

Wechselwirkungen anionischer Cyclopeptide mit Monosacchariden und organischen Kationen

Inaugural-Dissertation

zur

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



vorgelegt von

Joachim Bitta

aus Neuss

Düsseldorf, 2003

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

Referent: Prof. Dr. G. Wulff

Korreferent: Prof. Dr. H. Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 2003

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Wulff im Institut für Organische und Makromolekulare Chemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Zeit von Juni 1999 bis November 2002 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Wulff und Herrn Prof. H. Ritter möchte ich herzlich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitskreise und ihre Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Stefan Kubik für die interessante Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft und für viele wertvolle Anregungen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte meinen Kollegen Dr. Karsten Knorr, Dr. Marco Emgenbroich, Dr. Axel Lache, Dr. Lars Peters, Dr. Thomas Grawe, Dr. Michael Herm, Guido Heinrichs, Michael Strerath, Christopher Steffens und Oliver Kretschmann sehr für die familiäre, kollegiale und produktive Arbeitsatmosphäre in Labor und Praktikum danken.

Daniela Kubik danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Synthesen.

Herzlichen Dank an Herrn P. Behm, Herrn U. Matthiesen, Frau M. Beuer, Herrn P. Tommes, Herrn Sven Augner und Herrn Carsten Uhlemann für die bereitwillige und zuverlässige Aufnahme zahlreicher Massen- und NMR- Spektren.

Frau Karin Mertens und Frau Inge Karnuth sei besonders gedankt für die freundliche und gewissenhafte Erledigung der Verwaltungsarbeit, die erfreulich unbürokratisch ablief.

Persönlichem Dank bin ich Herrn Dr. Mark Wehner verpflichtet. Unsere Freundschaft entstand durch die Chemie, wuchs in unserem Labor und wurde durch seinen Wechsel an die Universität Marburg vertieft.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Bitta, J.; Kubik, S. „Cyclic Hexapeptides with Free Carboxylate Groups as New Receptors for Monosaccharides“ *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2637.

Kubik, S.; Bitta, J.; Goddard, R.; Kubik, D.; Pohl, S. „Receptor Properties of Cyclic Peptides Composed of Alternating Natural Amino Acids and 3-Aminobenzoic Acid Derivatives“ *Mater. Sci. Eng. C.* **2001**, *18*, 125.

Bitta, J.; Kubik, S. „Complexation of Arginine with a Cyclopeptide in Polar Solvents and Water“ *J. Supramol. Chem.* **2001**, *1*, 293.

Für Antje,
Joëlle, Julian, Norina, Janis und Joshua

Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretischer Teil	
2.1 Aufgabenstellung	9
2.2 Synthesen	
2.2.1 Peptide mit 5-Aminoisophthalsäure	13
2.2.2 Peptide mit Aminoterephthalsäure	32
2.3 Rezeptoreigenschaften der neuen Cyclopeptide	
2.3.1 Strukturen und Konformationen	42
2.3.2 Bestimmung von Komplexstöchiometrien und Assoziationskonstanten	48
2.3.3 Kohlenhydrate als Substrate	51
2.3.4 Untersuchungen mit Guanidiniumionen	68
2.3.5 Enantioselektive Erkennung eines chiralen Ammoniumions	81
3. Zusammenfassung	89
4. Experimenteller Teil	
4.1 Apparatives	93
4.2 Chemikalien und Lösungsmittel	94
4.3 Wirt-Gast-Experimente	96
4.4 Allgemeine Arbeitsweisen	99
4.5 Synthesen von Peptiden mit 5-Aminoisophthalsäure	101
4.6 Synthesen von Peptiden mit Aminoterephthalsäure	132
5. Literaturverzeichnis	145

Verwendete Abkürzungen

5-AIS	5-Aminoisophthalsäure
Asp	(L)-Asparaginsäure
ATS	Aminoterephthalsäure
L-BAPA	Benzoyl-(L)-arginin-p-nitroanilid
D-BAPA	Benzoyl-(D)-arginin-p-nitroanilid
Boc₂O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCU	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylharnstoff
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)-pyridin
p-DMDPd	Tetrakis[4-(<i>N,N</i> -dimethylamino)phenyldiphenylphosphin]palladium(0)
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
Glu	(L)-Glutaminsäure
Pro	(L)-Prolin
PyCloP	Chlorotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Trp	(L)-Tryptophan

*Das Unverständlichste am Universum ist im Grunde,
daß wir es verstehen können.*

Albert Einstein

1. Einleitung

Die Entwicklung der Naturwissenschaften hat tiefe Wurzeln in dem Verlangen des Menschen, seine Umwelt zu erkennen und zu systematisieren. Als älteste Naturwissenschaft wird oft die Astronomie genannt. Ihr Forschungsgegenstand ist jedem Menschen zugänglich und bestimmt ganz wesentlich seinen Lebensrhythmus. Die Chemie jedoch brauchte lange Zeit, um sich als selbständige Wissenschaft zu entwickeln, da erst das Experiment als Gegenstand der Forschung erfunden werden mußte. Im Abendland entwickelte sich aus der mittelalterlichen Alchemie im 15. und 16. Jahrhundert langsam die systematische Chemie, während Paracelsus (1493 - 1541) bereits die Unmöglichkeit erkannte, den „Stein der Weisen“ zu finden. Die Züge einer exakten Wissenschaft erhielt die Chemie vor allem durch die Arbeiten von Antoine Laurent de Lavoisier im 18. Jahrhundert, der den Gebrauch der Waage in die chemische Forschung einführte. Heute verwischen die Grenzen der klassischen Naturwissenschaften zunehmend und an den ehemaligen Grenzen entstehen neue Forschungsfelder. So entwickelten sich z.B. die Bioorganische Chemie und die mit ihr verwandte Supramolekulare Chemie.

Die Bioorganische Chemie versucht mit Hilfe der Instrumente der Organischen Chemie natürliche, biologische Systeme nachzuahmen, um sie besser zu verstehen und vielleicht optimieren zu können. Ein wichtiges Feld ist hier u.a. die *biomimetische* Nachahmung von Enzymen und Rezeptoren.^[1,2]

In diesem Betätigungsfeld überschneidet sie sich mit der Supramolekularen Chemie. Diese noch relativ junge Disziplin der Chemie versucht seit den sechziger Jahren, die nichtkovalenten Wechselwirkungen mehrerer Moleküle untereinander auf verschiedenste Art und Weise zu untersuchen.^[1,3] Sie geht dabei über den biomimetischen Ansatz hinaus und lenkt als die „Chemie jenseits des Moleküls“ allgemein den Blick weg von einzelnen Molekülen hin zu *Supramolekülen* (Abb. 1.1).^[4] Solche Wirt-Gast-Komplexe, wie sie schon vor den Zeiten der

Supramolekulare Chemie genannt wurden, resultieren aus der spezifischen, aufeinander abgestimmten Wechselwirkung zueinander passender Moleküle.

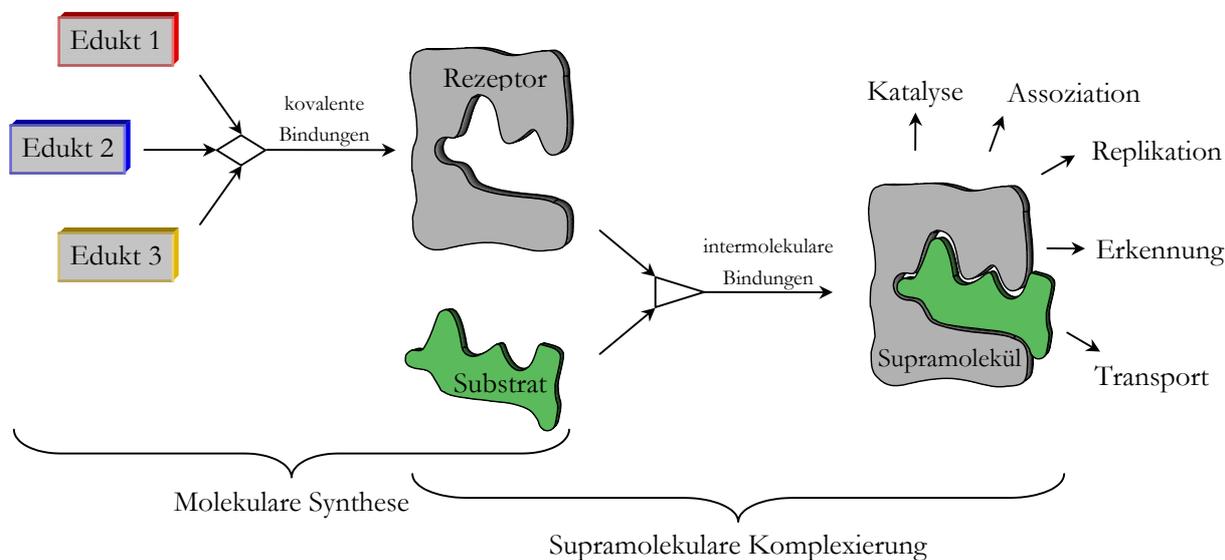


Abb. 1.1: Supramolekulare Chemie im Verhältnis zur molekularen Chemie.

Die intermolekularen Kräfte, die die Bildung eines solchen Komplexes ermöglichen, sind unterschiedlicher Natur. Beispielsweise können elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, π - π -, Kation- π -, van-der-Waals-, charge-transfer- und hydrophobe Wechselwirkungen anziehend wirken. Aber nur dann, wenn die funktionellen Gruppen der Bindungspartner von ihrer Art und ihrer räumlichen Anordnung zueinander passen wie ein Schlüssel in ein Schloß, wird ein stabiler Komplex entstehen können. Dieses „Schlüssel-Schloß-Prinzip“ wurde bereits im ausgehenden 19. Jahrhundert von Emil Fischer für die Funktionsweise von Enzymen postuliert. Er untersuchte u.a. die Wirkung von Invertin, einem Enzym aus der Bierhefe. Durch *in vitro* Experimente konnte Fischer zeigen, daß nur ganz bestimmte Alkoholglycoside und Polysaccharide glycosidisch gespalten werden. So konnte er bereits die Unterschiede in der Wirkungsweise des Enzyms gegenüber anomeren und enantiomeren Glucosederivaten nachweisen.^[5]

Das in allen verschiedenen Forschungsrichtungen vertretene Grundprinzip in der Supramolekularen Chemie ist die molekulare Erkennung. Sie kann nicht nur zur Bindung eines Substrats führen, sondern auch zu dessen spezifischem Transport, (Selbst-) Assoziation, Replikation oder sogar zur katalytischen Veränderung. Die Entwicklung von Substanzen, die das Substrat erkennen und spezifisch binden sollen, ist dabei ein zentrales Ziel. Diese wurden früher *Wirte* genannt. Heute hat sich die Bezeichnung (*künstlicher*) *Rezeptor* (von lat.: receptor = Empfänger) durchgesetzt.

Der Begriff Rezeptor ist alt und wird in verschiedenen Bedeutungen benutzt, was zu Mißverständnissen führen kann. Historisch gesehen erweiterte dieser Begriff in der Physiologie seit dem frühen 20. Jahrhundert den Begriff „Sinnesorgan“. So unterschied man schon damals Photo-, Thermo-, Chemo- und Mechanorezeptoren. Bereits Paul Ehrlich (1854 - 1915) benutzte diesen Begriff in seiner Seitenkettentheorie, derzufolge die einzelnen Zellen eines Organismus Rezeptoren zur Aufnahme von chemischen Stoffen besitzen.^[6] In der modernen Biologie und Medizin sind daher Rezeptoren im physiologischen Sinne Sensoren, die dem Organismus verschiedenste Informationen über sich und seine Umgebung liefern. Im molekularbiologischen Sinne ist ihre Definition enger gefasst und bezieht sich auf Moleküle, die oft in Membranen eingebettet sind und dem Zellinneren über die An- oder Abwesenheit bestimmter Stoffe Auskunft geben. Es handelt sich dabei meist um Glycoproteine. In der Supramolekularen Chemie dagegen versteht man unter einem Rezeptor ein Molekül, daß ein anderes erkennt und bindet. Das erkannte Molekül heißt dann Substrat. Sendet der Rezeptor zusätzlich bei Substratanwesenheit ein meßbares (oft optisches) Signal aus, so spricht man von einem Sensor.

Was verspricht man sich von künstlichen Rezeptoren? Die natürlichen Vorbildsysteme sind oft sehr komplex, schwierig zu isolieren und zu untersuchen. Es ist eine große Herausforderung, Modellsysteme zu entwickeln, die einen einfacheren Einblick in das komplexe Zusammenspiel vieler intermolekularer Wechselwirkungen erlauben. Dies ist beispielsweise nötig, um die Erkennung kleiner, biologisch wichtiger Moleküle zu verstehen und z.B. zur Entwicklung pharmakologisch wertvoller Verbindungen zu nutzen, mit denen man in enzymatische, hormongesteuerte oder andere Prozesse im Organismus eingreifen kann. Daß diese von höchster Wichtigkeit für einen Organismus sind, ist offensichtlich. Beispielsweise wird die lebensnotwendige interzelluläre Erkennung (auch die Entdeckung körperfremder Zellen als Schritt der Immunabwehr) ganz wesentlich durch die spezifische Wechselwirkung von zelloberflächengebundenen Oligosacchariden einer Zelle mit Oberflächenrezeptoren einer anderen Zelle bestimmt.^[7] Interessant ist es auch, Informationen über die genauen Anteile entropischer und enthalpischer Komponenten der Komplexbildung zu erhalten und so die Triebkraft der Erkennung verstehen zu können. Neuere Ansätze gehen hin zur Entwicklung künstlicher Sensoren, selbstreplizierender Systeme, Molekülen zur Speicherung von Informationen oder man versucht sogar, molekulare Maschinen zu synthetisieren.^[8]

Ihren Ursprung hatte die Supramolekulare Chemie, als Pedersen 1967 durch systematische Untersuchungen der Rezeptoreigenschaften von Kronenethern zeigen konnte, daß eine gezielte Substratkomplexierung nicht nur mit natürlichen Systemen wie Cyclodextrinen möglich ist.^[9] Seitdem werden verschiedenste synthetische Makrocyclen als Rezeptoren entwickelt, synthetisiert und systematisch in ihrem Komplexierungsverhalten untersucht.^[10]

Sie dienen als einfache Modelle für die aktiven Zentren biologischer Wirtssysteme. Ihr Vorteil gegenüber offenkettigen Molekülen besteht darin, daß sie einen Hohlraum besitzen, der in seiner Größe und in seinen chemischen Eigenschaften an das Substrat angepasst werden kann. Außerdem können durch den Cyclus funktionelle Gruppen in eine kontrollierbare Orientierung zur Substratbindung gebracht werden.

Zur Entwicklung künstlicher Rezeptoren existieren mehrere mögliche Ansätze. Am weitesten verbreitet ist der rationale Ansatz. Dazu analysiert man zunächst die Anforderungen eines Substrats an den geplanten Rezeptor. Wichtig sind hier primär die Größe des Substrats und die Art und Anordnung seiner funktionellen Gruppen. Dann sucht man ein geeignetes komplementäres Rezeptorgrundgerüst, das das Substrat idealerweise vollständig umschließen kann. Des weiteren sollte ein Rezeptor zu allen funktionellen Gruppen des Substrats passende Gegenstücke besitzen, die anziehende intermolekulare Wechselwirkungen ausüben. So wird das Substrat gebunden und fixiert. Der Rezeptor muß also gut präorganisiert sein oder sich während der Komplexierung dem Substrat anpassen können (*induced fit*). Bindet der Rezeptor tatsächlich das gewählte Substrat, kann man ihn weiterentwickeln und verbessern.

