), 2881 (w), 1700 (s), 1602 (s), 1543 (s), 1451 (s), 1420 (m), 1273 (m), 1239 (m), 1161 (s), 1077 (m), 872 (m), 759 (m),

C, H, N	ber	C: 55,58%	H: 6,86%	N: 11,44%	C ₅₁ H ₆₃ N ₉ O ₁₂ •6H ₂ O
	gef	C: 55,59%	H: 6,57%	N: 11,53%	F _w : 1102,21

Charakterisierung 46:

mp: > 250° C

$[\alpha]_D^{25}$: -50,9° c=2, DMF

$^1\text{H-NMR}$: [500 MHz, d_6 -DMSO, 140° C] δ 1,46 (s, 36H, Boc), 1,83 – 1,97 (m, 12H, 4 Pro-H(β) + 8 Pro-H(γ)), 2,20 (m, 4H, Pro-H(β)), 3,55 (m, 8H, Pro-H(δ)), 4,56 (m, 4H, Pro-H(α)), 7,23 (s, 4H, H(6)), 7,35 (s, 4H, H(4)), 7,75 (s, 4H, H(2)), 8,75 (s, 4H, HNBoc), 9,59 (s, 4H, Pro-COHNArlyl)

$^{13}\text{C-NMR}$: [500 MHz, d_6 -DMSO] δ 24,9 (Pro-C(γ)), 28,0 (Boc-CH₃), 29,7 (Pro-C(β)), 49,9 (Pro-C(δ)), 60,9 (Pro-C(α)), 79,2 (Boc-C(CH₃)₃), 110,0 (C(4)), 111,5 (C(6)), 112,1 (C(2)), 136,7 (C(1)), 139,1 + 139,6 (C(3) + C(5)), 152,6 (Boc-C=O), 167,6 (Aryl-C=O), 170,6 (Pro-C=O)

IR: (KBr) cm^{-1} 3448 (s), 3287 (s), 3099 (m), 2979 (m), 2882 (w), 1700 (s), 1600 (s), 1560 (s), 1449 (s), 1369 (m), 1275 (m), 1238 (m), 1160 (s), 1077 (m), 871 (m), 756 (m),

C, H, N	ber	C: 54,90%	H: 6,91%	N: 11,30%	$\text{C}_{68}\text{H}_{84}\text{N}_{12}\text{O}_{16}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$
	gef	C: 54,91%	H: 6,95%	N: 11,03%	$F_w: 1487,62$

4.4.4 Synthesen zu Kapitel 2.5

1.) Darstellung von cyclo-[(L)Pro-AP]₂, **49**, durch Direktcyclisierung [Schema 2.19]:

Darstellung des Dipeptides Z-(L)Pro-AP-OBn, **48:** In 35 ml trockenem Methylenchlorid wurden 690 mg 6-Amino-2-picolinsäurebenzylester (**47**) (3,00 mmol), 1,12 g Z-(L)Pro-OH (4,50 mmol) und 1,90 g PyCloP (4,50 mmol) gelöst und nach Zugabe von 1,56 ml DIEA (9,00 mmol) eine Woche bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselsäule mit Ethylacetat/Hexan 1:1 gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden im Vakuum zur Trockne eingengt. Nach mehrfachem Aufnehmen des öligen Rückstandes in trockenem Methylenchlorid und wiederholtem Einengen im Vakuum konnte das Produkt als weißer Feststoff erhalten werden. Der Feststoff wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet. Auf Grund der harzartigen Konsistenz des Produktes konnte der Schmelzpunkt nicht bestimmt werden.

Ausbeute: 1,41 g (100% d. Th.)

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,86-2,03 (m, 3H, 1 Pro-H(β) + 2 Pro-H(γ)), 2,24-2,36 (m, 1H, Pro-H(β)), 3,48-3,60 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,65 (m, 1H, Pro-H(α)), 5,00–5,18 (m, 2H, Z-CH₂), 5,46 (s, 2H, Bn-CH₂), 7,13–7,20 + 7,44–7,56 (2m, 1H + 9H, Bn-H + Z-H), 7,65 (m, 1H, H(3)), 7,83 (m, 1H, H(5)), 8,14 (m, 1H, H(4)), 11,06 (m, 1H, Pro-CONHArlyl)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3279 (s), 3033 (m), 2954 (m), 2880 (m), 1703(s), 1580 (s), 1535 (s), 1499 (m), 1455 (s), 1415 (s), 1356 (m), 1302 (s), 1243 (s), 1162 (s), 1080 (m), 986 (m), 826 (m), 767 (s), 696 (s), 587 (m)

C, H, N	ber	C: 67,96%	H: 5,48%	N: 9,14%	C ₂₆ H ₂₅ N ₃ O ₅
	gef	C: 67,87%	H: 5,50%	N: 8,94%	F _w : 459,50

Vollständiges Entschützen des Dipeptides **48:** 1,37 g **48** (3,07 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung von Z- und Benzylschutzgruppen in 45 ml Dioxan/15

ml Wasser hydriert. Um ein Ausfallen des entstehenden Betains aus der Lösung zu verhindern, wurden 1,2 Äquivalente DIEA zugesetzt. Das Produkt **48a** wurde nach Entfernen des Lösungsmittels zweimal mit Methylenchlorid aufgenommen und im Vakuum zur Trockne eingeengt um Reste von Wasser und Base zu entfernen

Ausbeute: 550 mg (76% d. Th.)

Direktyclisierung von des entschützten Dipeptides 48a: 550 mg **48a** (2,34 mmol) wurden mit 830 mg TBTU (2,57 mmol) in einem Stickstoffkolben eingewogen und dreimal sekuriert. Unter Stickstoffgegenstrom wurden dann 230 ml DMF p. A., das vorher durch zweistündiges Spülen mit Stickstoff weitgehend sauerstofffrei gemacht worden war, zugegeben und die entstandene Lösung mit 0,9 ml DIEA (5,15 mmol) versetzt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das DMF im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde mit Ether angerieben, abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Nur ein sehr geringer Teil des erhaltenen Rückstandes war in Methylenchlorid/Methanol löslich und wurde über eine Kieselgelsäule mit Methylenchlorid/Methanol 10:1 → 5:1 gereinigt. In der Hauptproduktfraktion konnte das cyclische Tetrapeptid **49** nachgewiesen werden. Der schwerlösliche Anteil des Reaktionsrückstandes wurde mit Methanol ausgekocht, abfiltriert, mit Methanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Der erhaltene Feststoff konnte einzig in Trifluoressigsäure gelöst werden. Das ¹H-NMR dieses Feststoffes zeigte, daß es sich wahrscheinlich um ein höheres cyclisches Oligomer von **48a** handelte. Eine massenspektrometrische Analyse war auf Grund der Schwerlöslichkeit nicht erfolgreich.

Ausbeute: **49**: 10 mg (2% d. Th.)

Massenspektrum: **49**: [FAB + NBA + NaI] 457 (M+ Na⁺)

2.) Darstellung von cyclo-[(L)Pro-AP]₂, 49, aus dem linearen Tetrapeptid [Schema 2.20]:

Cyclisierung von Boc-[(L)Pro-AP]₂-OBn, 50b: 2,56 g des Trihydrochlorides 50b (3,60 mmol), das nach der Methode von Kubik³⁴ dargestellt und vollständig entschützt worden war, wurde dreimal sekuriert und unter einer Argonatmosphäre in 360 ml DMF p. A., das vorher 1h mit Argon gespült worden war, gelöst. Danach wurden erst 3,30 ml DIEA (18,72mmol), dann eine Lösung von 1,27 g TBTU (3,96 mmol) in 40 ml DMF p. A. langsam zugetropft und die Reaktionslösung über Nacht unter Argon gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (Methylenchlorid/Methanol 10:1) vorgereinigt. Das Produkt 49 fiel als gelbes Öl an. Nach weiterer Aufreinigung über eine Kieselgelsäule (Aceton/Chloroform 1:3) kristallisierte das Produkt aus den Fraktionsgläsern in dicken Prismen mit 2 Kristallwasser pro Formeleinheit aus. Wurde aus Methylenchlorid/Methanol umkristallisiert, so wurde das Produkt mit nur einem Wasser pro Formeleinheit erhalten.

Ausbeute: 180 mg (12% d. Th.)

mp: > 250° C

$[\alpha]_D^{25}$: +162,2° c=2, DMF, 49·2H₂O

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,93-2,00 + 2,02-2,09 (2m, 2H + 2H, Pro-H(γ) + Pro-H(γ')), 2,17-2,24 (m, 2H, Pro-H(β)), (Pro-H(β')) überlagert von DMSO Signal bei 2,58), 3,78-3,87 (m, 4H, Pro-H(δ)), 5,77 (m, 2H, Pro-H(α)), 7,62 (dd, 2H, ³J_H=7,3 Hz, ⁴J_H=0,9 Hz, H(3)), 7,74 (dd, 2H, ³J_H=7,8 Hz, ⁴J_H=0,9 Hz, H(5)), 7,87 (m, 2H, H(4)), 10,45 (s, 2H, Pro-CONHAryl)

¹³C-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 22,5 (Pro-C(γ)), 32,9 (Pro-C(β)), 49,9 (Pro-C(δ)), 62,6 (Pro-C(α)), 117,1 (C(3)), 120,2 (C(5)), 139,5 (C(4)), 149,5 (C(2)), 150,4 (C(6)), 163,2 (Aryl-C=O), 173,0 (Pro-C=O)

IR: (KBr) cm^{-1} 3432 (s), 3295 (m), 2980 (w), 2880 (m), 1710 (s), 1617 (s), 1572 (s), 1543 (s), 1466 (s), 1423 (s), 1403 (s), 1343 (m), 1304 (s), 1157 (s), 1082 (m), 995 (m), 823 (m), 759 (s), 592 (m)

C, H, N	ber	C: 56,16%	H: 5,57%	N: 17,86%	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	gef	C: 56,17%	H: 5,54%	N: 17,63%	$F_w: 470,48$

Kristallstrukturdaten von $\underline{49} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 452,5$; farblose Prismen $0,06 \times 0,15 \times 0,25$ mm, tetragonal, $P4_32_12$ [no. 96], $a = 8,7268(2)$, $c = 28,0537(4)$ Å, $V = 2136,5(1)$ Å³, $T = 100$ K, $D_x = 1,407$ g cm^{-3} , $\lambda = 0,71073$ Å, $\mu = 1,03$ cm^{-1} , Stoe STADI 4 CCD Diffraktometer, $\theta = 4,59^\circ - 24,99^\circ$, 47810 gemessene Reflexe, 2081 unabhängig, 2149 mit $I > 2\sigma(I)$. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden (SHELXS-97) gelöst und mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (SHELXL-97) verfeinert, $R_1 = 0,0503$ $wR_2 = 0,0919$ [$I > 2\sigma(I)$], $R_1 = 0,0504$ $wR_2 = 0,0920$ (alle Daten), die H-Atome am Peptid wurden mittels eines Modells rigider Gruppen in die Verfeinerung miteinbezogen, $S = 1,132$; Restelektronendichte $+0,220/-0,172$ e Å⁻³.

3.) Darstellung von cyclo-[(*S,S*)Hyp-AB]₂, 51, [Schema 2.21]:

Die Ausgangsverbindung 53 wurde mir freundlicherweise von G. Heinrichs überlassen.

Abspalten der Benzylschutzgruppe: 580 mg Boc-[(*S,S*)Hyp(OAc)-AB]₂-OBn, 53 (0,77 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift in Methanol entschützt und als freie Carbonsäure 53a erhalten.

Ausbeute: 530 mg (100% d. Th.)

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 530 mg 53a (0,77 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift mit 6N HCl in Dioxan entschützt und als Hydrochlorid 53b erhalten.

Ausbeute: 630 mg (100% d. Th.)

Cyclisierung des entschützten Tetrapeptides 53b: 630 mg 53b (0,77 mmol) wurden in einem Stickstoffkolben dreimal sekuriert und unter einer Argonatmosphäre in 80 ml DMF p. A., das vorher eine Stunde mit Argon gespült worden war, gelöst. Nach Zugabe von 0,77 ml DIEA (4,4 mmol) wurde eine Lösung von 280 mg TBTU (0,88 mmol) in 10 ml DMF p. A. langsam zugetropft. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde das DMF im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde über eine Kieselgelsäule mit Methylenchlorid/Methanol 10:1 gereinigt. Das Produkt 51a kristallisierte sauber als Monohydrat aus den Fraktionsgläsern aus. Der weiße Feststoff wurde abfiltriert, mit wenig Methanol gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 240 mg (53% d. Th.)

mp: >250° C

$[\alpha]_D^{25}$: -176,8° c=2, DMF,

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 2,03 (s, 6H, CH₃CO), 2,09-2,13 (m, 2H, Pro-H(β)), 2,69-2,75 (m, 2H, Pro-H(β')), 3,62 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,10-4,19 (m, 4H, 2Pro-H(α) + 2Pro-H(δ')), 5,24-5,29 (m, 2H, Pro-H(γ)), 7,04 (bm, 2H, H(4)), 7,10 (d, 2H, ³J_H=7,6 Hz, H(6)), 7,36 (m, 2H, H(5)), 8,14 (s, 2H, H(2)), 9,81 (s, 2H, CONHAryl)

¹³C-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 21,2 (Acetyl-CH₃), 36,4 (Pro-C(β)), 52,2 (Pro-C(δ)), 61,3 (Pro-C(α)), 71,6 (Pro-C(γ)), 117,8 (C(2)), 119,9 (C(4)), 120,9 (C(6)), 129,3 (C(5)), 137,9 + 138,4 (C(3) + C(1)), 169,9 (Aryl-C=O), 170,5 + 171,0 (Pro-C=O + Acetyl-C=O)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3500 (m), 3273 (s), 3087 (s), 2881 (m), 1741 (s), 1703(s), 1630 (s), 1591 (s), 1559 (s), 1452 (s), 1417 (s), 1370 (m), 1228 (s), 1067 (m), 903 (m), 808 (m), 752 (m), 709 (w)

C, H, N	ber	C: 59,36%	H: 5,34%	N: 9,89%	C ₂₈ H ₂₈ N ₄ O ₈ ·H ₂ O
	gef	C: 59,52%	H: 5,32%	N: 9,60%	F _w : 566,57

Abspalten der Acetylschutzgruppen: 120 mg **51a** (0,24 mmol) wurden in 12 ml trockenem Methanol gelöst und nach Zugabe von 120 μ l DIEA über Nacht gerührt. Das Produkt fiel vollständig aus. Es wurde abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Nach Umkristallisation aus Methylenchlorid/Methanol fiel das Produkt **51** in dicken farblosen Prismen an.

Ausbeute: 80 mg (82% d. Th.)

mp: >250° C

$[\alpha]_D^{25}$: -44,4° c=2, DMF,

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,88-1,93 (m, 2H, Pro-H(β)), 2,47-2,53 (m, 2H, Pro-H(β')), (ein Signal unter Wassersignal: Pro-H(δ)), 3,98-4,01 (m, 2H, Pro-H(δ')), 4,08 (dd, 2H, ³J_{ae}=5,5 Hz, ³J_{aa}=8,7 Hz, Pro-H(α)), 4,33-4,36 (m, 2H, Pro-H(γ)), 5,22 (d, 2H, OH), 6,88 (bm, 2H, H(4)), 7,08 (d, 2H, ³J_H=7,6 Hz, H(6)), 7,36 (m, 2H, H(5)), 8,11 (s, 2H, H(2)), 9,79 (s, 2H, CONHAryl)

¹³C-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 39,1 (Pro-C(β)), 54,4 (Pro-C(δ)), 61,3 (Pro-C(α)), 68,1 (Pro-C(γ)), 117,3 (C(2)), 119,5 (C(4)), 121,0 (C(6)), 129,3 (C(5)), 138,1 + 138,4 (C(3) + C(1)), 169,9 (Aryl-C=O), 172,2 (Pro-C=O)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3422 (m), 3268 (s), 3088 (s), 2878 (w), 1671 (s), 1625 (s), 1619 (s), 1591 (s), 1559 (s), 1452 (s), 1417 (s), 1281 (m), 1208 (m), 1084 (m), 805 (m), 752 (m), 709 (w)

C, H, N	ber	C: 62,06%	H: 5,21%	N: 12,06%	C ₂₄ H ₂₄ N ₄ O ₆
	gef	C: 61,97%	H: 5,37%	N: 12,07%	F _w : 464,48

Kristallstrukturdaten von **51•H₂O:** C₂₄H₂₄N₄O₆•H₂O, M_w= 500,6 farblose Prismen, tetragonal, P4₁2₁2, a=9,735(2), c=24,880(9) Å, V=2357,9(11) Å³, T=293 K, Z=8, D_x=1,410 g cm⁻³, λ =0,70930 Å, μ =0,107 mm⁻¹, Nonius, Kappa CCD Diffraktometer, θ_{\max} =33,08°, 32536

gemessene Reflexe, 2414 unabhängig, 2149 mit $I > 2\sigma(I)$. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden (SHELXS-97) gelöst und mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (SHELXL-97) verfeinert, Chebyshev Wichtung auf F_o^2 Basis, $R_1=0,042$ [$I > 2\sigma(I)$], $wR_2=0,111$ (alle Daten), 154 Parameter, die H-Atome am Peptid wurden mittels eines Modells rigider Gruppen in die Verfeinerung miteinbezogen, die unabhängigen H-Atome am Solvensmolekül wurde mit isotropem ADP verfeinert, $S=1,109$; Restelektronendichte $+0,55/-0,568$ e \AA^{-3} .

4.4.5 Synthesen zu Kapitel 2.6

1.) Darstellung von Darstellung von cyclo-[(L)Pro-AB(CS)]₂, 55, [Schema 2.22]:

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 1,53 g 44 (2,31 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift mit 6N HCl in Dioxan entschützt und als Dihydrochlorid 44a erhalten.