Ein anderer, immer häufiger anzutreffender Ansatz bedient sich der Methoden der kombinatorischen Chemie. Hierbei bietet man einem Substrat eine Mischung (Bibliothek) vieler verschiedener Rezeptoren an. Durch geeignete Screeningverfahren kann man nun diejenigen Verbindungen isolieren, die Rezeptoreigenschaften für das Substrat besitzen.^[11]

Eine sehr aktuelle Weiterentwicklung dieses Verfahrens ist die Verwendung dynamischer, kombinatorischer Bibliotheken.^[12] Dabei stehen verschiedene potentielle Rezeptormoleküle miteinander im chemischen Gleichgewicht. Ein zugegebenes Substrat wird hauptsächlich vom besten Rezeptor der Bibliothek gebunden. Dieser wird dadurch dem dynamischen Gleichgewicht entzogen und muß zur erneuten Einstellung des Gleichgewichtes nachgebildet werden. Im Idealfall wird so das Gleichgewicht der Bibliothek auf die Seite eines einzigen Rezeptormoleküls verschoben. Dieses muß dann identifiziert werden. Ein Beispiel hierzu wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe um Sanders entwickelt. Es basiert auf den Ergebnissen des rationalen Rezeptordesigns von Kubik und bestätigte seine mit Hilfe des rationalen Rezeptordesigns erhaltenen Ergebnisse.^[13]

Hauptsächlich auf dem rationalen Weg wurden vielseitige Grundgerüste entwickelt, wie die bereits erwähnten Cyclodextrine^[14,15,16] und Kronenether,^[9] aber auch Cryptanden,^[17] Cyclophane,^[18] Calix-^[19] und Resorcinarene,^[20] Cyclotrimeratrylene^[21,22] und Toranden.^[23]

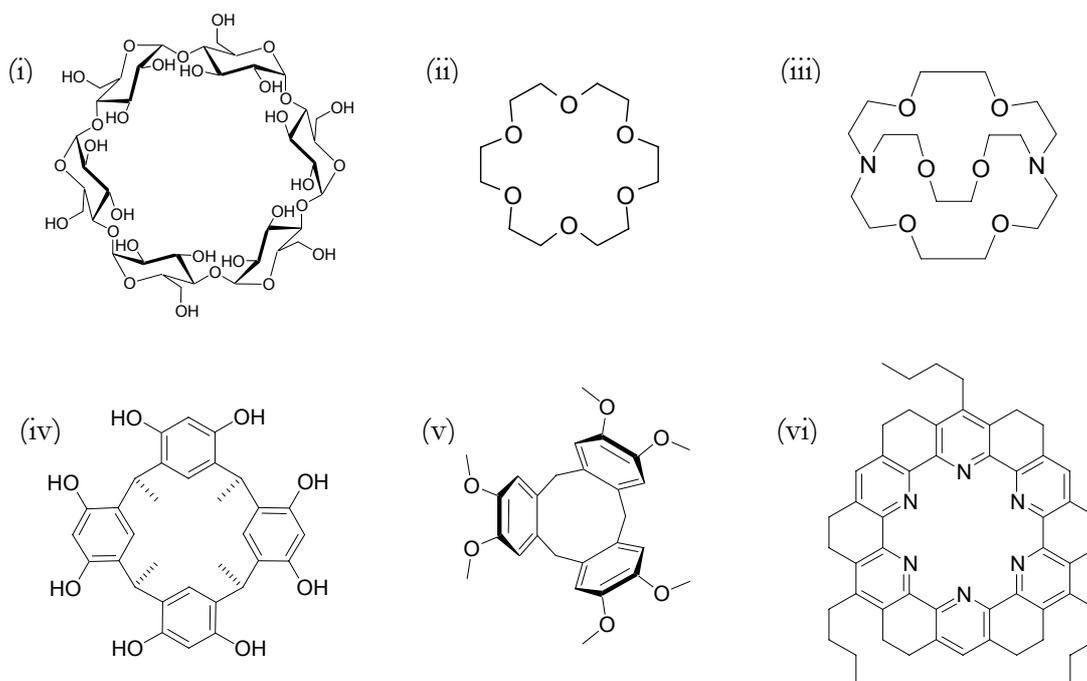


Abb. 1.2: Vielseitige makrocyclische Rezeptoren: (i) α -Cyclodextrin, (ii) [18]Krone-6, (iii) [2.2.2]Cryptand, (iv) Resorcinaren, (v) Cyclotrimeratrylen, (vi) Torand.

Die Familie der künstlichen Rezeptoren lässt sich aber nicht nur nach ihren strukturellen Merkmalen einteilen, wie dies in Abb. 1.2 für einige beispielhafte Makrocyclen dargestellt ist. Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung besteht darin, sie nach ihrer Substratspezifität zu sortieren. So existieren künstliche Rezeptoren, die Anionen, Kationen, Aminosäuren oder Peptidsequenzen, Kohlenhydrate, Steroide usw. binden können. So ist es heute möglich, relativ vorhersagbar und zielsicher Rezeptoren für ganz bestimmte kleine und mittelgroße Moleküle zu entwerfen.^[8]

Ein gut untersuchtes Beispiel ist in Abb. 1.3 zu sehen. Es handelt sich um das von Aoyama 1988 vorgestellte Resorcinaren **1**, das in einer einstufigen Synthese aus Resorcin und Dodecanal dargestellt wurde.^[24] Es besitzt einen schalenförmigen Hohlraum, der durch die vier aromatischen Ringe hydrophobe Eigenschaften besitzt. Die acht phenolischen Hydroxylgruppen stabilisieren die *cone*-Konformation des Cyclus durch vier intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen. Zudem bilden sie einen hydrophilen Ring am sogenannten wide rim. Diese Eigenschaften ermöglichen es **1**, Monosaccharide in unpolaren Lösungsmitteln zu komplexieren.^[24,25] So kann z.B. D-Ribose

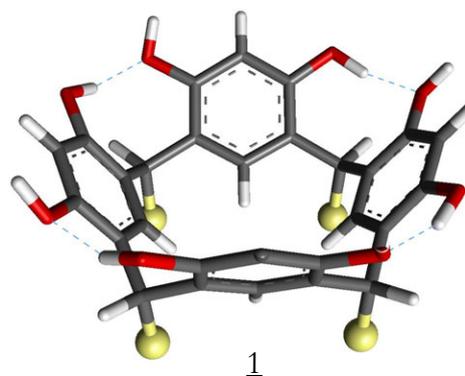


Abb. 1.3: Resorcinaren von Aoyama. Die gelben Kugeln stehen für den Rest $n\text{-C}_{11}\text{H}_{23}$, die blauen, gestrichelten Linien sind Wasserstoffbrücken.

komplexiert und aus einer wässrigen Lösung in eine CCl_4 -Phase extrahiert werden. Dabei werden mehrere, spezifisch angeordnete Wasserstoffbrücken zwischen Rezeptor und Substrat sowie $\text{CH}-\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den CH -Gruppen der Ribose und den aromatischen Bausteinen des Resorcinarens gebildet.^[26] Der Rezeptor erkennt Ribose „face-to-face“, da eine Seite des Saccharidgerüsts überspannt wird. Dabei wird das Verhältnis der fünf im Gleichgewicht möglichen Riboseisomere durch die Komplexbildung auf die Seite der pyranosiden α -Form verschoben. Das Verhältnis zum stabileren β -Anomer^[27,28] beträgt im Komplex mit **1** 10:1.^[25] Im wässrigen Gleichgewicht der freien Ribose dagegen kommt die α -D-Ribofuranose nur zu 21,5 % vor.

Bei der Erkennung und Extraktion von Methyl- β -D-glucosid (Abb. 1.4) schließen zwei Rezeptormoleküle das Substrat sandwichartig ein, Methyl- α -D-glucosid wird dagegen nicht komplexiert.^[29] Der Rezeptor ist somit selektiv, d.h. er kann zwischen strukturell sehr ähnlichen Verbindungen unterscheiden.

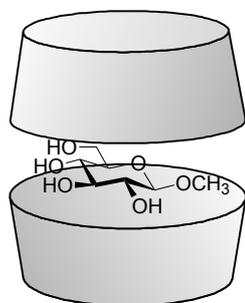


Abb. 1.4: **1** (als Kegel schematisiert) und das Methyl- β -D-glucosid bilden einen 2:1-Komplex.

Seine Fähigkeiten gehen aber über die eines Rezeptors hinaus: Bei der Reaktion des Supramoleküls aus D-Ribose und **1** mit Methanol in CCl_4 entsteht bei vollständigem Umsatz ausschließlich das Methyl- β -D-ribofuranosid, während konventionelle Methoden der Glycosidsynthese ein Isomerenmisch erzeugen.^[30] Die Reaktivität des Substrats wird also in eine bestimmte Richtung dirigiert, ohne daß es z.B. durch die Einführung von Schutzgruppen vor der Reaktion kovalent verändert werden muß.

Die Komplexbildung mit dem Rezeptor kann nicht nur durch Extraktionsversuche, sondern auch in Lösung untersucht werden, da Octylglucoside im Gegensatz zu unmodifizierten Monosacchariden in unpolaren Lösungsmitteln direkt löslich sind. Typisch für die Supramolekulare Chemie ist, daß zum Nachweis und zur Untersuchung der gelösten Komplexe spektroskopische Methoden verwendet werden: in diesem Beispiel bewirkt die Komplexbildung Änderungen in den NMR- und CD- Spektren des Rezeptors.^[31]

In letzter Zeit konnte eine Reihe weiterer künstlicher Kohlenhydratrezeptoren entwickelt werden (siehe Kapitel 2.3.3).^[32]

Um ein Kohlenhydrat wie das vorgestellte Methylglucosid zu binden, müssen sowohl die natürlichen als auch die künstlichen Rezeptoren Bindungsstellen für die dreidimensional angeordneten Hydroxygruppen des Substrats besitzen. Erschwerend kommt hinzu, daß die Hydroxygruppen sowohl Wasserstoffbrückendonoren als auch -akzeptoren sind. Daher muß ein Kohlenhydratrezeptor komplementäre, konvergent angeordnete Donor- und Akzeptorstellen zur Substratbindung bereitstellen und zudem im günstigsten Fall das Kohlenhydrat umschlie-

ßen. In der Natur finden sich viele Beispiele für diese Strategie. So wurde in allen strukturell aufgeklärten Rezeptor- bzw. Enzymkomplexen mit Kohlenhydraten gefunden, daß diese durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken an ihren Hydroxygruppen gebunden werden (Abb. 1.5).^[33-39] Kooperative Wasserstoffbrücken zu zusätzlichen Wassermolekülen sind dabei keine Seltenheit.^[34,40,41] Zusätzlich werden die unpolaren C-H-Gruppen der Substrate sandwichartig ober- und unterhalb der Ringebene der Monosaccharideinheiten durch hydrophobe Reste der Proteine komplexiert. Dazu dienen oft die aromatischen Seitengruppen der Aminosäuren Tryptophan oder Phenylalanin.

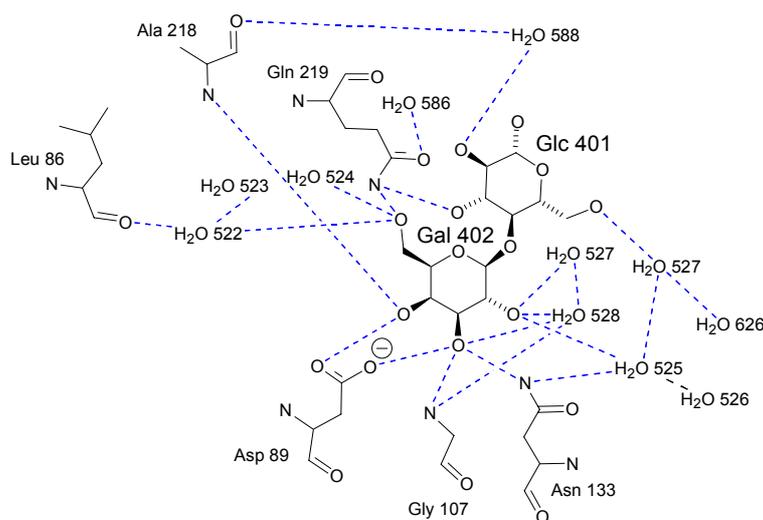


Abb. 1.5: Röntgenographisch aufgeklärte Struktur des Komplexes aus einem Lectin von „Erythrina corallo dendron“ (Korallenbaum) und Lactose.^[36] Wasserstoffatome sind, außer bei Wassermolekülen, nicht eingezeichnet. Wasserstoffbrücken wurden schematisch und blau dargestellt.

Erstaunlich wenig Beachtung in der Supramolekularen Chemie fanden bisher Rezeptorstrukturen, die nicht nur in ihrer Funktionsweise biomimetisch sein können, sondern auch in ihren Bauelementen wie z.B. die Cyclopeptide. Die Natur stellt mit den Aminosäuren eine Art Baukastensystem zur Verfügung, dessen Chemie gut untersucht und beherrschbar ist. Zudem liefern die Aminosäuren in ihren Seitenketten viele verschiedene funktionelle Gruppen, die man zur Substraterkennung nutzen kann wie z.B. Amino-, Carbonsäure-, Hydroxy-, Guanidin- und verschiedene aromatische Gruppen.

In unserer Arbeitsgruppe beschäftigen wir uns mit Cyclopeptiden, die u.a. als künstliche Rezeptoren dienen sollen. Sie enthalten in ihrem makrocyclischen Grundgerüst alternierend natürliche α - und aromatische γ -Aminosäuren. Man kann sie als Hybrid aus den Calixarenen und solchen Cyclopeptiden ansehen, die nur aus α -Aminosäuren bestehen (Abb. 1.6).

Dadurch vereinigen sie die Vorteile der beiden zugrundeliegenden Spezies; so besitzen sie

sowohl den wohldefinierten Hohlraum der Calixarene als auch die Möglichkeit der sequenziellen Synthese, wie man sie von den Peptiden kennt. Zudem lassen sich gezielt einzelne Aminosäureuntereinheiten variieren und damit die Rezeptoreigenschaften verändern.

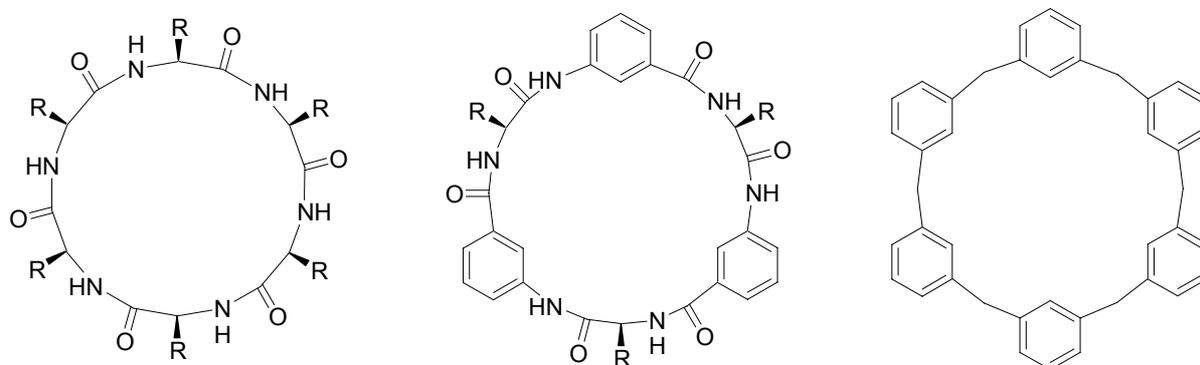


Abb. 1.6: Vergleich zwischen einem Makrocyclus aus α -Aminosäuren (links), dem Grundgerüst der Calix[6]arene (rechts) und einem Hybrid dieser beiden (Mitte).

In meiner Arbeit möchte ich Cyclopeptide dieser Art darstellen und ihre Rezeptoreigenschaften charakterisieren. Als strukturelle Gemeinsamkeit sollen sie an den aromatischen Bausteinen periphere funktionelle Gruppen tragen, prinzipiell ähnlich den phenolischen Hydroxygruppen, die das Resorcinaren 1 besitzt. Diese Gruppen sollen helfen, Substrate möglichst selektiv zu binden. Die Komplexierung von Kohlenhydraten als besonders anspruchvolle Substratklasse soll dabei im Mittelpunkt stehen.

2. Theoretischer Teil

2.1 Aufgabenstellung

Bereits vor Beginn dieser Arbeit konnte Kubik einige Cyclopeptide mit 3-Aminobenzoesäureeinheiten darstellen und ihre Rezeptoreigenschaften charakterisieren. So ist 2 in der Lage, verschiedene quaternäre Ammoniumionen in CDCl_3 zu binden. Die Assoziationskonstante des 1:1-Komplexes von 2 (Abb. 2.1) mit dem *n*-Butyltrimethylammoniumion (BTMA^+) beträgt 300 M^{-1} ,^[42] ein Wert, der vergleichbar mit der Stabilität analoger Calixarenkomplexe ist.^[43] Die Bindung des Kations erfolgt wahrscheinlich hauptsächlich über Kation- π -Wechselwirkungen mit den aromatischen Bausteinen von 2.

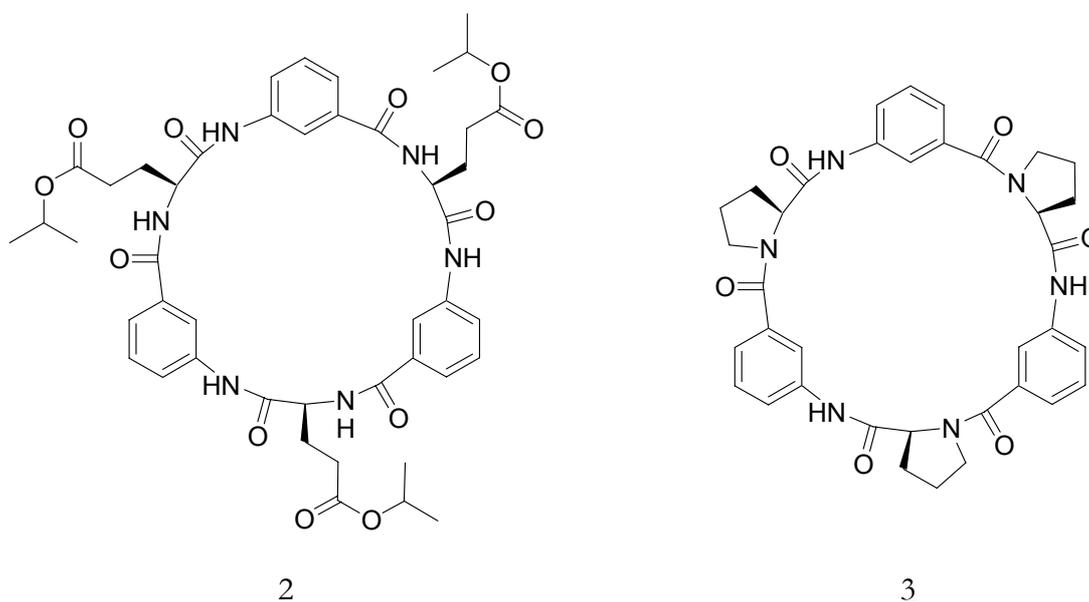


Abb. 2.1 Vor Beginn dieser Arbeit von Kubik dargestellte Cyclopeptide auf der Basis von L-Glutaminsäure (2) oder L-Prolin (3) und 3-Aminobenzoesäure.

Eine Steigerung der Kationenaffinität von 2 konnte erreicht werden, indem die konformative Flexibilität des Cyclopeptids durch den Austausch der Glutaminsäureeinheiten durch Prolin herabgesetzt wurde. Dies führte zum etwas besser für die Kationenkomplexierung präorganisierten Cyclopeptid 3.^[44] Anhand des Komplexes mit Chinuclidiniumiodid konnte mit Hilfe einer Röntgenstrukturanalyse sichtbar gemacht werden, daß die Kationen tatsächlich in der schalenförmigen Cavität von 3 gebunden werden. Die Assoziationskonstante für das BTMA^+ Kation wurde zu 1260 M^{-1} bestimmt, was gegenüber 2 eine deutliche Steigerung bedeutet.

Diese Untersuchungen stellen den Ausgangspunkt meiner Arbeit dar. In bezug auf die Größe

und Form des Hohlraums, den die aromatischen Untereinheiten aufspannen, erschien mir Cyclohexapeptid 3 als Basis für die Entwicklung eines Monosaccharidrezeptors geeignet. Seinen bereits strukturell an natürliche Systeme angelehnten Bausteinen fehlen noch geeignete funktionelle Gruppen, die zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu den Hydroxygruppen eines Kohlenhydrates geeignet sind. Daher möchte ich in dieser Arbeit neue Peptide synthetisieren, die an den aromatischen Untereinheiten von 3 zusätzliche Aminosäuresubstituenten besitzen, die zur Substratbindung genutzt werden können. In natürlichen Rezeptoren und Enzymen, die Kohlenhydrate binden, findet man in der gleichen Funktion oft Asparagin- und Glutaminsäure (siehe Einleitung, Abb. 1.5). Entsprechend möchte ich genau diese Aminosäuren als Substituenten an das Grundgerüst von 3 binden und in Form ihrer Carboxylate biomimetisch zur Kohlenhydraterkennung nutzen.

Die Synthese dieser neuen Strukturen soll flexibel genug sein, um verschiedene potentielle Rezeptoren relativ einfach darstellen zu können. Deshalb sollen die peripheren Aminosäuren im letzten Schritt der Synthese an ein vollständiges cyclisches Grundgerüst gebunden werden. Carbonsäuregruppen in 5-Position an den aromatischen Untereinheiten von 3 erscheinen hier als Ankergruppen für die Anbindung der neuen Aminosäuresubstituenten geeignet. Als gemeinsamen zentralen Baustein der modular aufgebauten Familie von potentiellen Rezeptoren plante ich aus diesen Gründen die Synthese der Tricarbonsäure 4 (Abb. 2.2).

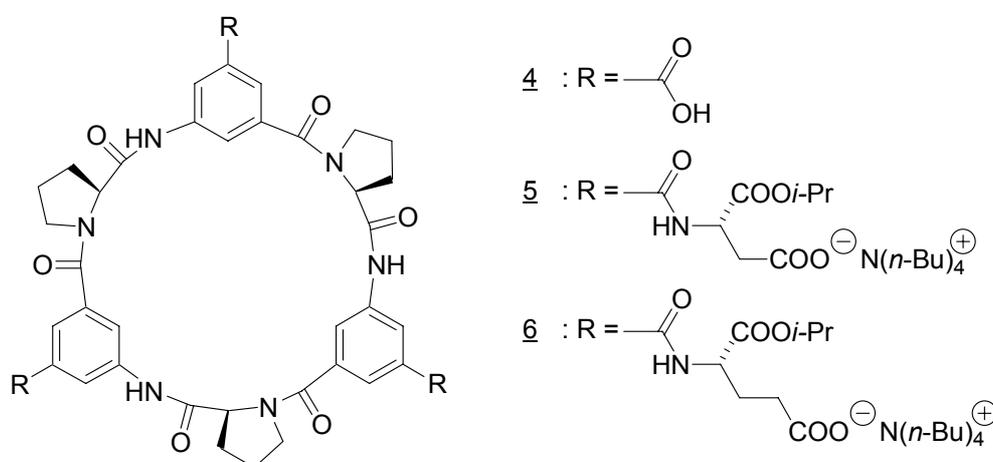


Abb. 2.2 Die potentiellen Rezeptoren 5 und 6 werden modular aus der Tricarbonsäure 4 dargestellt..

Erste Untersuchungen mit den Tricarboxylaten 5 und 6 während meiner Diplomarbeit zeigten, daß eine Kohlenhydraterkennung prinzipiell möglich ist. Diese Rezeptoren wurden durch Kupplung entsprechender Asparaginsäure- und Glutaminsäurederivate an die Tricarbonsäure 4 dargestellt.^[45] Eine Vorstellung, wie sie Carboxylatgruppen und aromatische Bausteine zur Substratbindung nutzen können, lieferten Molecular-Modeling-Studien. Abb. 2.3 zeigt eine der möglichen Komplexstrukturen.

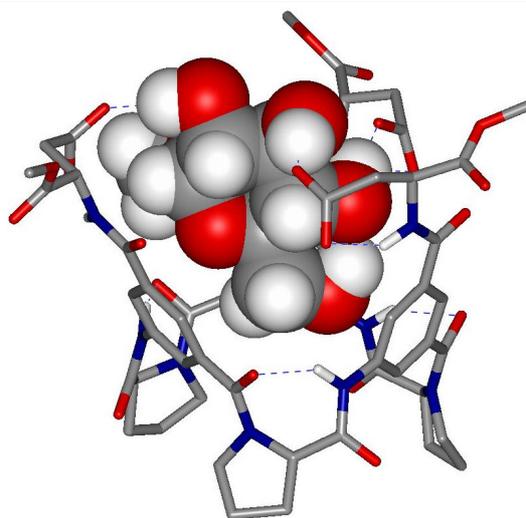


Abb. 2.3: Mit dem Amber-Kraftfeld optimierte Struktur eines Komplexes aus 5 (Stäbchenmodell) und dem Methyl- α -D-glucopyranosid (Kalottenmodell). Die Isopropylgruppen von 5 wurden der Einfachheit halber durch Methylgruppen ersetzt. Blau gestrichelte Linien sind inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken.

In dieser Arbeit sollten nun systematische Untersuchungen folgen, um den Einfluß der Rezeptorstruktur auf die Substrataffinität und -selektivität bei der Komplexbildung verschiedener Monosaccharide zu klären. Daneben sollten andere periphere Carboxylate, Phosphonate oder Aminosäuren mit aromatischen Substituenten zur Substratbindung verwendet und ihr Einfluß auf die Eigenschaften der darzustellenden Rezeptoren untersucht werden.

Eine Verbesserung der Rezeptoren kann möglicherweise auch durch die Veränderung der Stellung der peripheren Aminosäuren an den aromatischen Bausteinen der Cyclopeptide erreicht werden. Um dies zu überprüfen, will ich Cyclopeptide mit Substituenten in Nachbarschaft zu den Amid-NH-Gruppen darstellen (8 in Abb. 2.4).

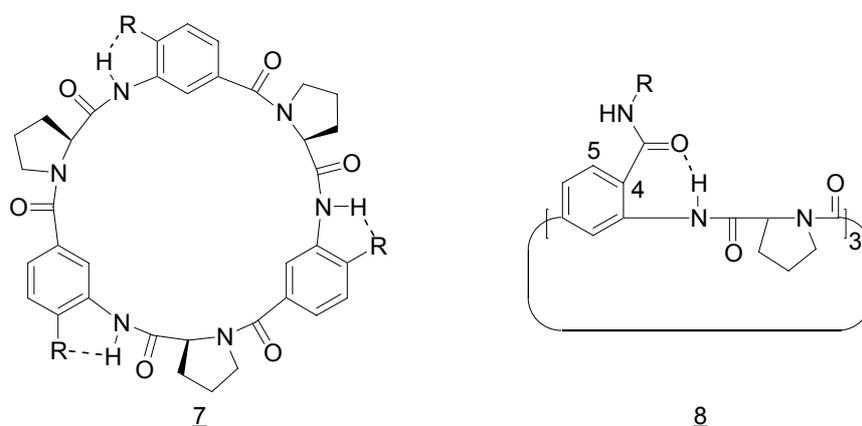


Abb. 2.4 Links: Von Kubik dargestellte Cyclopeptide mit Substituenten in 4-Position an den aromatischen Untereinheiten. Rechts: Ein Cyclopeptid mit peripheren Aminosäuren ebenfalls in 4-Position. Gestrichelte Linien stehen für Wasserstoffbrücken.

Ähnliche Strukturen (7) wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits synthetisiert (Abb. 2.4 links),^[46,47] und es konnte gezeigt werden, daß intramolekulare Wasserstoffbrücken (gestrichelt in Abb. 2.4) ihre Präorganisation und damit ihre Rezeptoreigenschaften verbessern.

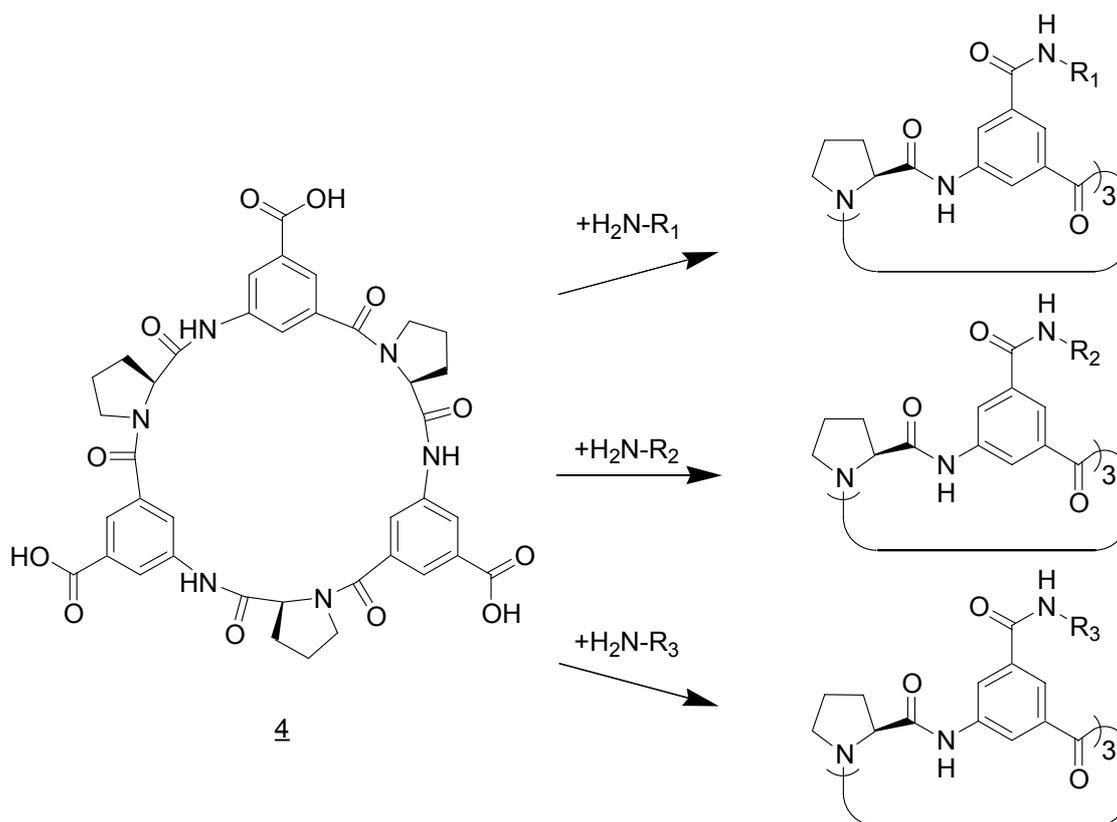
Diese neuen Rezeptorstrukturen komplexieren außer Monosacchariden möglicherweise auch andere Substratklassen. In diesem Zusammenhang möchte ich untersuchen, ob kationische Substrate eventuell sogar in kompetitiven Lösungsmitteln gebunden werden. Da die Cyclopeptide außerdem chiral sind, existiert dabei prinzipiell die Möglichkeit der enantioselektiven Substraterkennung. Wirt-Gast-Studien mit chiralen Kationen sollen dieses Potential untersuchen.

2.2 Synthesen

2.2.1 Peptide mit 5-Aminoisophthalsäure

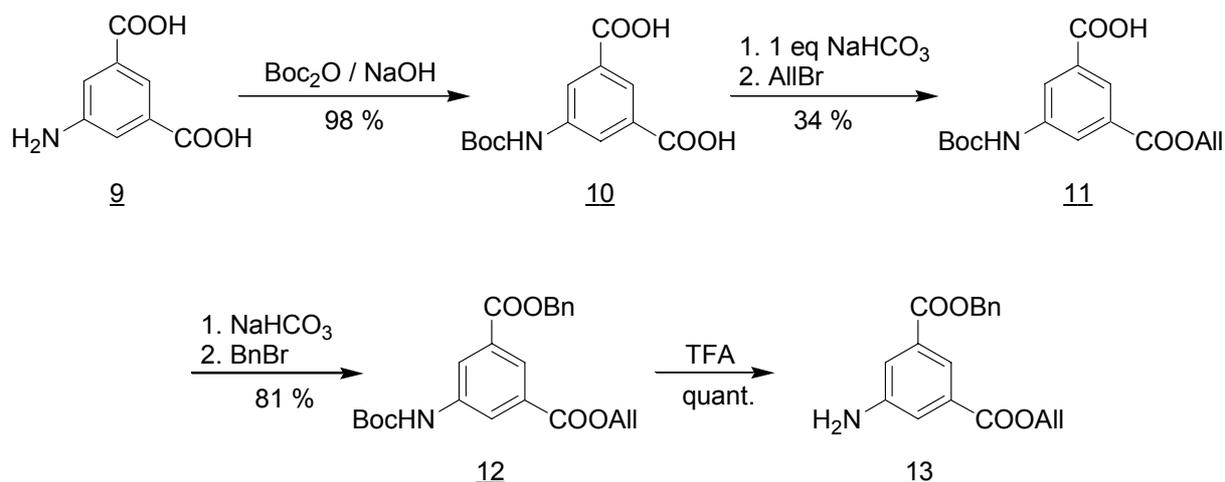
2.2.1.1 Cyclopeptide mit Carboxylatgruppen zur Substratbindung

Bei der Synthese von Cyclopeptiden mit zusätzlichen Substituenten bietet es sich an, diese erst nach dem Aufbau des cyclischen Grundgerüsts anzubinden, denn so ist man in ihrer Wahl flexibel und kann außerdem bei der Synthese eines neuen Rezeptors auf eine gemeinsame Vorstufe zurückgreifen. Es steht dann eine Art Baukastensystem zur Verfügung, das es gestattet, an eine cyclische, zentrale Einheit strukturell verschiedene Substituenten anzubinden. Als zentralen Baustein wählte ich dementsprechend das Cyclopeptid **4** mit drei Carbonsäuregruppen, die als Ankergruppen zur Anbindung von peripheren Aminosäuren genutzt werden können. **4** ist die Stammverbindung der Rezeptoren, deren cyclisches Grundgerüst aus 5-Aminoisophthalsäure und Prolin aufgebaut ist (Schema 2.1).^[45]



Schema 2.1 Die Tricarbonsäure **4** ist als Stammverbindungen einer Familie von Rezeptoren konzipiert, die nicht nur strukturell von ihr abstammen, sondern auch von ihr ausgehend synthetisiert werden.