Ausbeute: 1,35 g (100% d. Th.)

Umsetzung mit Cholsäure: 280 mg 44a (480 µmol), 620 mg Cholsäure (1,44 mmol) und 610 mg PyCloP (1,44 mmol) wurden in 20 ml trockenem Methylenchlorid suspendiert. Nach Zugabe von 500 µl DIEA (2,88 mmol) wurde gerührt, bis im DC kein freies aromatisches Amin mehr nachzuweisen war (ca. 2 Wochen). Das Methylenchlorid wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zunächst über eine Kieselgelsäule (Methylenchlorid/Methanol, 5:1), dann über eine RP-8-Säule (Methanol/Wasser, 1:5 → 1:2 → 1:1 → 4:1) gereinigt. Mit der letzten Mischung wurde das Produkt eluiert. Nach abschließender Reinigung über eine zweite Kieselgelsäule (Methanol/Ethylacetat, 1:6 → 1:1) konnte das Produkt 55 sauber als Heptahydrat erhalten werden. Bei Wiederholung des Versuchs wurde das Produkt auch mit 3,5 Wasser pro Formeleinheit erhalten.

Ausbeute: 60 mg (9% d. Th.)

mp: > 250° C

$[\alpha]_D^{25}$: -86,4° c=2, DMF, 55·3,5 H₂O

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 0,67 + 0,89 (2 s, 6H + 6H, Cholsäure-CH₃, 18-H₃ + 19-H₃), 1,04 (d, 6H, ³J_H=6,3 Hz, Cholsäure-CH₃, 21-H₃), 3,60-3,67 (m, 4H, Pro-H(δ)), 3,70 (m, 2H, H an OH-Cholsäure), 3,86 (m, 2H, H an OH-Cholsäure), 3,97 (dd, 2H, ³J_{ae}=1,5 Hz, ³J_{aa}=9,0 Hz, Pro-H(α)), 4,07 (d, 2H, ³J_H=3,3 Hz, OH-Cholsäure), 4,18 (d, 2H, ³J_H=3,3 Hz, OH-Cholsäure), 4,40 (d, 2H, ³J_H=4,3 Hz, OH-Cholsäure), 7,21 (s,

2H, H(6)), 7,35 (s, 2H, H(4)), 7,76 (s, 2H, H(2)), 9,85 (s, 2H, HNCO-Cholsäure), 10,02 (s, 2H, Pro-CONHAryl)

¹³C-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 23,0 (Pro-C(γ)), 30,7 (Pro-C(β)), 47,0 (Pro-C(δ)), 62,1 (Pro-C(α)), 71,3 + 70,8 + 66,6 (Cholsäure, C-OH), 110,2 (C(4)), 111,3 (C(6)), 112,4 (C(2)), 138,7 + 138,8 (C(3) + C(5)), 140,2 (C(1)), 169,4 (Aryl-C=O), 172,1 (Pro-C=O), 172,4 (Cholsäure-C=O)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3419 (s), 2937 (m), 2870 (m), 1676 (m), 1655 (m), 1602(s), 1560 (s), 1450 (s), 1420 (m), 1382 (m), (s), 1222 (m), 1077 (m), 1042 (m), 860 (m), 612 (s)

C, H, N	ber	C: 66,18%	H: 8,41%	N: 6,43%	C ₇₂ H ₁₀₂ N ₆ O ₁₂ ·3,5H ₂ O
	gef	C: 66,22%	H: 8,40%	N: 6,25%	F _w : 1306,68

2.) Alternative Synthese von cyclo-[(L)Pro-AB(CS)]₂, **55**, [Schema 2.23]:

Darstellung von cyclo-[(L)Pro-AB(CSAc₃)]₂, **56:** 680 mg **44a** (1,12 mmol), 1,39 g Cholsäureperacetat (2,61 mmol), das nach der Methode von Nakanishi hergestellt worden war,⁷² und 1,10 g PyCloP (2,61 mmol) wurden in einem Stickstoffkolben dreimal sekuriert und unter Argon in 20 ml trockenem Methylenchlorid suspendiert. Nach Zugabe von 1,40 ml DIEA (7,70 mmol) im Argongegenstrom wurde gerührt, bis die Reaktionslösung klar wurde (ca. 2 Wochen). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wurde das Rohprodukt erst durch eine Kieselgelsäule mit Aceton/Chloroform 1:1, dann über eine Kieselgelsäule mit Ethylacetat/Methanol 10:1 gereinigt. Reste von Trispyrrolidinophosphinoxid wurden durch eine RP-8-Säule (Methanol/ Wasser, 1:2 → 1:1 → 2:1 → 4:1) abgetrennt, wobei das Produkt mit der letzten Mischung eluierte. Das Produkt kristallisierte in den Fraktionsgläsern aus und konnte nach Abfiltrieren, gründlichem Waschen mit Wasser und Trocknen über Phosphorpentoxid im Exsikkator als Heptahydrat erhalten werden.

Ausbeute: 570 mg (31% d. Th.)

Charakterisierung von 56:

mp: > 250° C

$[\alpha]_D^{25}$: -37,6° c=2, DMF

$^1\text{H-NMR}$: [500 MHz, d_6 -DMSO] δ 0,77 + 0,97 (2 s, 6H + 6H, Cholsäure- CH_3), 0,85 (d, 6H, $^3J_{\text{H}}=6,3$ Hz, Cholsäure- CH_3), 2,05 + 2,08 + 2,15 (3s, 6H + 6H + 6H, Acetyl- CH_3), 3,60-3,67 (m, 4H, Pro-H(δ)), 3,96 (m, 2H, Pro-H(α)), 4,50 – 4,57 (m, 2H, **HC**-OAcetyl), 4,87 (bs, 2H, **HC**-OAcetyl), 4,06 (bs, 2H, **HC**-OAcetyl), 7,21 (s, 2H, H(6)), 7,35 (s, 2H, H(4)), 7,76 (s, 2H, H(2)), 9,85 (s, 2H, HNCO-Cholsäure), 10,02 (s, 2H, Pro-CONHAryl)

$^{13}\text{C-NMR}$: [500 MHz, d_6 -DMSO] δ 23,0 (Pro-C(γ)), 31,0 (Pro-C(β)), 47,0 (Pro-C(δ)), 62,1 (Pro-C(α)), 74,9 + 73,7 + 70,5 (Cholsäure, C-OAc), 109,1 (C(4)), 110,1 (C(6)), 111,3 (C(2)), 138,7 + 138,8 (C(3) + C(5)), 140,2 (C(1)), 169,4 (Aryl-C=O), 170,0 + 170,1 + 170,2 (Cholsäure, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 172,0 (Pro-C=O), 172,2 (Cholsäure-C=O)

IR: (KBr) cm^{-1} 3447 (s), 2952 (m), 2874 (w), 1734(s), 1603 (s), 1559 (s), 1449 (s), 1378 (s), 1252 (s), 1026 (m), 864 (m), 966 (w), 887 (w)

C, H, N	ber	C: 62,20%	H: 7,95%	N: 5,18%	$\text{C}_{84}\text{H}_{114}\text{N}_6\text{O}_{18} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	gef	C: 62,18%	H: 7,90%	N: 5,14%	$F_w: 1621,97$

Abspalten der Acetylschutzgruppen: In 16 ml trockenem Methanol wurden 160 mg 56 (0,1 mmol) gelöst und nach Zugabe von 60 mg Natriummethanolat bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Dabei kam die Reaktion auf der Stufe des einfach, dreifach, vierfach entschützten Derivates mehrfach zum Erliegen. Wurde dies beobachtet, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Methylenchlorid aufgenommen und erneut im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Dann wurde wieder in trockenem Methanol gelöst, frisches Methanolat zugegeben und weitergerührt.

Nach etwa einer Woche war die Reaktion beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (Methylenchlorid/Methanol 10:1 → 5:1) gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingengt. Das Produkt **55** wurde mit Ether angerieben, abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Charakterisierung entspricht der des bei direkter Kupplung mit Cholsäure erhaltenen Produktes.

Ausbeute: 80 mg (61% d. Th.)