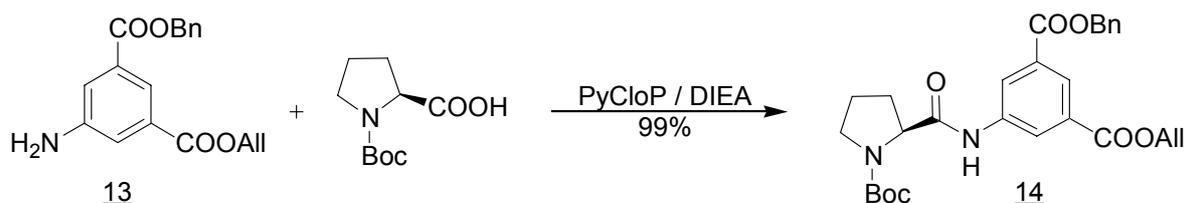
Die Synthese von **4** begann bei den kommerziell erhältlichen Aminosäuren Boc-Prolin und Aminoisophthalsäure (Schema 2.2), wobei letztere zuerst mit geeigneten Schutzgruppen versehen wurde.



Schema 2.2 Schützungen beider Carbonsäuregruppen der 5-Aminoisophthalsäure (5-AIS).

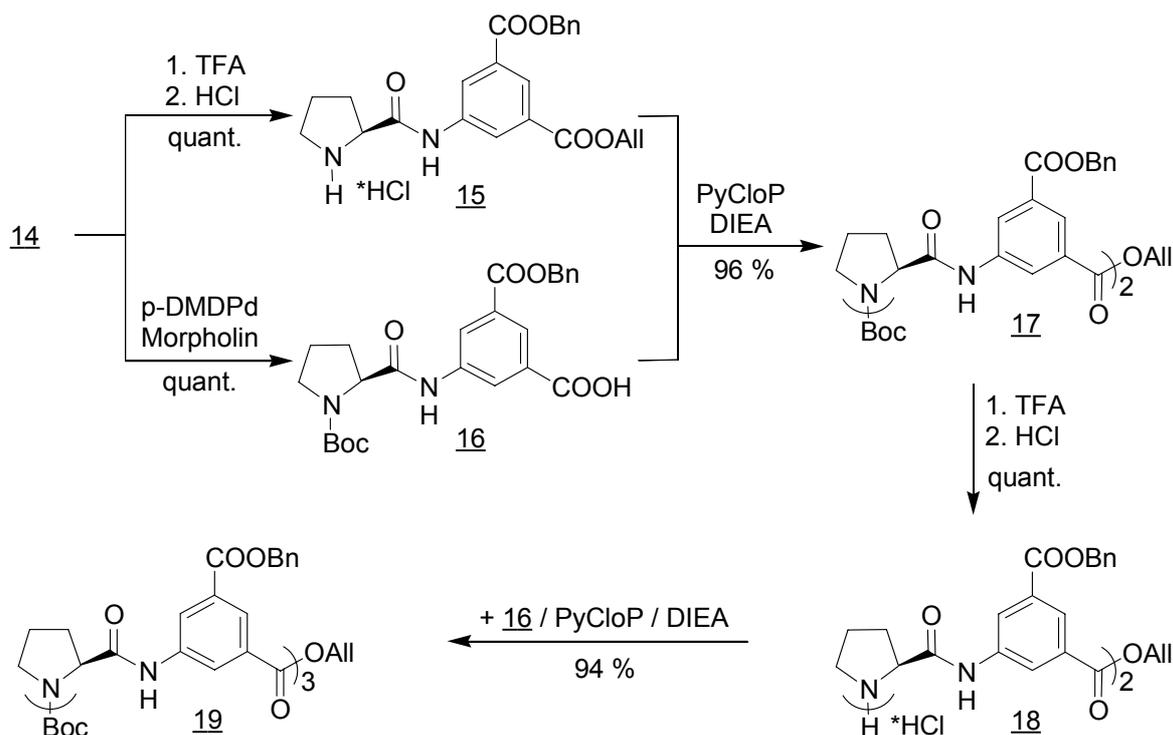
Die Schutzgruppen wurden so gewählt, daß sie weitestgehend orthogonal zueinander sind und die unkompliziert und quantitativ spaltbaren Benzylestergruppen zur Freisetzung der Carbonsäuregruppen am fertigen Cyclopeptid genutzt werden können. Die Peptidkupplungsschritte wurden über das Boc- bzw. allylestergeschützte N- und C-terminale Ende durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde dann das Dipeptid 14 dargestellt, das die grundlegende strukturelle Einheit von 4 darstellt (Schema 2.3). Dabei kam das Kupplungsreagenz PyCloP zum Einsatz, das sich besonders für die Amidkupplung von sterisch anspruchsvollen oder aromatischen Aminen mit Carbonsäuren eignet. Es kann in großen Mengen in einer einfachen zweistufigen Synthese dargestellt werden.^[48,49]



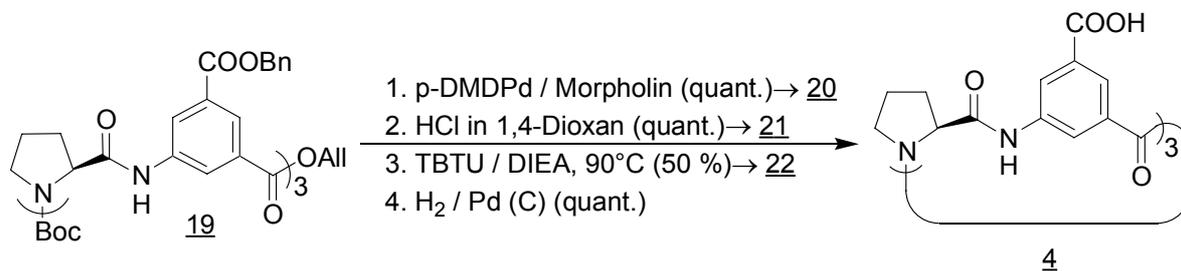
Schema 2.3 Synthese des Dipeptids Boc-Pro-5-AIS(OBn)-OAl 14.

Die schrittweise Verlängerung von Dipeptid 14 führte zum linearen Hexapeptid 19 (Schema 2.4).



Schema 2.4 Synthese des linearen Hexapeptids Boc-[Pro-5-AIS(OBn)]₃-OAll 19.

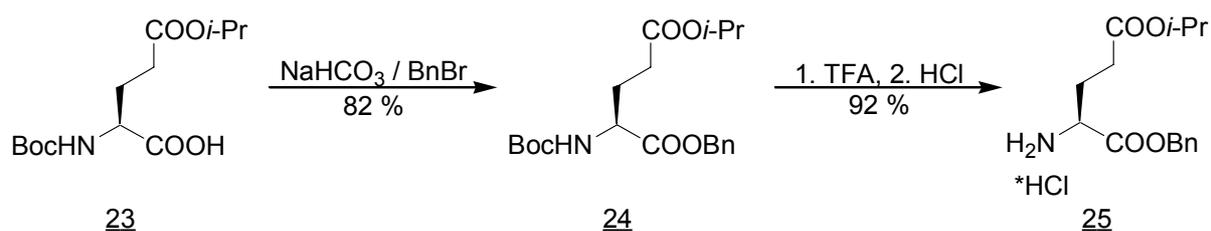
Nach Entfernung der beiden terminalen Schutzgruppen von 19 konnte das entstehende ungeschützte lineare Hexapeptid 21 cyclisiert werden (Schema 2.5). Hier wurde das Kupplungsreagenz TBTU verwendet, da die Reaktion in der Wärme und in DMF durchgeführt wird und PyCloP in diesem Lösungsmittel Nebenreaktionen eingeht.^[50] Im Laufe der praktischen Durchführung dieser Arbeit konnte ich die Ausbeute der Cyclisierung durch Optimierung der Reaktionsbedingungen und der Aufarbeitung von anfangs 23 % auf 50 % steigern. Dies ermöglichte (nach Hydrierung der Benzylestergruppen) den Zugang zu Cyclopeptid 4 im Grammaßstab, womit sich die weiteren Syntheseschritte gut planen ließen.



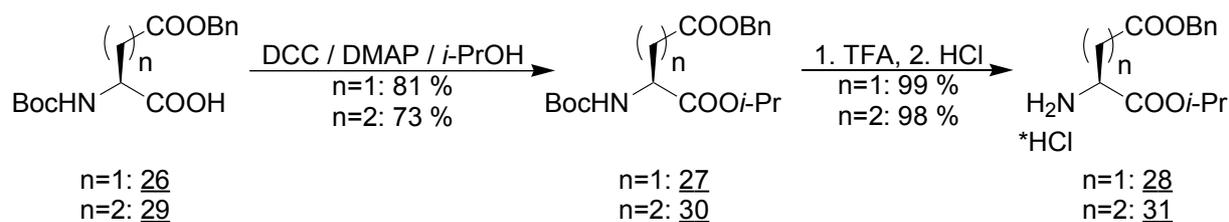
Schema 2.5 Entschützungen und Cyclisierung mit anschließender Freisetzung der Tricarbonsäure 4.

Ausgehend von der 5-Aminoisophthalsäure beträgt die Gesamtausbeute von 4 über alle 15 Stufen berechnet 12%. Die Monoveresterung von 10 und die Cyclisierung stellen dabei die ausbeutelimittierenden Syntheseschritte dar.

Es standen mir nun ausreichende Mengen der strukturellen Grundeinheit 4 zur Verfügung, um alle geplanten Rezeptoren darzustellen. Die dazu erforderlichen geschützten Aminosäurederivate habe ich ausgehend von den kommerziell erhältlichen Glutamin- und Asparaginsäurederivaten 26, 29^[45] und dem Glutaminsäurederivat 23, das mir freundlicherweise von D. Kubik zur Verfügung gestellt worden war, dargestellt (Schemata 2.6 und 2.7). Hier zeigt sich die Flexibilität der Synthesestrategie: in relativ wenigen Schritten kann ein neuer potentieller Rezeptor erhalten werden, indem ein neuer Substituent dargestellt und an das Grundgerüst 4 angebinden wird.

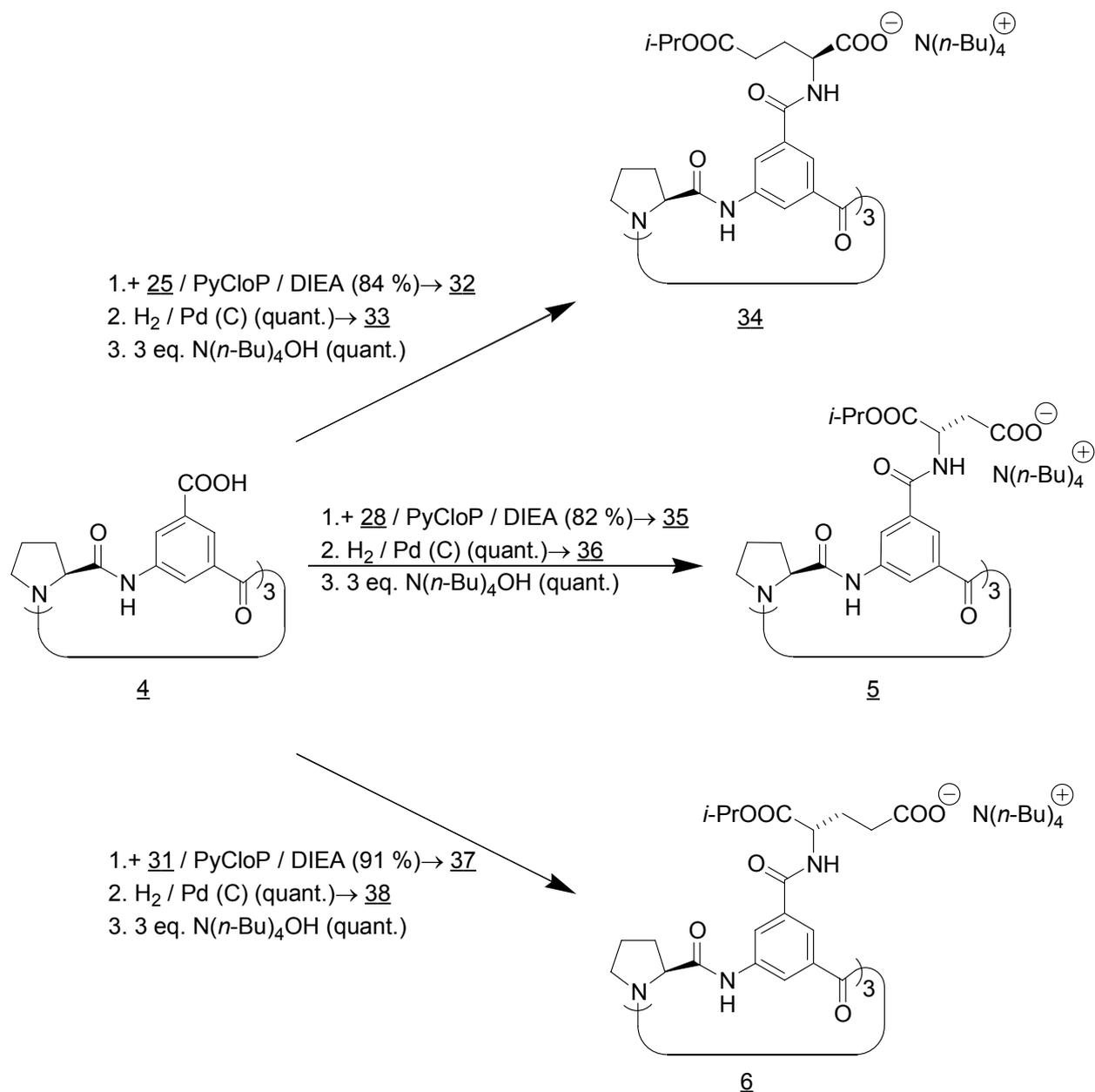


Schema 2.6 Synthese des Substituenten H-Glu(Oi-Pr)-OBn * HCl (25).



Schema 2.7 Synthese der Substituenten H-Asp(OBn)-Oi-Pr * HCl (28) und H-Glu(OBn)-Oi-Pr * HCl (31).

Diese drei am N-terminalen Ende entschützten Aminosäuren 25, 28 und 31 konnte ich im folgenden, wie im Schema 2.8 dargestellt, an das Grundgerüst 4 binden.