3.) Darstellung von cyclo-[(L)Pro-AB(5-NHCONHPh)]₂, **60** [Schema 2.24]:

Darstellung von cyclo-[(L)Pro-AB(5-NHCONHPh)]₂, **60:** 680 mg **44a** (1,12 mmol) wurden in einem Stickstoffkolben dreimal sekuriert und unter Argon in 20 ml entgastem DMF p.A. suspendiert. Nach Zugabe von 410 µl DIEA (2,35 mmol) im Argongegenstrom ging das Edukt in Lösung. Es wurden noch 290 µl Phenylisocyanat (2,70 mmol) unter Argon zugesetzt, dann wurde über Nacht gerührt. Nach Zugabe von weiteren 290 µl Phenylisocyanat (2,70 mmol) wurde wiederum über Nacht gerührt und die Reaktionslösung anschließend auf 200 ml Wasser gegossen. Der sich bildende Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das Rohprodukt wurde zunächst über eine Kieselgelsäule (Methylenchlorid/ Methanol, 8:1) vorgereinigt, um den entstandenen Diphenylharnstoff abzutrennen. Dann wurde das Rohprodukt über eine RP-8-Säule (Dioxan/Wasser, 1:10 → 1:5 → 1:2 → 1:1) gereinigt, wobei das Produkt mit Dioxan/Wasser 1:1 eluierte. Da im DC noch immer geringfügige Verunreinigungen zu erkennen waren, wurde das Produkt auf Kieselgel aufgezogen und über eine Kieselgelsäule Chloroform/Methanol (6:1 → 5:1 → 4:1) gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingengt. Nach Auskochen mit Aceton wurde das Produkt als schwach gelbliches Pulver analysenrein erhalten.

Ausbeute: 500 mg (64% d. Th.)

mp: > 250° C

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -214,8° c=2, DMF

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,97-2,02 (m, 6H, 2 Pro-H(β) + 4 Pro-H(γ)), 2,20-2,27 (m, 2H, Pro-H(β)), 3,64-3,67 (m, 4H, Pro-H(δ)), 4,01 (m, 2H, Pro-H(α)), 7,04 (m, 2H, Phenyl-H_{para}), 7,12 (s, 2H, H(6)), 7,15 (s, 2H, H(4)), 7,34 (m, 4H, Phenyl-H_{meta}), 7,50 (m, 4H, Phenyl-H_{orto}), 7,71 (s, 2H, H(2)), 8,74 (s, 2H, -HNCONHPhenyl), 8,83 (s, 2H, HNCONHPhenyl), 9,86 (s, 2H, Pro-CONHAryl)

¹³C-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 23,0 (Pro-C(γ)), 31,5 (Pro-C(β)), 47,0 (Pro-C(δ)), 62,1 (Pro-C(α)), 109,1 (C(4)), 110,3 (C(6)), 111,3 (C(2)), 118,6 (Phenyl-C_{orto}), 122,4 (Phenyl-C_{para}), 129,2 (Phenyl-C_{meta}), 138,9 + 139,0 (C(3) + C(5)), 139,8 (Phenyl-C(1)), 140,6 (C(1)), 152,7 (Urea-C=O), 169,5 (Aryl-C=O), 172,0 (Pro-C=O)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3295 (s), 3101 (m), 2974 (m), 2878 (w), 1686(s), 1599 (s), 1545 (s), 1499 (s), 1445 (s), 1313 (m), 1208 (s), 864 (m), 755 (m), 694 (m), 636 (m), 523 (m)

C, H, N	ber	C: 63,50%	H: 5,33%	N: 15,58%	C ₃₈ H ₃₆ N ₈ O ₆ ·H ₂ O
	gef	C: 63,46%	H: 5,28%	N: 15,58%	F _w : 718,77

4.) Darstellung von cyclo-[(L)-Pro-AB(5-NHCONHPh)-(L)-Pro-AB], **61**

a) Darstellung des Dipeptides Z-(L)Pro-AB(5-NHBoc)-OAll, **63**, [Schema 2.25]:

Darstellung von 3-Amino-5-tert-butyloxycarbonylaminobenzoessäureallylester, **62:** 3,94 g des Dihydrochlorids **35a** (20,40 mmol) wurden in 150 ml Methylenchlorid bei 0° C vorgelegt. Nach Zugabe von 7,80 ml DIEA (44,88 mmol) wurden 4,58 ml Boc₂O (21,40 mmol) in 50 ml Methylenchlorid langsam zugetropft und anschließend 2h in der Kälte gerührt. Das Eisbad wurde entfernt und es wurde noch 2d bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung im Vakuum zur Trockne eingengt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Hexan

angerieben, abfiltriert, mit Hexan gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 3,71 g (62% d. Th.)

mp: 104° C

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 4,81 (m, 2H, Allyl-CH₂), 5,34 (ddd, 1H, ²J_H=2,9 Hz, ³J_H=10,4 Hz, ⁴J_H=1,3 Hz, CH=CH₂, *cis*H), 5,43 (bs, 2H, NH₂), 5,46 (ddd, 1H, ²J_H=2,9 Hz, ³J_H=17,3 Hz, ⁴J_H=1,3 Hz, CH=CH₂, *trans*H), 6,09 (m, 1H, CH=CH₂), 6,92 (s, 1H, H(6)), 7,08 (s, 1H, H(4)), 7,35 (s, 1H, H(2)), 9,34 (s, 1H, BocNH)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3352 (s), 2964 (m), 2880 (m), 1704(s), 1608 (s), 1547 (s), 1440 (m), 1370 (m), 1245 (s), 1162 (s), 989 (m), 870 (m), 770 (s)

C, H, N	ber	C: 61,63%	H: 6,90%	N: 9,58%	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₄
	gef	C: 61,77%	H: 7,05%	N: 9,45%	F _w : 292,33

Darstellung von Z-(L)Pro-AB(5-NHBoc)-OAlI, 63: In 100 ml trockenem Methylenchlorid wurden 1,46 g 62 (5,00 mmol), 1,88 g Z-(L)-Pro-OH (7,50 mmol), 3,48 g PyCloP (7,50 mmol) und 2,60 ml DIEA (15,00 mmol) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan, 1:1) gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Petrolether 40/60 angerieben, abfiltriert, mit Petrolether 40/60 gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 2,43 g (93% d. Th.)

mp: 90° C

[α]_D²⁵: -53,3° c=2, Methanol

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,56 (s, 9H, Boc), 1,90-2,03 (m, 3H, 1 Pro-H(β) + 2 Pro-H(γ)), 2,25-2,37 (m, 1H, Pro-H(β)), 3,48-3,60 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,44 (m, 1H, Pro-H(α)), 4,87 (m, 2H, Allyl-CH₂), 5,00-5,18 (m, 2H, Z-CH₂), 5,34 (bd, 1H, ³J_H=10,4 Hz, CH=CH₂, *cis*H), 5,48 (bd, 1H, ³J_H=17,3 Hz, CH=CH₂, *trans*H), 6,12 (m, 1H, CH=CH₂), 7,18-7,46 (m, 5H, Z-H), 7,84 (bs, 1H, H(6)), 8,06 (m, 1H, H(4)), 8,18 (m, 1H, H(2)), 9,71 (s, 1H, BocNH), 10,34 (m, 1H, Pro-CONHAryl)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3329 (s), 2978 (m), 1721 (s), 1701(s), 1685 (s), 1609 (s), 1544 (s), 1451 (s), 1425 (s), 1365 (s), 1230 (s), 1161 (s), 987 (m), 771 (m), 698 (w)

C, H, N	ber	C: 64,23%	H: 6,35%	N: 8,03%	C ₂₈ H ₃₃ N ₃ O ₇
	gef	C: 64,12%	H: 6,56%	N: 7,83%	F _w : 523,59

b) Darstellung des Tetrapeptides cyclo-[(L)Pro-AB(5-NHBoc)-(L)Pro-AB], 66, [Schema 2.26]:

Abspalten der Allylschutzgruppe: 2,43 g 63 (4,64 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift in THF entschützt und als freie Carbonsäure 63a erhalten.

Ausbeute: 2,34 g (100% d. Th.)

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 2,12 g des unsubstituierten Dipeptides 64 (5,00 mmol), das nach der Methode von S. Kubik³¹ hergestellt worden war, wurden nach der allgemeinen Vorschrift mit Trifluoressigsäure entschützt und als Hydrochlorid 64a erhalten.

Ausbeute: 1,68 g (93% d. Th.)

Darstellung von Z-(L)Pro-AB(5-NHBoc)-(L)Pro-AB-OBn, 65: In 120 ml trockenem Methylenchlorid wurden 2,34 g 63a (4,64 mmol), 1,68 g 64a (4,67 mmol), 1,98 g PyCloP (4,64 mmol) und 2,45 ml DIEA (14,07 mmol) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur

gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit Ethylacetat gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat/Hexan umkristallisiert, abfiltriert, mit Hexan gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 2,34 g (63% d. Th.)

mp: 141°-145° C

¹H-NMR: [300 MHz, d₆-DMSO, 100°C] δ 1,49 (s, 9H, Boc), 1,90-2,03 (m, 6H, 2 Pro-H(β) + 4 Pro-H(γ)), 2,23-2,34 (m, 2H, Pro-H(β)), 3,50-3,65 (m, 4H, Pro-H(δ)), 4,38 (m, 1H, Pro-H(α)), 4,62 (bs, 1H, Pro-H(α)), 5,00-5,13 (m, 2H, Z-CH₂), 5,38 (s, 2H, Bn-CH₂), 7,27-7,48 (m, 13H, 5 Z-H, 5 Bn-H, H(6) + H(6') + H(4')), 7,68 (m, 1H, H(4)), 7,83 (m, 1H, H(2')), 7,90 (m, 1H, H(5')), 8,24 (s, 1H, H(2)), 9,09 (s, 1H, BocNH), 9,79 + 10,01 (2s, 1H + 1H, 2 Pro-CONHArlyl)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3314 (s), 2978 (m), 1721 (s), 1701(s), 1685 (s), 1598 (s), 1560 (s), 1451 (s), 1420 (s), 1357 (m), 1235 (s), 1162 (s), 872 (w), 755 (m), 698 (m)

C, H, N	ber	C: 66,91%	H: 6,00%	N: 8,87%	C ₄₄ H ₄₇ N ₅ O ₉
	gef	C: 66,94%	H: 6,20%	N: 8,66%	F _w : 789,89

Entschützen des Tetrapeptides: 2,07 g **65** (2,62 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift zur Abspaltung von Z- und Benzylschutzgruppen in Methanol hydriert. Um ein Ausfallen des entstehenden Betains aus der Lösung zu verhindern, wurden 1,2 Äquivalente DIEA zugesetzt. Das Produkt **65a** wurde nach Entfernen des Lösungsmittels zweimal mit Methylenchlorid aufgenommen und im Vakuum zur Trockne eingengt, um Reste von Methanol und Base zu entfernen

Ausbeute: 1,52 g (100% d. Th.)

Cyclisierung des entschützten Tetrapeptides 65a: 1,51 g 65a (2,62 mmol), 930 mg TBTU (2,88 mmol) und 1,00 ml DIEA (5,76 mmol) wurden in 470 ml DMF p. A. über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das DMF im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Der Rückstand wurde mit Ether angerieben, abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Da sich dieser Rückstand als sehr schwerlöslich in Methanol und Methylenchlorid/Methanol erwies, wurde das Rohprodukt mit Methanol ausgekocht, filtriert, mit Methanol gewaschen und das so erhaltene analysenreine Produkt 66 über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 720 mg (50% d. Th.)

mp: >250° C

$[\alpha]_D^{25}$: -168,2° c=2, DMF,

¹H-NMR: [300 MHz, d₆-DMSO] δ 1,54 (s, 9H, Boc), 1,96-2,06 (m, 6H, 2 Pro-H(β) + 4 Pro-H(γ)), 2,16-2,29 (m, 2H, Pro-H(β)), 3,65 (m, 4H, Pro-H(δ)), 3,96 (m, 2H, Pro-H(α)), 6,86 (m, 1H, H(6')), 7,07 (m, 1H, H(4')), 7,11 (s, 1H, H(6)), 7,14 (s, 1H, H(4)), 7,38 (m, 1H, H(5')), 7,74 (s, 1H, H(2')), 8,08 (s, 1H, H(2)), 9,61 (s, 1H, BocNH), 9,79 + 9,81 (2s, 1H + 1H, 2 Pro-CONHAryl)

¹³C-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 23,0 + 23,1 (Pro-C(γ)), 28,4 (Boc-CH₃), 31,4 + 31,5(Pro-C(β)), 47,0 + 47,1 (Pro-C(δ)), 62,1 (Pro-C(α)), 79,8 (Boc-C(CH₃)₃), 108,8 (C(4)), 110,2 (C(6)), 111,3 (C(2)), 117,5 (C(2')), 119,7 (C(4')), 121,0 (C(6')), 129,4 (C(5')), 138,3 + 138,4 (C(3') + C(1')), 138,6 + 138,8 (C(3) + C(5)), 140,4 (C(1)), 153,0 (Boc-C=O), 169,5 (Aryl-C=O), 171,9 + 172,1 (Pro-C=O)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3435 (s), 3279 (s), 3093 (s), 2974 (m), 2877 (m), 1717 (s), 1703(s), 1685 (s), 1609 (s), 1544 (s), 1448 (s), 1449 (s), 1368 (m), 1236 (s), 1156 (s), 1074 (m), 993 (w), 868 (m), 794 (m), 752 (m), 704 (m)

C, H, N	ber	C: 62,58%	H: 6,16%	N: 12,58%	$C_{29}H_{33}N_5O_6 \cdot 0,5H_2O$
	gef	C: 62,26%	H: 6,27%	N: 12,61%	$F_w: 556,62$

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 600 mg **66** (1,10 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift in Dioxan/HCl entschützt und als Hydrochlorid **66a** erhalten.

Ausbeute: 660 mg (100% d. Th.)

Umsetzung mit Phenylisocyanat zu 61: 330 mg **66a** (550 μ mol) wurden in einem Stickstoffkolben dreimal sekuriert. Dann wurden im Argongegenstrom 20 ml DMF p. A., das vorher durch zweistündiges Spülen mit Argon weitgehend sauerstofffrei gemacht worden war, zugegeben und die entstandene Lösung mit 140 μ l DIEA (770 μ mol) versetzt. Es wurden 80 μ l Phenylisocyanat (660 μ mol) zugesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 60 ml Wasser abgebrochen. Das Produkt und der gebildete Diphenylharnstoff fielen direkt aus und wurden abfiltriert. Nach Trocknen im Exsikkator über Phosphorpentoxid wurde über eine Kieselgelsäule Methylchlorid/Methanol 10:1 \rightarrow 5:1 zunächst der Diphenylharnstoff abgetrennt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt, im Vakuum zur Trockne eingengt und der Rückstand über eine RP-8 Säule (Wasser \rightarrow Wasser/Methanol 2:1 \rightarrow 1:1) gereinigt, wobei das Produkt mit der letzten Mischung eluierte. Das Produkt **61** kristallisierte aus den Fraktionsgläsern aus. Der Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 130 mg (25% d. Th.)

mp: $>250^\circ C$

$[\alpha]_D^{25}$: $-202,6^\circ$ c=2, DMF

1H -NMR: [300 MHz, d_6 -DMSO] δ 1,98-2,06 (m, 6H, 2 Pro-H(β) + 4 Pro-H(γ)), 2,22-2,29 (m, 2H, Pro-H(β)), 3,65 (m, 4H, Pro-H(δ)), 3,96 + 4,01 (2m, 1H + 1H, Pro-H(α)), 6,87 (d, 1H, H(6')), 7,04 (m, 1H, Phenyl-H_{para}), 7,07 (d, 1H, H(6)), 7,13 (bs, 2H, H(4) + H(4')), 7,34-7,40 (m, 3H, 2

Phenyl-H_{meta} + H(5')), 7,50 (m, 2H, Phenyl-H_{orto}), 7,74 (s, 1H, H(2')), 8,08 (s, 1H, H(2)), 8,83 (s, 1H, -HNCONHPhenyl), 8,90 (s, 1H, HNCONHPhenyl), 9,83 + 9,84 (2s, 1H + 1H, 2 Pro-CONHAryl)

¹³C-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 23,0 + 23,1 (Pro-C(γ)), 31, 5(Pro-C(β)), 47,0 + 48,9 (Pro-C(δ)), 62,1 + 62,2 (Pro-C(α)), 109,0 (C(4)), 110,3 (C(6)), 111,3 (C(2)), 117,5 (C(2')), 118,6 (Phenyl-C_{orto}), 119,7 (C(4')), 121,0 (C(6')), 122,4 (Phenyl-C_{para}), 129,2 (Phenyl-C_{meta}), 129,4 (C(5')), 138,4 + 138,6 (C(3') + C(1')), 139,0 + 139,1 (C(3) + C(5)), 139,8 (Phenyl-C(1)), 140,6 (C(1)), 152,7 (Urea-C=O), 169,5 + 169,6 (Aryl-C=O), 171,9 + 172,1 (Pro-C=O)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3355 (s), 3087 (m), 2976 (m), 1685 (s), 1655 (s), 1610 (s), 1599 (s), 1544 (s), 1499 (m), 1450 (m), 1417 (s), 1218 (s), 981 (w), 868 (w), 799 (m), 752 (m), 694 (m)

C, H, N	ber	C: 63,69%	H: 5,52%	N: 14,37%	C ₃₁ H ₃₀ N ₆ O ₅ ·H ₂ O
	gef	C: 63,86%	H: 5,51%	N: 14,29%	F _w : 584,62

4.) Darstellung des Tetrapeptides cyclo-[(L)Pro-AB(5CH₂NHCONHPh)]₂, **67**

a) Darstellung des Dipeptides Boc-(L)Pro-AB(5CH₂N₃)-OMe, **73**, [Schema 2.27]:

Darstellung von 3-Azidomethyl-5-tert-butyloxycarbonylaminobenzoessäuremethylester, **72:**
 1,72 g 3-Bromomethyl-5-tert-butyloxycarbonylaminobenzoessäuremethylester⁴ (**71**) (5 mmol) und 0,72 g Natriumazid (11 mmol) wurden in 70 ml trockenem Methanol gelöst und 2h zum Sieden erhitzt. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum zur Trockne eingengt, in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt worden war, wurde der Rückstand aus Hexan mit wenig Ethylacetat umkristallisiert. Das Produkt fiel in feinen weißen Nadeln an, die abfiltriert, mit wenig Hexan gewaschen und im Exsikkator getrocknet wurden.