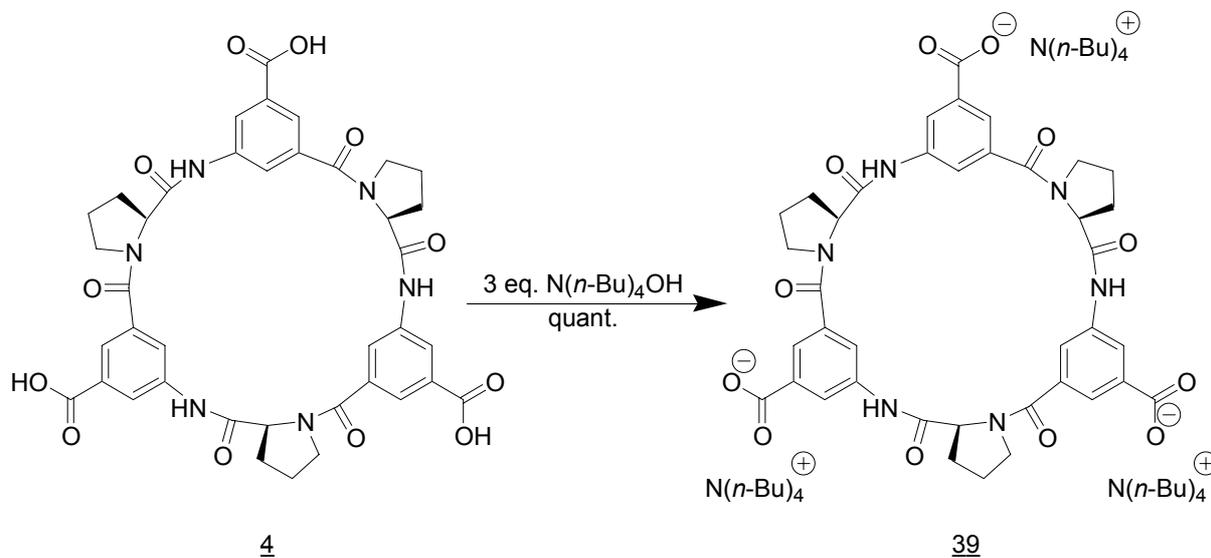


Schema 2.8 Synthese der potentiellen Rezeptoren 34, 5 und 6, jeweils ausgehend vom zentralen Grundbaustein 4.

Auf diesen Synthesewegen konnten die Tricarboxylate 34, 5 und 6 jeweils in Mengen von einigen hundert Milligramm dargestellt werden, was für eine vollständige Analytik und für die Untersuchungen der Rezeptoreigenschaften ausreichend war.

Mit dem Cyclopeptid 39 sollen Untersuchungen durchgeführt werden, um zu klären, ob es organische Kationen in kompetitiven Lösungsmitteln chiral erkennen kann (siehe Kapitel 2.3.5). Die Synthese dieses Cyclopeptids, das drei Carboxylatgruppen direkt an den aroma-

tischen Untereinheiten besitzt, gelang durch Deprotonierung der Tricarbonsäure **4** (Schema 2.9).



Schema 2.9 Synthese des Tricarboxylates **39** durch einfache Deprotonierung der Tricarbonsäure **4**.

Als Gegenion wurde wie bei **5**, **6** und **34** das Tetra-*n*-butylammoniumion gewählt, um eine gute Löslichkeit des Salzes in organischen Lösungsmitteln zu erreichen.

2.2.1.2 Lineare Peptide mit Carboxylatgruppen

Die Untersuchungen der Rezeptoreigenschaften eines linearen Analogons der cyclischen Peptide erschien mir wichtig, denn Wirt-Gast-Untersuchungen mit linearen Peptiden sollten die Beantwortung der Frage ermöglichen, inwieweit eine Cavität zur Gastbindung überhaupt notwendig ist (siehe Kapitel 2.3.3.2).

Die Synthese von linearen Peptiden wie **40** (Abb. 2.5) ist auf unterschiedlichen Routen vorstellbar.

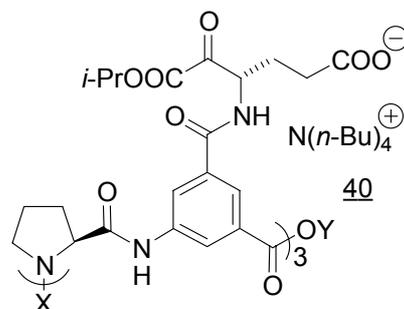
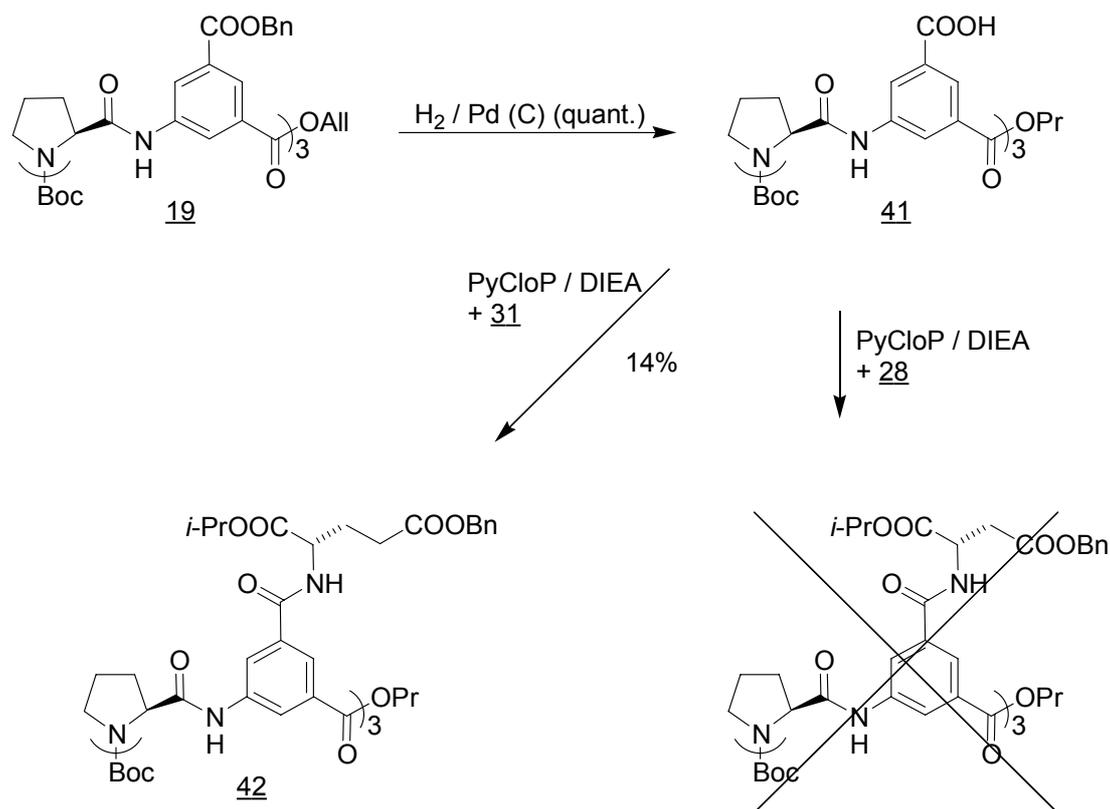


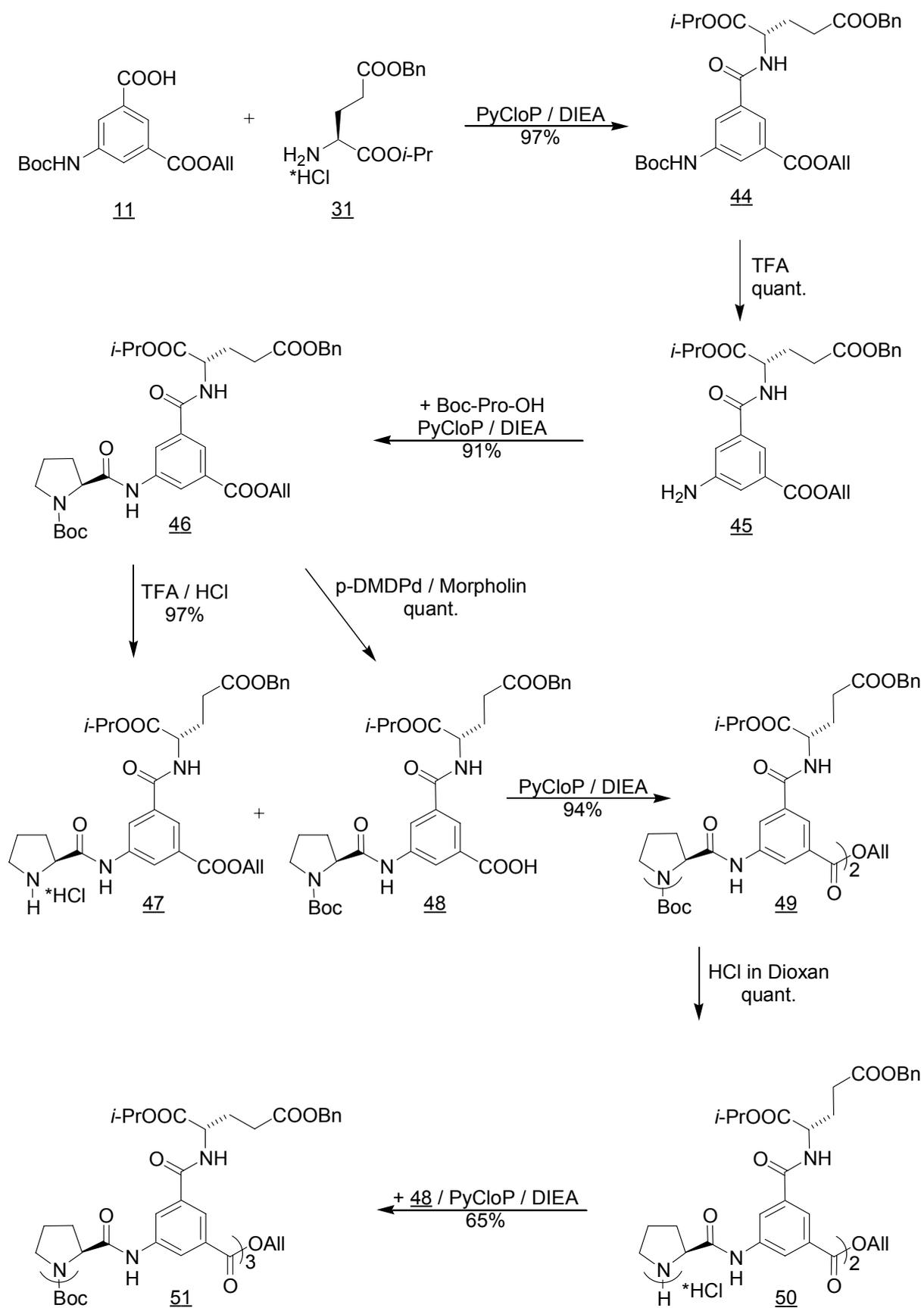
Abb. 2.5 Lineares Analogon von Cyclopeptid **6**, X und Y sind Schutzgruppen.

Einfachster Ausgangspunkt schien mir das lineare Hexapeptid 19 (siehe Schema 2.10) zu sein, das ich bereits während der Synthese des Cyclopeptids 4 darstellen konnte. Um an 19 periphere Substituenten zu binden, müssen nur die drei Benzylestergruppen gespalten werden. Die dabei auftretende Hydrierung des Allylesters zum Propylester stellt kein Problem dar. An die freien Carboxylgruppen von 41 könnten dann in Analogie zu den Cyclopeptiden periphere Substituenten gebunden werden.



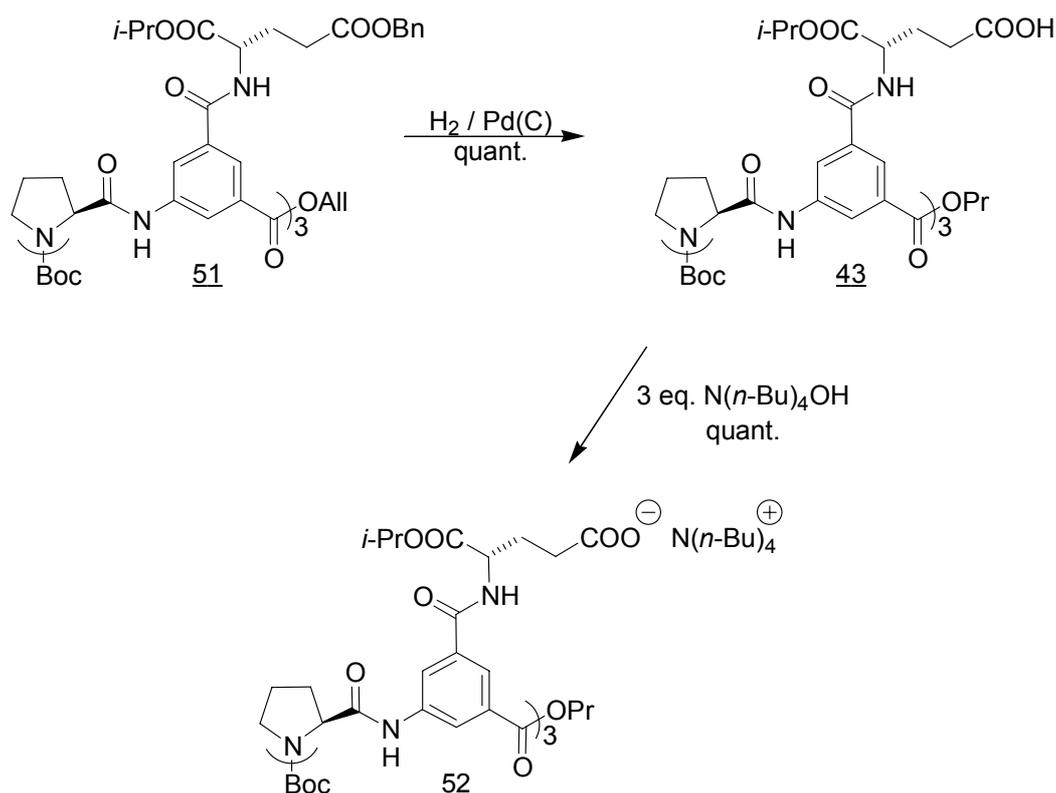
Schema 2.10 Erste Versuche zur Synthese eines linearen Analogons von 6.

Die Peptidkupplung der Tricarbonsäure 41 mit dem Asparaginsäurederivat 28 gelang allerdings nicht, da mehrere dabei auftretende Nebenprodukte eine Produktisolierung unmöglich machten. Bei Verwendung des Glutaminsäurederivates 31 konnten kleine Mengen des gewünschten Produktes nach mehreren Reinigungsschritten sauber erhalten werden. Die Ausbeute war mit 14% jedoch zu klein, um auf diesem Weg ausreichende Mengen 42 darzustellen. Daher versuchte ich eine andere, längere Syntheseroute, die analog zu der Synthese der cyclischen Tricarbonsäure 4 verläuft. Der Unterschied liegt darin, daß anstelle der Benzylestergruppen bereits zu Beginn der Synthese die periphere Aminosäure an die Aminoisophthalsäureeinheit gebunden wird (Schema 2.11).



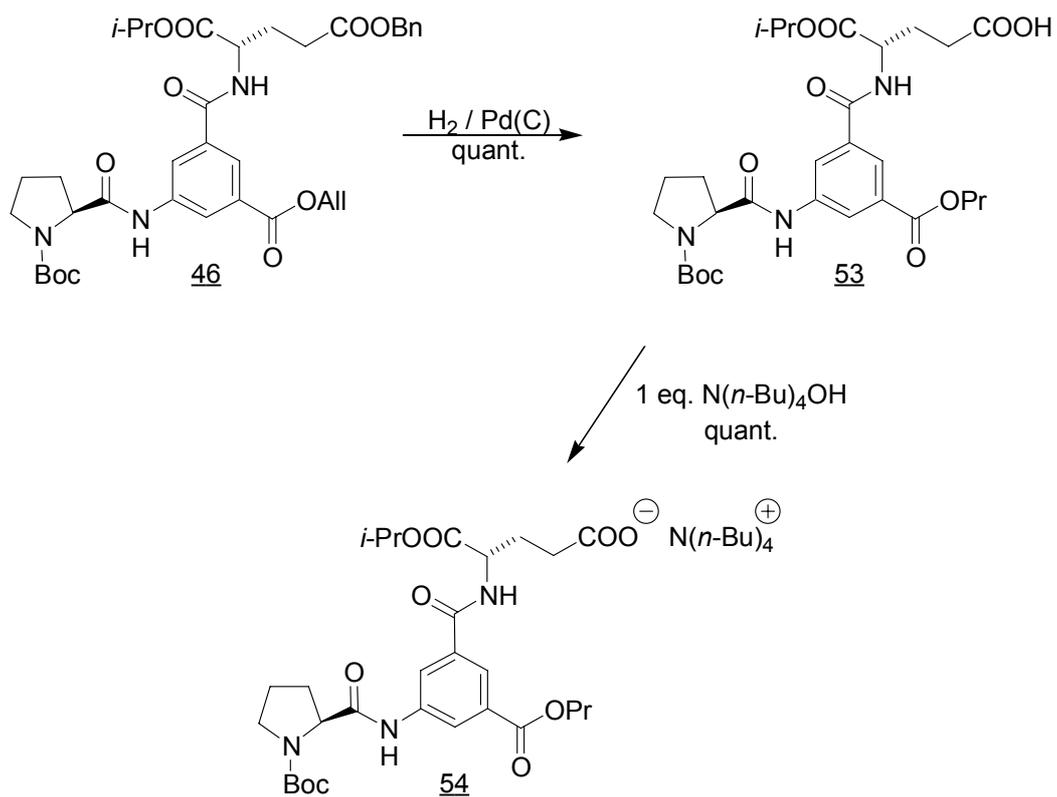
Schema 2.11 Aufbau der Peptidkette des noch geschützten linearen Hexapeptids **51**.