Ausbeute: 820 mg (54% d. Th.)

mp: 56° C

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,57 (s, 9H, Boc), 3,93 (s, 3H, CH₃), 4,59 (s, 2H, CH₂), 7,63 (s, 1H, H(6)), 7,80 (s, 1H, H(4)), 8,18 (s, 1H, H(2)), 9,77 (HNBoc)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3357 (s), 3087 (w), 2978 (m), 2099 (s), 1712 (s), 1609 (s), 1547 (s), 1458 (s), 1429 (s), 1350 (s), 1251 (s), 1160 (s), 1066 (m), 997 (s), 872 (s), 766 (s), 658 (s)

C, H, N	ber	C: 54,89%	H: 5,92%	N: 18,29%	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₄
	gef	C: 54,84%	H: 6,00%	N: 18,30%	F _w : 306,32

[4] Dargestellt nach der Methode von S. Kubik, unveröffentlicht.

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 800 mg **72** (2,55 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift mit 6N HCl in Dioxan entschützt und als Hydrochlorid **72a** erhalten.

Ausbeute: 780 mg (100% d. Th.)

Darstellung von Boc-(L)Pro-AB(5CH₂N₃)-OMe, 73: In 50 ml trockenem Methylenchlorid wurden 780 mg **72a** (2,55 mmol), 1,64 mg PyCloP (3,90 mmol), 0,84 mg Boc-(L)Pro-OH (3,90 mmol) und 1,81 ml DIEA (10,40 mmol) gelöst und über Nacht gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (Ethylacetat/Hexan 1:2) gereinigt. Die sauberen Produktfraktionen wurden zur Trockne eingengt und das Produkt als Öl erhalten.

Ausbeute: 620 mg (61% d. Th.)

Massenspektrum: **73**: [FAB + NBA]

426 (M + Na ⁺ , 15%)
404 (M + H ⁺ , 12%)
348 (M – tBu + H ⁺ , 20%)
304 (M – Boc + H ⁺ , 55%)
289 (304 – CH ₃ , 10%)
57 (tBu + H ⁺ , 100%)

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,85-2,01 (m, 3H, 1 Pro-H(β) + 2 Pro-H(γ)), 2,20-2,32 (m, 1H, Pro-H(β)), 3,41-3,45 + 3,49-3,54 (2m, 1H + 1H, 2 Pro-H(δ)), 4,26-4,29 + 4,32-4,34 (2m, 0,4 H + 0,6 H, Pro-H(α)), 4,64 (s, 2H, CH₂N), 7,72 (s, 1H, H(4)), 8,00 (s, 1H, H(6)), 8,32 (s, 1H, H(2)), 10,36 (s, 2H, Pro-CONHAryl)

b) Darstellung des cyclischen Tetrapeptides cyclo-[(L)Pro-AB(5CH₂N₃)₂, 74, [Schema 2.28]:

Abspalten der Methylschutzgruppe: 620 mg **73** (1,54 mmol) wurden in 10 ml Dioxan gelöst und nach Zugabe von 10 ml 1N NaOH 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Dioxan wurde entfernt, der Rückstand mit Wasser verdünnt und mit Ethylacetat

überschichtet. Dann wurde mit 1,5 g Kaliumhydrogensulfat angesäuert. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wäßrige Phase noch zweimal mit Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser gewaschen, und im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde erneut in Methylenchlorid aufgenommen und wiederum im Vakuum zur Trockne eingengt. Auf diese Weise wurde das Produkt als freie Carbonsäure **73a** erhalten.

Ausbeute: 590 mg (98% d. Th.)

Abspalten der Boc-Schutzgruppe: 590 mg **73a** (1,51 mmol) wurden nach der allgemeinen Vorschrift mit 6N HCl in Dioxan entschützt und als Hydrochlorid **73b** erhalten.

Ausbeute: 530 mg (100% d. Th.)

Direktcyclisierung des entschützten Dipeptides 73b: 530 mg **73b** (1,51 mmol) und 540 mg TBTU (1,66 mmol) wurden in einen Stickstoffkolben eingewogen und dreimal sekuriert. Unter einer Argonatmosphäre wurden 55 ml DMF p. A. zugegeben, das vorher 1 h mit Argon gespült worden waren, sowie 0,92 ml DIEA (5,29 mmol). Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum abkondensiert und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (Methylenchlorid/Methanol 20:1) gereinigt. Das Produkt kristallisierte aus den Fraktionsgläsern aus. Es wurde abfiltriert, mit wenig Methanol gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 240 mg (59% d. Th.)

mp: >250° C

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,95-2,05 (m, 6H, 2 Pro-H(β) + 4 Pro-H(γ)), 2,20-2,28 (m, 2H, Pro-H(β)), 3,68 (m, 4H, Pro-H(δ)), 3,98 (m, 2H, Pro-H(α)), 4,53 (m, 4H, CH₂N), 6,87 (s, 2H, H(4)), 7,09 (s, 2H, H(6)), 8,07 (s, 2H, H(2)), 9,93 (s, 2H, Pro-CONHArlyl)

IR: (KBr) cm^{-1} 3449 (s), 3282 (m), 3107 (m), 2971 (m), 2889 (w), 2101 (s), 1701 (m), 1686 (s), 1655 (m), 1618 (s), 1599 (s), 1561 (m), 1450 (s), 1421 (s), 1342 (m)

C, H, N	ber	C: 57,56%	H: 4,83%	N: 25,82%	$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_{10}\text{O}_4$
	gef	C: 57,41%	H: 4,95%	N: 25,85%	$F_w: 542,56$

c) Darstellung des harnstoffsubstituierten Rezeptors 70, [Schema 2.28]:

Hydrieren des Azids: 220 mg 74 (0,41 mmol) und 0,81 ml 1N HCl (0,81 mmol) wurden in 40 ml Methylenchlorid/Methanol 1:1 gelöst und nach Zugabe von 10 mg Pd (10%) auf Aktivkohle unter einer Wasserstoffatmosphäre hydriert. Nach einer Stunde war die Reaktion beendet. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum zu Trockne eingengt und das Hydrochlorid 75 im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 220 mg (95% d. Th.)

Umsetzung mit Phenylisocyanat: 220 mg 75 (0,41 mmol) wurden in einen Stickstoffkolben eingewogen und dreimal sekuriert. Unter einer Argonatmosphäre wurden 10 ml DMF p. A. zugegeben, welcher vorher 1 h mit Argon gespült worden waren, sowie 0,14 ml DIEA (0,82 mmol). Dann wurden 0,13 ml Phenylisocyanat (1,20 mmol) zugefügt. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum abkondensiert und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (Aceton/Chloroform 2:1) gereinigt. Der als Nebenprodukt entstandene Diphenylharnstoff wurde mit Aceton/Chloroform 2:1 eluiert. Dann wurde das Laufmittel auf Chloroform/ Methanol 5:1 umgestellt und das Produkt 70 sauber eluiert. Das Produkt kristallisierte aus den Fraktionsgläsern aus. Es wurde abfiltriert, mit wenig Methanol gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Auf Grund der geringen Ausbeute konnte der Drehwert nicht bestimmt werden.

Ausbeute: 20 mg (7% d. Th.)

mp: $>250^\circ \text{C}$

¹H-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 1,95-2,05 (m, 6H, 2 Pro-H(β) + 4 Pro-H(γ)), 2,20-2,26 (m, 2H, Pro-H(β)), 3,61-3,70 (m, 4H, Pro-H(δ)), 3,95 (m, 2H, Pro-H(α)), 4,31 (dd, 2H, ²J_H= 15,9Hz, ³J_H= 5,5Hz, CH₂N), 4,39, (dd, 2H, ²J_H= 15,9Hz, ³J_H= 6,2Hz, CH₂N), 6,70 (t, 2H, ³J_H= 5,8Hz, CH₂NH), 6,81 (s, 2H, H(4)), 6,98 (m, 2H, Phenyl-H_{para}), 7,01 (s, 2H, H(6)), 7,29 (m, 4H, Phenyl-H_{meta}), 7,47 (d, 4H, ³J_H= 8,2Hz, Phenyl-H_{orto}), 7,99 (s, 2H, H(2)), 8,70 (s, 2H, -HNCONHPhenyl), 9,87 (s, 2H, Pro-CONHAryl)

¹³C-NMR: [500 MHz, d₆-DMSO] δ 23,0 (Pro-C(γ)), 31,5 (Pro-C(β)), 47,1 (Pro-C(δ)), 62,2 (Pro-C(α)), 65,3 (CH₂N), 116,0 (C(2)), 118,0 (Phenyl-C_{orto}), 118,3 (C(4)), 119,6 (Phenyl-C_{para}), 121,5 (C(6)), 129,0 (Phenyl-C_{meta}), 138,3 + 138,5 (C(3) + C(5)), 140,7 (Phenyl-C(1)), 142,2 (C(1)), 155,6 (Urea-C=O), 169,5 (Aryl-C=O), 172,0 (Pro-C=O)

IR: (KBr) cm⁻¹ 3406 (s), 3101 (m), 2970 (m), 2888 (w), 1686(s), 1671 (s), 1600 (s), 1550 (s), 1499 (s), 1442 (s), 1314 (m), 1231 (s), 757 (m), 694 (m)

C, H, N	ber	C: 59,99%	H: 6,04%	N: 13,99%	C ₄₀ H ₄₀ N ₈ O ₆ · 4H ₂ O
	gef	C: 60,18%	H: 5,86%	N: 13,80%	F _w : 800,87

Liste der verwendeten Abkürzungen

AB	3-Aminobenzoessäure
AllBr	Allylbromid
AP	6-Aminopicolinsäure
BnBr	Benzylbromid
Boc₂O	Di-tert.-butyldicarbonat
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
NBA	Nitrobenzylalkohol
PyCloP	Chlorotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
Py₃PO	Trispyrrolidinophosphinoxid
Suc	2 <i>S</i> -Aminosuccinimid
TBTU	O-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Z-Cl	Benzylchlorformiat

Literaturverzeichnis

- [1] Hartley, J. H.; James, T. D.; Ward, C. J., *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1*, **2000**, 3155-3184.
- [2] a) Pedersen, C. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 2495-2496. b) *Crown Compounds, Their Characteristics and Applications. Studies in Organic Chemistry* 12, Hiroka, M. (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1982.
- [3] Sonderheft: Molecular Recognition, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1741-2076.
- [4] Gattuso, G.; Nepogodiev, S. A.; Stoddart, J. F., *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1919-1958.
- [5] Gutsche, C. D., *Calixarenes*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, 1989.
- [6] a) Szejtli, J., *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1743-1753. b) Seel, C.; Vögtle, F., *Angew. Chem.*, **1992**, 104, 542-563.
- [7] *Calixarenes, A Versatile Class of Macrocyclic Compounds*, J. Vicens, V. Böhmer, (Hrsg.), Kluwer, Dordrecht, 1991.
- [8] a) Beer, P. D.; Cadman, J., *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 205, 131-155. b) Gale, P. A.; Anzenbacher, P., Jr.; Sessler, J. L., *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, 222, 3-32. c) Stephan, H.; Krüger-Rambusch, T.; Gloe, K.; Hasse, W.; Ahlers, B.; Cammann, K.; Rissanen, K.; Brodesser, G.; Vögtle, F., *Chem. Eur. J.*, **1998**, 4, 434-440. d) van der Veen, N. J.; Flink, S.; Deij, M. A.; Egberink, R. J. M.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 6112-6113 und hierin zitierte Literatur. e) O'Neill, S.; Kane, P.; McKervery, M. A.; Diamond, D., *Anal. Commun.*, **1998**, 35, 127-131 und hierin zitierte Literatur. f) van der Veen, N. J.; Rozniecka, E.; Woldering, L. A.; Chudy, M.; Huskens, J.; van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N., *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 4878-4886.
- [9] a) de Mendoza, J.; *Chem. Eur. J.*, **1998**, 4, 1373-1377. b) Rebek, J., Jr., *Acc. Chem. Res.*, **1999**, 32, 278-286. c) Rebek, J., Jr., *Heterocycles*, **2000**, 52, 493-504.
- [10] a) Molenveld, P.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N., *Chem. Soc. Rev.*, **2000**, 29, 75-86. b) Baldini, L.; Bracchini, C.; Cacciapaglia, R.; Casnati, A.; Mandolini, L.; Ungaro, R., *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 1322-1330. c) Chen, J.; Rebek, J., Jr., *Org. Lett.*, **2002**, 4, 327-329.
- [11] Atwood, J. L.; Barbour, L. J.; Hardie, M. J.; Raston, C. L., *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, 222, 3-32.
- [12] McKervery, M. A.; Schwing-Weill, M.-J.; Arnaud-Neu, F., *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Lehn, J.-M., Atwood, J. L., Davies, J. E. D., McNicol, D. D., Vögtle, F., (Hrsg.), Pergamon Press, Oxford 1996, Vol. 1, pp 537-603.

-
- [13] Ma, J. C.; Dougherty, D. A.; *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1303-1324.
- [14] Gutsche, C. D., *Calixarenes*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, 1989.
- [15] a) Takeshita, M.; Shinkai, S., *Bull Chem. Soc. Jpn.*, **1995**, *68*, 1088-1097 und hierin zitierte Literatur. b) Ikeda, A.; Shinkai, S., *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1713-1734 und hierin zitierte Literatur.
- [16] Böhmer, V., *Angew. Chem.*, **1995**, *107*, 785-818.
- [17] a) Beer, P. D.; Drew, M. G. B.; Heseck, D.; Shade, M.; Szemes, F., *Chem. Commun.*, **1996**, *14*, 2161-2162. b) Beer, P. D.; Drew, M. G. B.; Heseck, D.; Nam, K. C., *Chem. Commun.*, **1997**, *15*, 107-108. c) Morzherin, Y.; Rudkevich, D. M.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N., *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 7602-7605. d) Scheerder, J.; Fochi, M.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N., *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 7815-7820. f) Scheerder, J.; Engbersen, J. F. J.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Reinhoudt, D. N., *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 6448-6454. g) Beer, P. D.; Gale, P. A.; Heseck, D., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 767-770.
- [18] Frish, L.; Sansone, F.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Cohen, Y., *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 5026-5030.
- [19] a) Hamuro, Y.; Calama, M. C.; Park, H. S.; Hamilton, A. D., *Angew. Chem.*, **1997**, *109*, 2797-2800. b) Casnati, A.; Fabbi, M.; Pelizzi, N.; Pochini, A.; Sansone, F.; Ungaro, R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 2699-2704.
- [20] Rincón, A. M.; Prados, P.; de Mendoza, J., *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 640-644.
- [21] a) Takeuchi, M.; Ikeda, M.; Sugasaki, A.; Shinkai, S., *Acc. Chem. Res.*, **2001**, *34*, 865-873. b) Scheerder, J.; van Duynhoven, J. P. M.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N., *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 1172-1175.
- [22] a) Cram, D. J.; Cram, J. M., *Container Molecules and their Guests*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, Vol. 4. b) Jasat, A.; Sherman, J. C., *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 931-967. c) Asfari, Z.; Böhmer, V.; Harrowfield, J.; Vicens, J. (Hrsg.), *Calixarenes 2001*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001. d) Starnes, S. D.; Rudkevich, D. M.; Rebek, J., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 4659-4669. Warmuth, R.; Yoon, J., *Acc. Chem. Res.*, **2001**, *34*, 95-105.
- [23] a) Gale, P. A.; Sessler, J. L.; Král, V., *Chem Commun.*, **1998**, 1-8. b) Gale, P. A.; Sessler, J. L.; Král, V.; Lynch, V. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5140-5141. c) Anzenbacher, P., Jr.; Try, A. C.; Miyaji, H.; Jursikova, K.; Lynch, V. M.; Marquez, M.; Sessler, J. L.; *J. Am.*

Chem. Soc., **2000**, *122*, 10268-10272. d) Schmidtchen, F. P., *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 431-434 und hierin zitierte Literatur.

[24] Ibach, S.; Prautsch, V.; Vögtle, F., *Acc. Chem. Res.*, **1999**, *32*, 729-740.

[25] a) Ishida, H.; Suga, M.; Donowaki, K.; Ohkubo, K. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 5374-5375.

b) Ishida, H.; Suga, M.; Donowaki, K.; Ohkubo, K.; Shimose, K., *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, 8987-8990.

[26] Böhmer, V., *Liebigs Ann./Recueil*, **1997**, 2019-2030.

[27] Rizo, J.; Gierasch, L. M., *Annu. Rev. Biochem.*, **1992**, *61*, 387-418.

[28] a) Ochinnikov, Y. A.; Ivanov, V. T.; Shkrob, A. M., *Membrane Active Complexons*, Elsevier, Amsterdam, **1974**. b) Ochinnikov, Y. A.; Ivanov, V. T., *Tetrahedron*, **1975**, *31*, 2177-2209. c) Roeske, R. W.; Kennedy, S. J., *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Weinstein, B. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, 1983, Vol. 7, pp 205-257.

[29] Ranganathan, D., *Acc. Chem. Res.*, **2001**, *34*, 919-930.

[30] Kubik, S.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 5846-5855.

[31] Kubik, S.; Goddard, R., *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 9475-9486.

[32] a) Kubik, S.; Goddard, R., *Chem. Commun.*, **2000**, 633-634. b) Kubik, S.; Goddard, R., *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 311-322.

[33] Berl, V.; Huc, I.; Khoury, R. G.; Lehn, J.-M., *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 2798-2809.

[34] Kubik, S.; Goddard, R.; Kirchner, R.; Nolting, D.; Seidel, J., *Angew. Chem.*, **2001**, *113*, 2722-2725.

[35] Kubik, S.; Bitta, J., *Org. Lett.*, **2001**, *17*, 2637-2640.