Die Synthese beginnt mit der Amidkupplung der beiden von mir bereits zuvor dargestellten Verbindungen 11 und 31. Das entstandene Peptid 45 kann Boc-entschützt und dann mit Boc-Prolin zum „Dipeptid“ 46 umgesetzt werden. Die Verlängerung zum linearen „Hexapeptid“ gelang entsprechend der Synthese von 19 (siehe Schema 2.4), das eine Vorstufe der cyclischen Tricarbonsäure 4 darstellt. 51 mußte jetzt nur noch an den Benzylestern hydrogenolytisch gespalten und zum Trianion deprotoniert werden (Schema 2.12).



Schema 2.12 Entschützung und Deprotonierung von 51 zum Trianion 52.

Auf diesem Weg gelang mir die Darstellung genügender Mengen 52. Da ich auf diesem Weg auch das „Dipeptid“ 46 mit zusätzlicher Glutaminsäure als Seitenamino­säure dargestellt habe, lag es nahe, hieraus ein lineares Peptid herzustellen, das genau wie das Hexapeptid 52 alle funktionellen Gruppen der cyclischen trianionischen Peptide, jedoch in geringerer Anzahl, besitzt. Die ausgehend von 46 zweistufige Synthese führte quantitativ zum Monocarboxylat 54 (Schema 2.13). Dieses stellt die kleinste repräsentative strukturelle Einheit des cyclischen Peptids 6 dar.

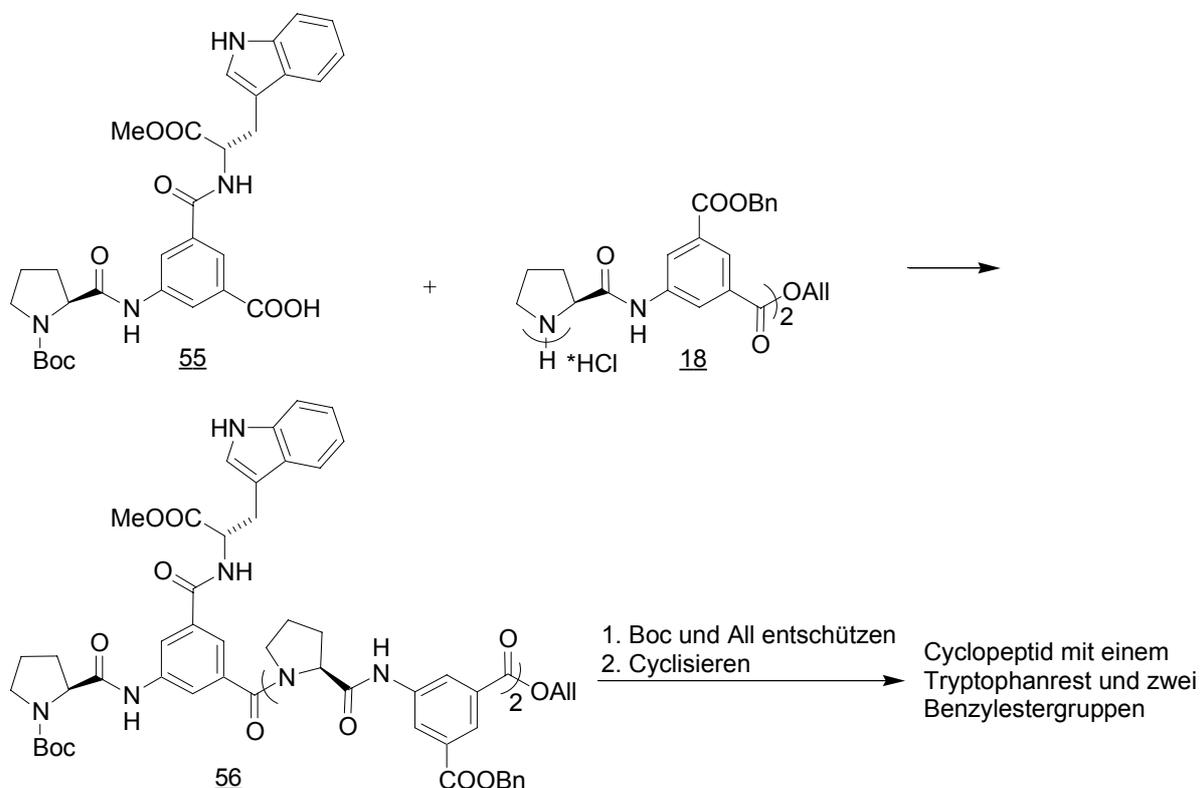


Schema 2.13 Entschützung und Deprotonierung von **46** zum Monocoxylylat **54**.

2.2.1.3 Cyclopeptide mit einem hydrophoben Aminosäuresubstituenten

Zur Substratbindung, insbesondere der von Kohlenhydraten, kommen auch Aminosäuren mit aromatischen Substituenten in Betracht, die hydrophobe oder CH- π -Wechselwirkungen zu den eingelagerten Substraten ausbilden können. In diesem Zusammenhang wollte ich nur eine hydrophobe Aminosäure in die cyclischen Rezeptoren einführen und zwei Carboxylate am Grundgerüst belassen. Dies ist ein biomimetischer Ansatz, denn in natürlichen Enzymen und Rezeptoren findet man ebenfalls eine Kombination verschiedener nicht-kovalenter Wechselwirkungen bei der Monosacchariderkennung (siehe Einleitung, Abb. 1.5).

Ich entschied mich für die Verwendung von Tryptophan, da der Indolrest dieser Aminosäure auch in natürlichen Systemen oft eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung spielt.



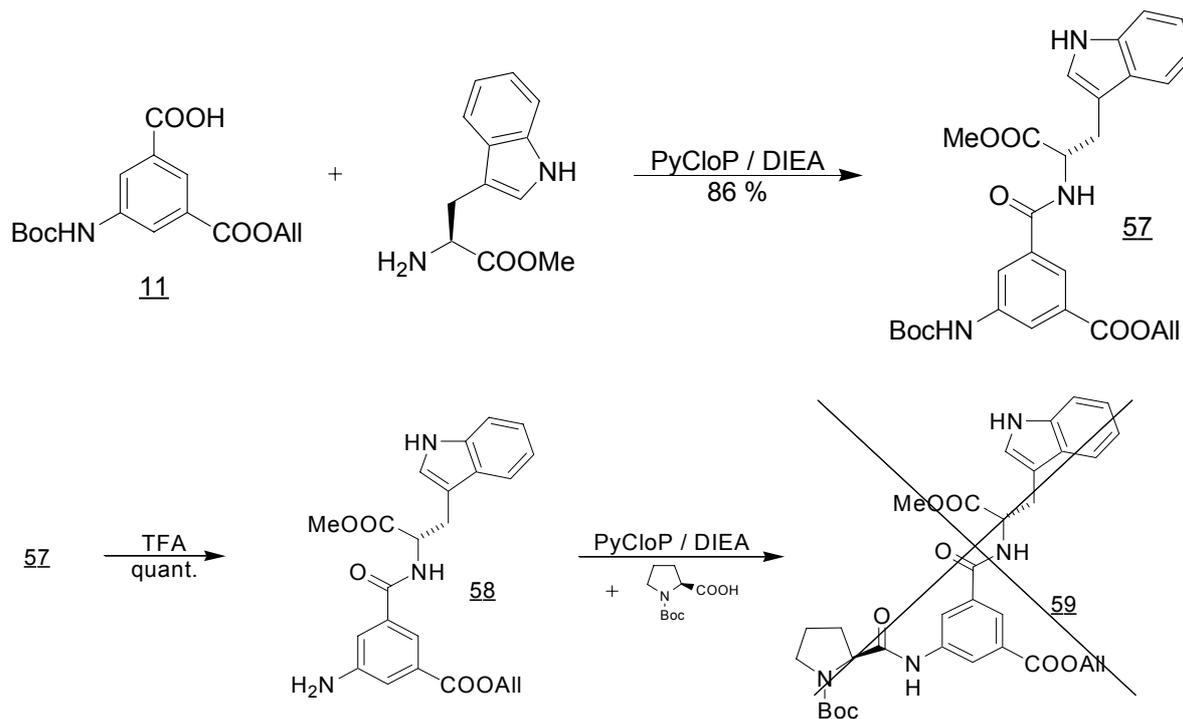
Schema. 2.14 Synthesestrategie für ein Cyclopeptid, das eine Tryptophanseitenaminosäure und zwei Benzylestergruppen trägt.

Die Synthese solcher asymmetrisch substituierter Cyclopeptide ist auf mehreren Wegen denkbar. So könnten die verschiedenen peripheren Substituenten bereits vor der Cyclisierung an geeigneten Dipeptiden (analog zu 14) anstelle der Benzylestergruppen eingeführt werden. Eine Kupplung mit einem bereits cyclisierten Derivat wäre jedoch auch möglich. Um in der Wahl der beiden anderen peripheren Aminosäuren neben Tryptophan möglichst flexibel zu

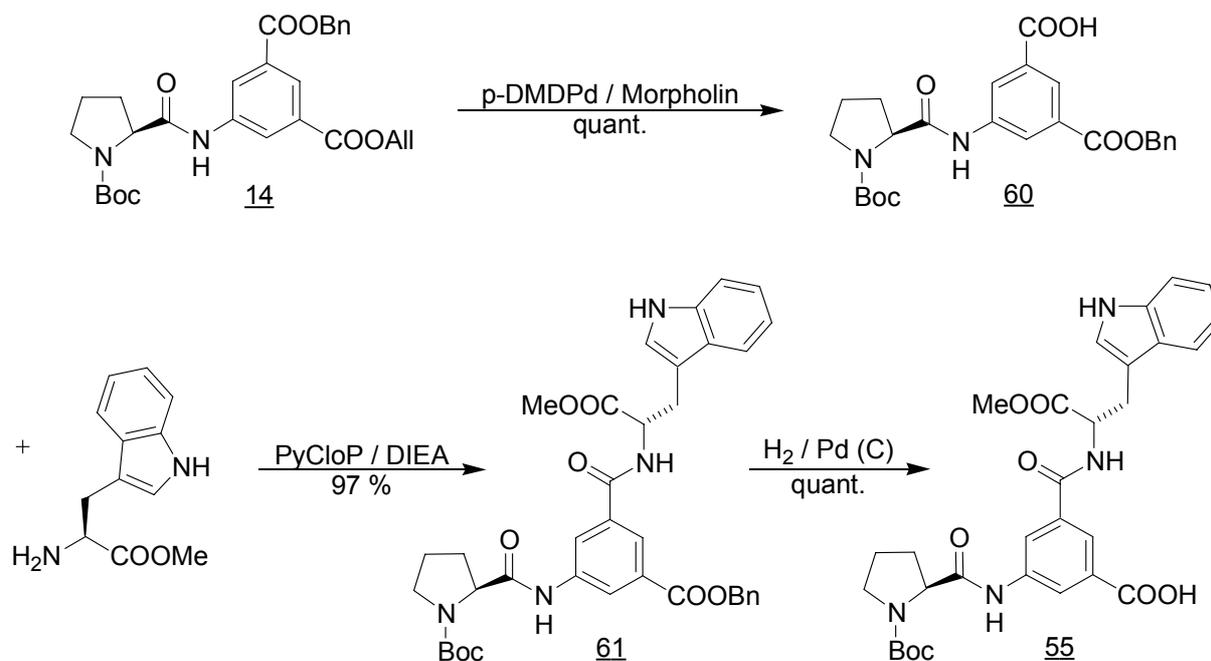
sein, entschied ich mich, zur Cyclisierung eine lineare Vorstufe zu verwenden, die nur die Tryptophaneinheit bereits als Seitenaminosäure trägt. Diese Synthesestrategie ist in Schema 2.14 dargestellt.

Um ein Dipeptid mit Tryptophanseitengruppe darzustellen, versuchte ich zunächst die Synthese ausgehend vom geeignet geschützten 5-Aminoisophthalsäurederivat **11** und dem kommerziell erhältlichen Tryptophanmethylester (Schema 2.15).

*Schema. 2.15 Erster Versuch, das Dipeptid **55** darzustellen.*



Leider führten die Kupplungsversuche von **58** und Boc-Prolin unter Verwendung von PyCloP als Kupplungsreagenz zu einem chromatographisch nicht zu trennenden Produktgemisch aus mehreren verschiedenen Substanzen. Offensichtlich fanden hier verschiedene Nebenreaktionen statt, die die Ausbeute stark herabsetzten und eine Isolierung von **59** sehr erschwerten. Ich versuchte daher, die Reihenfolge, in der die drei Aminosäuren 5-AIS, Prolin und Tryptophan verknüpft werden, zu ändern. Erfolgreich war folgende Synthese, die es erlaubte, größere Mengen **55** darzustellen (Schema 2.16).

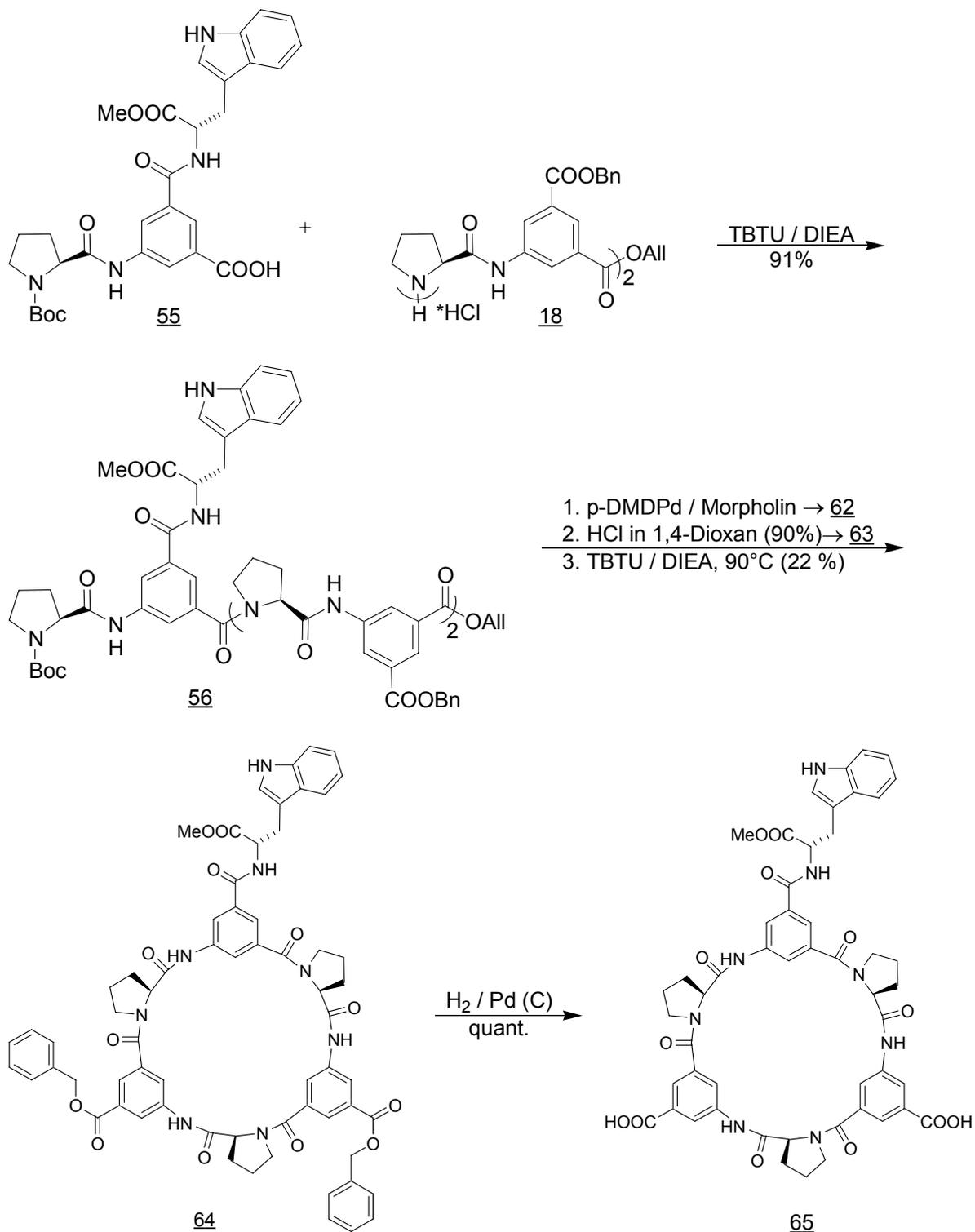


Schema. 2.16 Syntheseroute, die erfolgreich zur Darstellung von **55** genutzt werden konnte.