[36] Ranganathan, D.; Haridas, V.; Madhusudanan, K. P.; Roy, R.; Nagaraj, R., John, G. B.; Sukhaswami, M. B., *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 1193-1195.

[37] a) Kelly, T. R.; Kim, M. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 7072-7080. b) Raposo, C.; Almaraz, M.; Martín, M.; Weinrich, V.; Mussóns, M. L.; Alcázar, V.; Caballero, M. C.; Morán, J. R., *Chem. Lett.*, **1995**, 759-760. c) Jagessar, R. C.; Shang, M.; Scheidt, W. R.; Burns, D. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 11684-11692. d) Snellik-Ruël, B. H. M.; Antonisse, M. M. G.; Engbersen, J. F. J.; Timmerman, P.; Reinhoudt, D. N., *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 165-170. e) Beispiel mit Thioharnstoff: Bühlmann, P.; Nishizawa, S.; Xiao, K. P.; Umezawa, Y., *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 1647-1654.

[38] Bisson, A. P.; Lynch, V. M.; Monahan, M.-K. C.; Anslyn, E. V., *Angew. Chem.*, **1997**, *109*, 2435-2437.

-
- [39] Budka, J.; Lhoták, P.; Michlová, V.; Stibor, I., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 1583-1586.
- [40] Ranganathan, D.; Lakshmi, C., *Chem. Commun.*, **2001**, 1250-1251.
- [41] a) Rebek, Jr., J., *Chem. Commun.*, **2000**, 637-643. b) Vyotsky, M. O.; Thondorf, I.; Böhmer, V., *Angew. Chem.*, **2000**, *112*, 1309-1315. c) González, J. J.; Ferdiani, R.; Albertini, E.; Blasco, J. M.; Arduini, A.; Pochini, A.; Prados, P.; de Mendoza, J., *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 73-80.
- [42] Ranganathan, D.; Lakshmi, C.; Karle, I. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 6103-6107.
- [43] Kubik, S.; Bitta, J.; Goddard, R.; Kubik, D.; Pohl, S., *Mater. Sci. Eng. C*, **2001**, *18*, 125-133.
- [44] Delarue, S.; Sergheraert, C., *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 5487-5490.
- [45] Bodansky, M.; Martinez, J., *Sidereaktionen in Peptide Synthesis in The Peptides*, Gross, E.; Meierhofer, J. (Hrsg.), Academic Press, New York, 1983, Vol. 5, 143-152.
- [46] Radkiewicz, J. L.; Zipse, H.; Clarke, S.; Houk, K. N., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 3499-3506 und hierin zitierte Literatur.
- [47] Samukov, V.V.; Kalashnikov, V. V.; Shval'e, A. F.; Ofitserov, V. I., *J. Gen. Chem. USSR. (Engl. Transl.)*, **1989**, *59*, 621-628.
- [48] Schroeder, E.; Klieger, E., *Liebigs Ann. Chem.*, **1964**, *673*, 208-220.
- [49] Belshaw, P. J.; Mzengeza, S.; Lajoie, G. A., *Synth. Commun.*, **1990**, *20*, 3157-3160.
- [50] Arai, I.; Muramatsu, I., *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 121-123.
- [51] Diplomarbeit S. Pohl, Düsseldorf, 1998.
- [52] Diplomarbeit J. Bitta, Düsseldorf, 1999.
- [53] Kumar, A.; Meijer, E. W., *Chem. Commun.*, **1998**, *16*, 1629-1630.
- [54] Kessler, H., *Angew. Chem.*, **1982**, *94*, 509-520.
- [55] Karle, I. L., *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Groß, E.; Meienhofer, J., (Hrsg.), Academic Press, New York, 1981, Vol. 4, pp. 1-54.
- [56] Pohl, S.; Goddard, R.; Kubik, S., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 7555-7558 und hierin zitierte Literatur.
- [57] z. B. McEwan, I.; Ottosson, K., *Biopolymers*, **1993**, *33*, 1377-1387. b) Gupta, S.; Peiser, G.; Nakajima, T.; Hwang, Y.-S., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 6009-6012. c) Seebach, D.; Bezençon, O.; Jaun, B.; Pietzonka, T.; Matthews, J. L.; Kühnle, F. N. M.; Schweizer, W. B., *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*, 588-608.
- [58] Stauffer, D. A.; Dougherty, D. A., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 6039-6042.
- [59] Connors, K. A., *Binding Constants*, Wiley, New York, 1987.

-
- [60] Blanda, M. T.; Horner, J. H.; Newcomb, M., *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 4626-4636.
- [61] Werte übernommen aus a) Kelly, T. R.; Kim, M. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 7072-7080. Die Werte für Nitrat, die Phosphate und Sulfat wurden Kristallstrukturdaten berechnet aus b) Greenwood, N. N.; Earnshaw, A., *Chemie der Elemente*, VCH, Weinheim, 1990. Radien der Halogenide wurden eben dort entnommen.
- [62] Werte übernommen aus Kelly, T. R.; Kim, M. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 7072-7080. Die Werte für die Halogenide, die Phosphate, Nitrat und Sulfat wurden gefunden in Greenwood, N. N.; Earnshaw, A., *Chemie der Elemente*, VCH, Weinheim, 1990 und Holleman, A. F.; Wiberg, E.; Wiberg, N., *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, de Gruyter, New York, 1985.
- [63] Kubik, S.; Goddard, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, *99*, 5127-5132.
- [64] Schulz, G. E.; Schirmer, R. H., *Principles of Protein Structure*, Springer, New York, 1979.
- [65] Chen, C. W.; Whitlock, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 4921-4922.
- [66] a) Zimmerman, S. C., *Top. Curr. Chem.*, **1993**, *165*, 71-102 und hier zitierte Literatur. b) Kurebayashi, H.; Haino, T.; Usui, S.; Fukazawa, Y., *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 8667-8674 und hier zitierte Literatur.
- [67] a) Klärner, F. G.; Benkhoff, J.; Boese, R.; Burkert, U.; Kamieth, M.; Naatz, U., *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 1195-1198. b) Schrader, T., *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 1537-1541.
- [68] Eine aktuelle Übersicht über Kohlenhydraterkennung durch nichtkovalente Wechselwirkungen geben Davis, A. P.; Wareham, R. S., *Angew. Chem.*, **1999**, *111*, 3160-3179.
- [69] a) Bonar-Law, R. P.; Davis, A. P.; Murray, B. A., *Angew. Chem.*, **1990**, *102*, 1497-1499. b) Bhattarai, K. M.; Bonar-Law, R. P.; Davis, A. P.; Murray, B. A., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1992**, 752-754. c) Bonar-Law, R. P.; Davis, A. P., *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 9829-9844 und 9845-9854. d) Bhattarai, K. M.; Davis, A. P.; Perry, J. J.; Walter, C. J.; Menzer, S.; Williams, D. J., *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 8463-8473. e) [68] und hierin zitierte Literatur.
- [70] a) Davis, A. P.; Walsh, J. J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1996**, 449-452. b) Wallimann, P.; Marti, T.; Fürer, A.; Diederich, F., *Chem. Rev.*, **1997**, 1594-1603. c) [68] und hierin zitierte Literatur.
- [71] a) Burrows, C. J.; Sauter, R. A., *J. Inclusion Phenom.*, **1987**, *5*, 117-121. b) Kinneary, J. F.; Roy, T. M.; Albert, J. S.; Yoon, H.; Wagler, T. R.; Shen, L.; Burrows, C. J., *J. Inclusion*

Phenom. Mol. Recognit. Chem., **1989**, 7, 155-168. c) Evans, S. M.; Burrows, C. J.; Venanzi, C. A., *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **1995**, 334, 193-205.

[72] Gargiulo, D.; Blizzard, T. A.; Nakanishi, K., *Tetrahedron*, **1989**, 45, 5423-5432

[73] Bonar-Law, R. P.; Sanders, J. K. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 259-271.

[74] a) Wennemers, H.; Conza, M.; Nold, M.; Krattinger, P., *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 3342-3347. b) Botana, E.; Ongerì, S.; Arienzo, R.; Demarcus, M.; Frey, J. G.; Piarulli, U.; Potenza, D.; Kilburn, J. D.; Gennari, C., *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 4625-4634. c) Referenz 18 + 19b)

[75] a) Budka, J.; Tkadlecová, M.; Lhoták, P.; Stibor, I., *Tetrahedron*, **2000**, 56, 1883-1887.

b) Hayashida, O.; Kato, M.; Akagi, K.; Aoyama, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 11597-11598.

[76] James, T.D.; Sandanayake, K. R. A. S.; Shinkai, S., *Angew. Chem*, **1996**, 108, 2038-2050.

[77] Coste, J.; Frérot, E.; Jovin, P., *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 2436-2446.

[78] Yvernaut, T.; Yvernaut, G.; Bollinger, J. C., *C. R. Acad Sci. Paris*, **1978**, 287, 519-521.

[79] Kosover, E. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 3883.