Diese Synthese verlief problemlos und mit sehr guten Ausbeuten. Einziger Unterschied zu der Syntheseroute, die ich zuerst erfolglos versuchte (Schema 2.15) ist, daß keine Amidkupplung eines aromatischenamins bei Anwesenheit eines Tryptophanrestes in einem der Edukte durchgeföhrt wurde. Der Syntheseweg beginnt beim Dipeptid **14**, dessen Darstellung ich schon zuvor (Schema 2.3) entwickelt hatte.

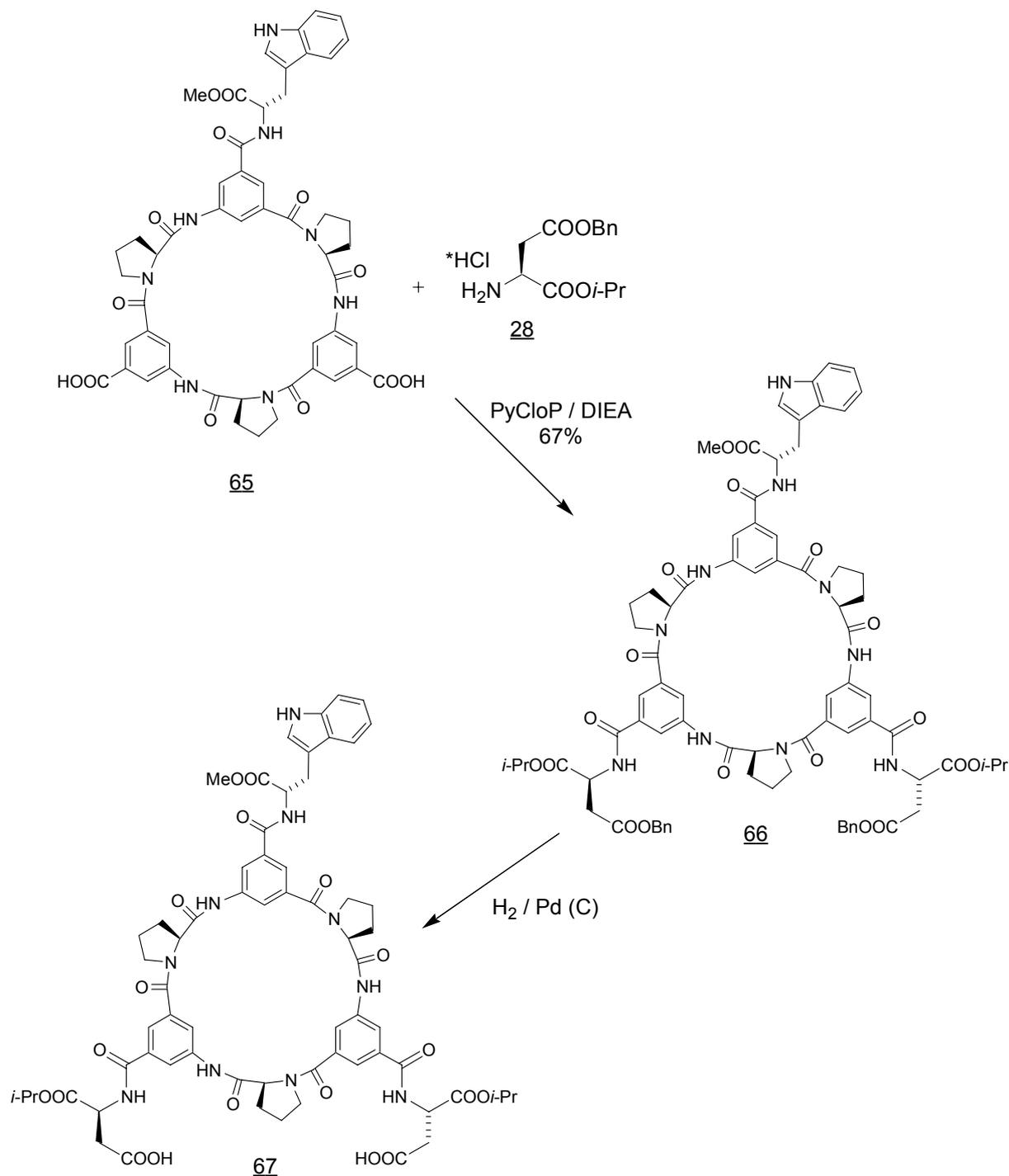
Auch das Tetrapeptid **18** mit zwei Benzylesterseitengruppen, das nun zur Verlängerung von **39** zum linearen Hexapeptid **56** nötig ist, habe ich bereits in der Synthese der Tricarbonsäure **4** verwendet (siehe Schema 2.4). Bei allen in Schema 2.17 gezeigten Syntheseschritten waren die Ausbeuten geringer als erwartet. Besonders fiel hier die Makrocyclisierung mit nur 22% Ausbeute negativ auf, einer deutlich geringeren Ausbeute als bei der analogen Reaktion in der Synthese des cyclischen Grundbaustein **4**, bei der kein Tryptophanbaustein anwesend war. Außerdem wurden bei einigen Syntheseschritten in den Dünnschichtchromatogrammen Nebenprodukte beobachtet. Deren Auftreten schmälerte die Ausbeuten und rührte wahrscheinlich von Nebenreaktionen her, die auf den Tryptophanrest zurückzuführen waren. Bei der hydrogenolytischen Spaltung der Benzylestergruppen von **64**, die zur cyclischen Dicarbonsäure **65** führt, konnte ich nur ein gefärbtes, also verunreinigtes Produkt erhalten. Insgesamt verlief die Synthese bis zu diesem Punkt mit geringeren Ausbeuten und führte nicht zu einem analysenreinen Grundbaustein **65**. Trotzdem versuchte ich die weiteren Syntheseschritte auf dem Weg zu einem Cyclopeptid, das einen Tryptophanrest und zwei andere Aminosäuren in der Peripherie besitzt. Dazu mußte ich im nächsten Schritt die beiden freien Carbonsäuregruppen von **65** mit Aminosäuren über deren freie Aminogruppen

kuppeln. Die Wahl fiel hier auf das Asparaginsäurederivat 28 (siehe Schema 2.18).



Schema. 2.17 Synthese von 65, einem mit 4 verwandten Cyclopeptid, das zwei freie Carboxylgruppen und einen Tryptophanrest besitzt.

Schon bei der Peptidkupplung von **65** mit dem Asparaginsäurederivat **28** entstanden erhebliche Mengen mehrerer Nebenprodukte, die nur schlecht chromatographisch vom Produkt abzutrennen waren. Das Auftreten von Nebenreaktionen spiegelte sich auch in der deutlich unter den Erwartungen liegenden Ausbeute von nur 67% wieder.



Schema. 2.18 Weitere Syntheseschritte auf dem Weg zu dem asymmetrisch substituierten Cyclopeptid **67**.

Auch durch die Verwendung des Kupplungsreagenz TBTU anstelle von PyCloP konnte die

Ausbeute nicht verbessert werden. Aufgrund der schlechten Gesamtausbeute der Synthese von 66 konnten nur etwa 300 mg dieser Substanz in zwei getrennten Ansätzen dargestellt und mäßig gut gereinigt werden. Eine mit den theoretischen Werten übereinstimmende Elementaranalyse (C, H und N-Gehalt) wurde nicht erhalten.

Die anschließende Spaltung der beiden Benzylestergruppen an den beiden Aspartatresten verlief ebenfalls unter Bildung mehrerer Nebenprodukte und eines wahrscheinlich deshalb intensiv rot gefärbten Produktes. Aufgrund der komplexen Produktzusammensetzung konnte hieraus leider kein sauberes 67 erhalten werden.

Da die hier dargestellten Schwierigkeiten in der Synthese offensichtlich von der Aminosäure Tryptophan verursacht wurden, stellte ich weitere Versuche mit dieser Aminosäure ein.

2.2.1.4 Cyclopeptide mit Phosphonatgruppen

Die bisher dargestellten Rezeptoren besitzen als Wasserstoffbrückenakzeptoren Carboxylate. Andere anionische funktionelle Gruppen sind hier aber als Alternative denkbar und besonders Phosphonate (und Phosphate) sind von den Arbeitsgruppen um Hamilton, Diederich und Schneider zur Komplexierung von Kohlenhydraten erfolgreich verwendet worden.^[51-54] Daher entschied ich mich, andere Cyclopeptide mit Phosphonatgruppen als mögliche Kohlenhydratrezeptoren darzustellen.

Da ich möglichst nur den Einfluß der Art der anionischen Gruppe auf die Bindungseigenschaften ohne weitere Änderungen an der Rezeptorstruktur untersuchen wollte, plante ich die Synthese des Trisphosphonats 68. Es leitet sich strukturell direkt von Cyclopeptid 6 durch Austausch der Carboxylate durch Phosphonatgruppen ab (Abb. 2.6).

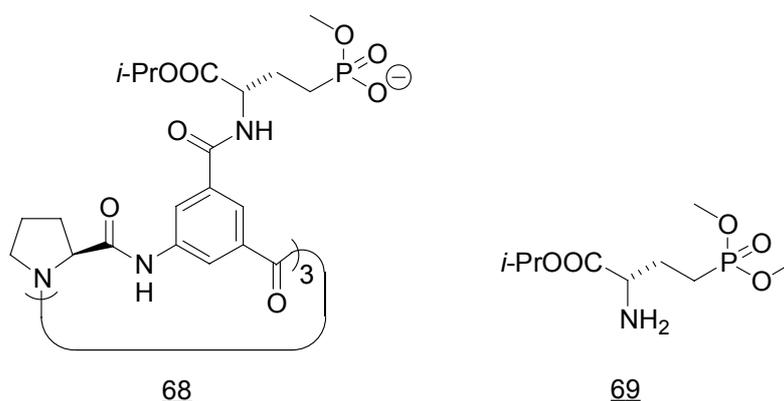
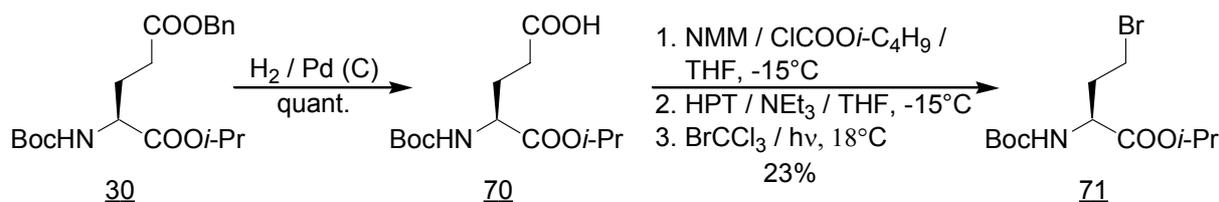


Abb. 2.6 Trisphosphonat 68 und zugehörige periphere Aminophosphonsäure 69.

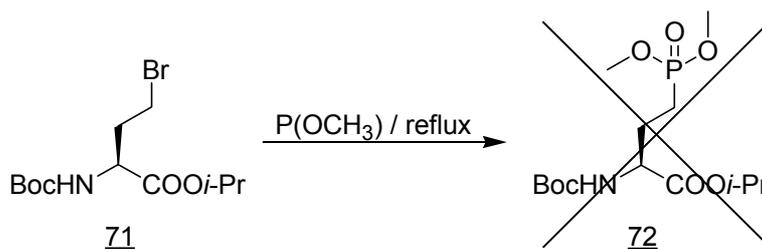
Zur Darstellung von 68 benötigte ich die Aminophosphonsäure 69. Sie sollte durch eine Michaelis-Arbuzow-Reaktion, die oft zur Darstellung von Phosphonaten angewandt wird, aus dem Bromid 71 (Schema 2.19) darstellbar sein. In der Literatur bekannt ist ein sehr ähnliches

Derivat der Glutaminsäure, das sich von 71 nur durch die verwendeten Schutzgruppen unterscheidet.^[55] Von mehreren beschriebenen Synthesen wählte ich die kürzeste aus, die außerdem bei dem bereits zuvor von mir dargestellten Glutaminsäurederivat 30 (siehe Schema 2.7) beginnt. Nach der unproblematisch verlaufenden Spaltung des Benzylesters von 30 schloß sich eine oxidative Decarboxylierung der freien Carbonsäure 70 zur Darstellung des Bromids 71 an. Sie wurde entsprechend einer Vorschrift von Barton durchgeführt.^[55,56]



Schema. 2.19 Darstellung des Bromids 71 durch Entschützung und anschließender oxidativer Decarboxylierung der Carbonsäure 70. NMM = N-Methylmorpholin, HPT = N-Hydroxypyridin-2-thion.

Die in der Literatur beschriebene Ausbeute von über 80% konnte leider nicht erreicht werden und trotz mehrerer Versuche wurde das Produkt 71 nach säulenchromatographischer Reinigung, anschließender Umkristallisation und nachfolgender Sublimation im Vakuum nicht elementaranalysenrein erhalten. Trotzdem versuchte ich, die Synthese mit dem verunreinigten Bromid fortzusetzen. Der nächsten Schritt bestand in der Michaelis-Arbuzow-Reaktion mit Trimethylphosphit (Schema 2.20). Das gewünschte Produkt 72 ließ sich allerdings nicht isolieren.

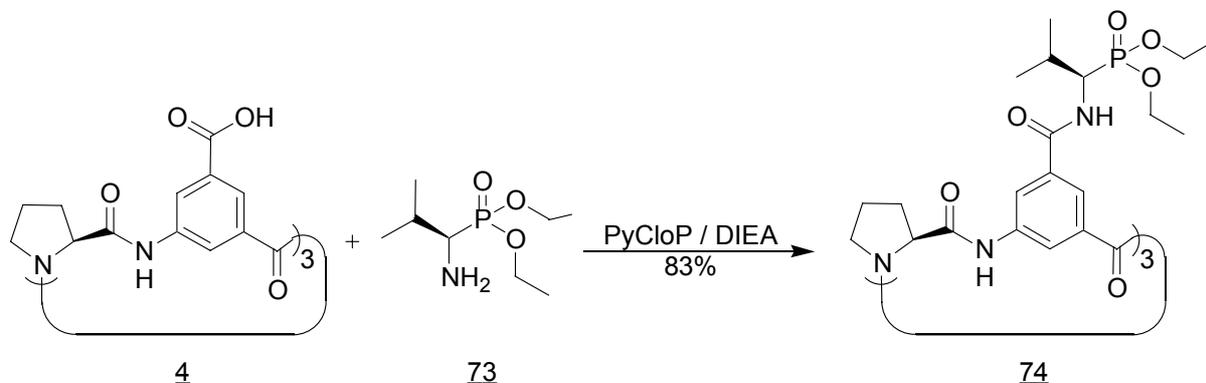


Schema. 2.20 Michaelis-Arbuzow-Reaktion zur Darstellung des Dimethylphosphonats 72.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten bei der Synthese von 72 beschloß ich, eine einfachere Aminophosphonsäure an das Grundgerüst 4 zu binden. Dabei verzichtete ich auf die strenge Analogie zu einer der Carboxylatrezeptoren 5, 6 und 34 um zunächst einmal zu klären, ob eine Aminophosphonsäure überhaupt über eine Amidkupplung mit der Tricarbonsäure 4 verbunden werden kann und ob der nachfolgende Reaktionsschritt, nämlich die Hydrolyse der Phosphonsäureester, am Cyclopeptid prinzipiell durchführbar ist. Sollten diese beiden

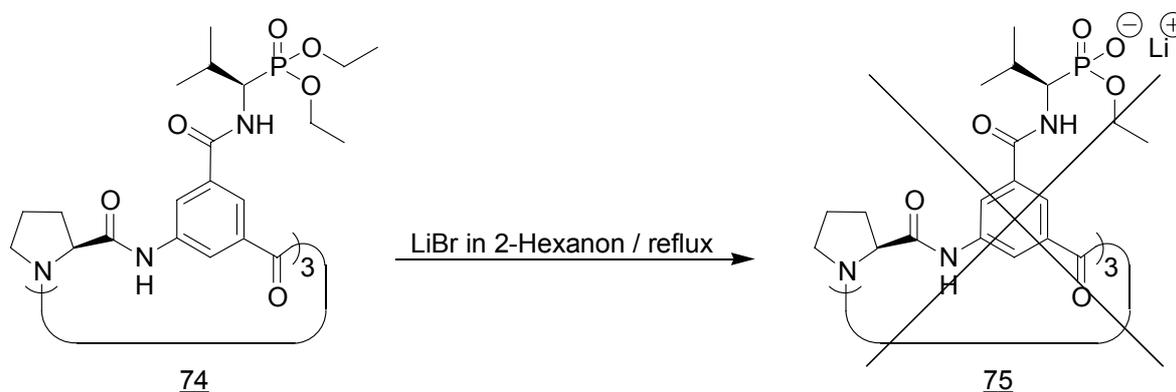
Syntheseschritte ohne Probleme gelingen, könnte ich die Synthese der Aminophosphonsäure 69 erneut auf einem anderen Weg als bisher versuchen.

Die Aminophosphonsäure 73 ist in unserem Institut bekannt.^[57] Ich konnte sie an die Tricarbonsäure 4 kuppeln (Schema 2.21).



Schema. 2.21 Kupplung der Aminophosphonsäure 73 mit Grundbaustein 4.

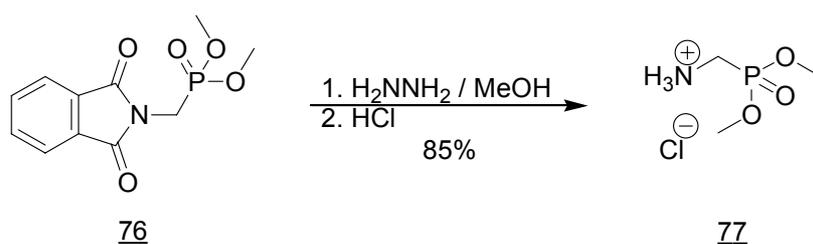
Der nächste Schritt, die Entschützung der Phosphonsäuregruppen unter Freisetzung der Monophosphonatgruppen, ist für Diethylphosphonate literaturbekannt. Mit Lithiumbromid im Lösungsmittel 2-Hexanon wird pro Phosphonatgruppe nur eine Ethylestergruppe selektiv gespalten.^[58] Diese Reaktion verlief jedoch bei Verwendung von 74 als Edukt nicht wie gewünscht (Schema 2.22). Offensichtlich wurde das Molekül weiter abgebaut als angenommen, da nach dem Aufarbeiten im $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR des Produkts keine Phosphoresonanz mehr sichtbar war. Die Hydrolyse der Phosphonsäurediethylestergruppen von 74 war also auf diesem Weg nicht möglich. Alternative Spaltungsmöglichkeiten wie das Erwärmen mit Tetra-*n*-butylhydroxidlösung in der Siedehitze erschienen mir zu drastisch, weshalb ich keine Versuche hierzu durchführte.



Schema. 2.22 Der Versuch, die Phosphonsäureestergruppen von 74 mit LiBr zu spalten, führte wahrscheinlich zu einer Zersetzung des Edukts.

Es hätte hiernach nahegelegen, 74 zu modifizieren und anstelle der Ethylestergruppen

Methylestergruppen als Schutzgruppe zu verwenden, da diese vermutlich einfacher zu spalten sein würden. Dazu hätte aber die gesamte Synthese von 73, u.a. mit einer aufwendigen Diastereomerentrennung, durchgeführt werden müssen. Da es jedoch zu diesem Zeitpunkt fraglich war, ob diese aufwendige Synthese gerechtfertigt sein würde, wollte ich einen noch einfacheren Aminophosphonsäuredimethylester verwenden. Besonders leicht zugänglich erschien mir die zu Glycin analoge Aminophosphonsäure 77, deren Phthalimidderivat 76 kommerziell erhältlich und durch Hydrazinolyse in das freie Amin überführbar ist (Schema 2.23).^[59]



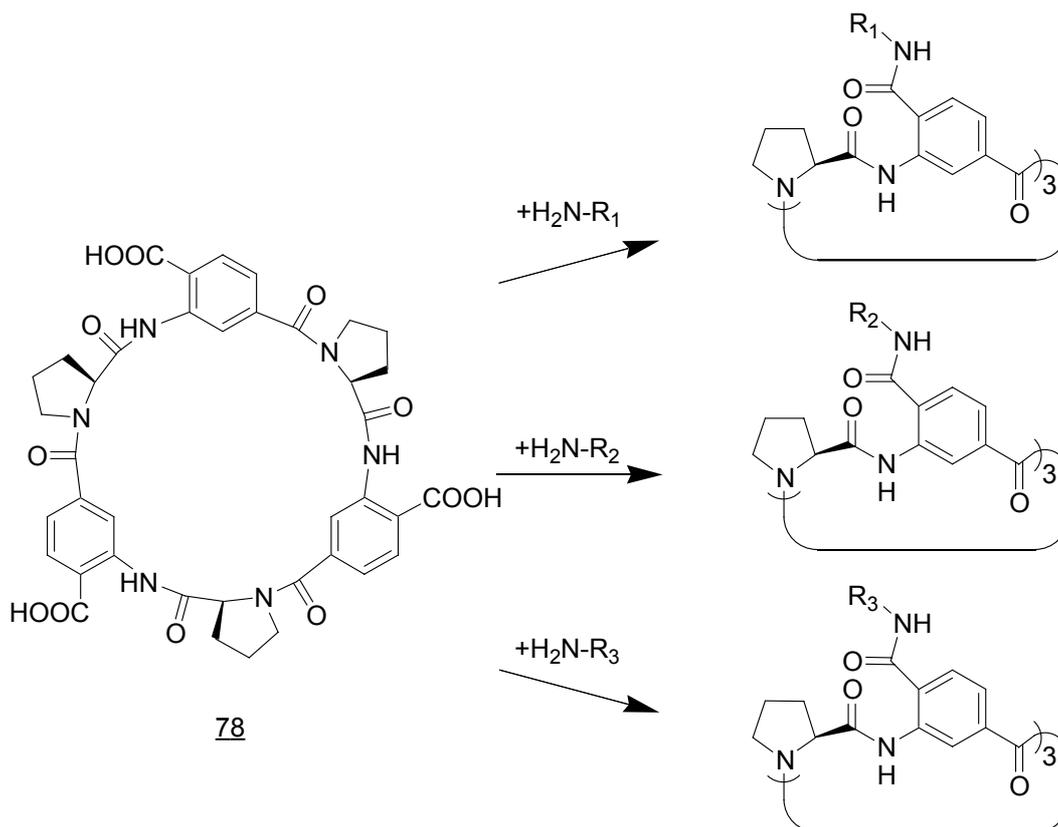
Schema. 2.23 Hydrazinolyse des Phthalimidomethylphosphonsäuredimethylesters 76 nach Hirschmann et. al.

Die anschließende Kupplung von 77 mit der Tricarbonsäure 4 führte nicht zum gewünschten Produkt. Im DC der Reaktion waren nur sehr geringe Mengen eines Kupplungsproduktes sichtbar, weshalb ich die Reaktionszeit erheblich erhöhte. Dies und auch die Erhöhung der Konzentrationen der Hilfsbase und des Kupplungsreagenz PyCloP führten aber nicht zum gewünschten Erfolg.

Da keiner der von mir verfolgten Ansätze zu einem Cyclopeptid führte, das Phosphonatgruppen zur Substratbindung besitzt, stellte ich die Synthesen zu diesem Thema ein.

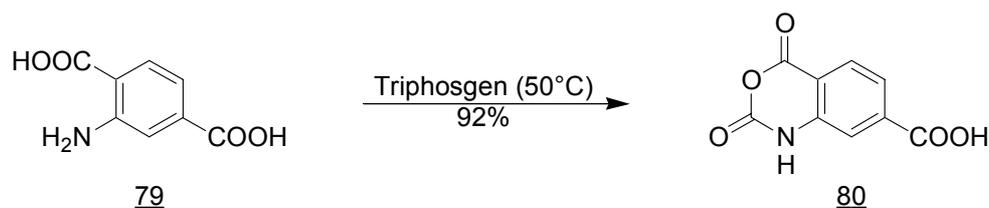
2.2.2 Peptide mit Aminoterephthalsäure

Peptide, die die aromatische Aminosäure Aminoterephthalsäure anstelle der bisher von mir verwendeten Aminoisophthalsäure enthalten, versprochen eine größere konformative Rigidität und damit eine bessere Präorganisation zur Substratbindung. In Anlehnung an den zentralen cyclischen Baustein **4**, der die Stammverbindung der Rezeptoren **5**, **6** und **34** darstellt, plante ich die Synthese von Verbindung **78**. Sie sollte wie **4** als Stammverbindung einer Familie von cyclischen Rezeptoren genutzt werden können (Schema 2.24).



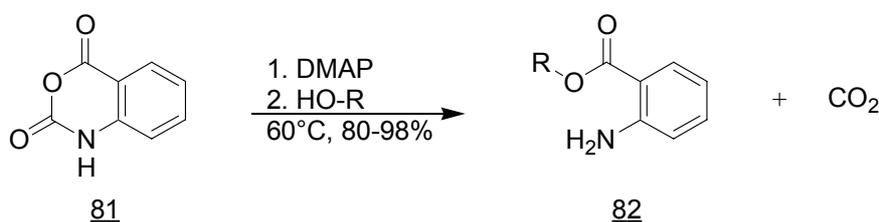
Schema 2.24 Die Tricarbonsäure **78** ist als zweite Stammverbindungen einer neuen Familie von Rezeptoren gedacht.

Zur Synthese von **78** waren, wie bei der Synthese des regioisomeren Cyclopeptids mit 5-Aminoisophthalsäureeinheiten, zwei Grundbausteine notwendig. Neben dem kommerziell erhältlichen Boc-Prolin mußte die Aminoterephthalsäure zunächst mit den geeigneten Schutzgruppen versehen werden. Die Herausforderung bestand hier darin, ihre beiden Carbonsäuregruppen selektiv zu schützen. Aufgrund der besonderen ortho-Stellung der Aminogruppe zu einer der beiden Carbonsäuregruppen war dafür eine neue Schutzgruppenstrategie nötig. Bereits bekannt war die Umsetzung der Aminoterephthalsäure mit Bis-(trichlormethyl)-carbonat („Triphosgen“) zum *N*-Carboxyamino-terephthalsäureanhydrid (Schema 2.25).^[60]



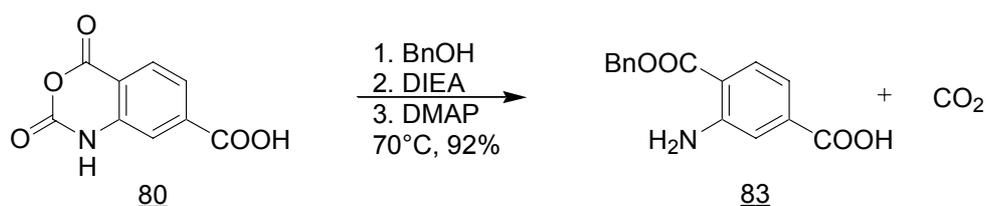
Schema 2.25 Darstellung des cyclischen Anhydrids der N-Carboxyanthranilsäure.

Für das zu 80 analoge Derivat 81 der Anthranilsäure war außerdem bekannt, daß sie sich mit Nucleophilen, wie z.B. Alkoholen, selektiv zu Estern wie 82 umsetzen läßt (Schema 2.26).^[61]



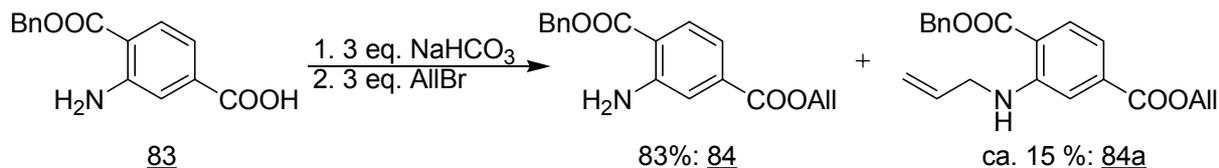
Schema 2.26 Darstellung von Anthranilsäureestern durch Umsetzung der N-Carboxyanthranilsäure mit einem Alkohol unter CO₂-Freisetzung. DMAP = 4-(N,N-dimethylamino)-pyridin.

Ich konnte diese Art der Reaktion erfolgreich auf das Aminoterephthalsäurederivat 80 übertragen und so den Aminoterephthalsäuremonobenzylester 83 in sehr guter Ausbeute darstellen. Den Benzylalkohol verwendete ich dabei als Lösungsmittel (Schema 2.27).



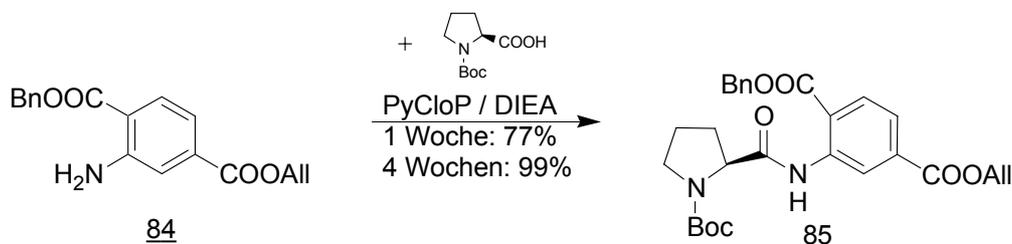
Schema 2.27 Nucleophile Öffnung des cyclischen Anhydrids der N-Carboxyanthranilsäure.

Im nächsten Schritt konnte ich die zweite Carbonsäuregruppe verestern, ohne zuvor die Aminogruppe schützen zu müssen. Diese ist ein sehr schlechtes Nucleophil und reagiert daher nur langsam mit dem verwendeten Allylbromid. Das erhaltene Produktgemisch der Veresterung enthält neben 83 % gewünschtem Produkt nur etwa 15 % N-alkylierte Verbindungen, wie aus einem CI-Massenspektrum abgeschätzt werden konnte (Schema 2.28).



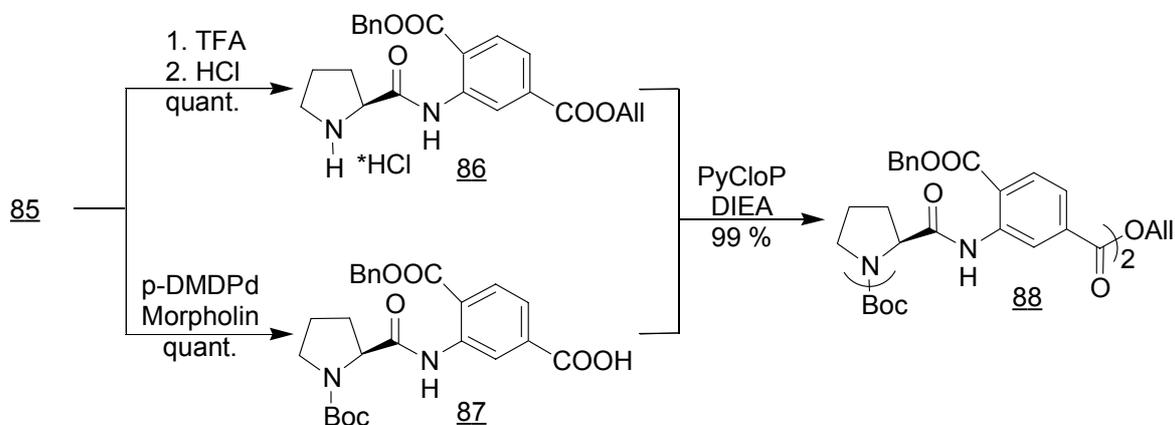
Schema 2.28 Veresterung der zweiten Carbonsäuregruppe mit Allylbromid. Es entstehen nur relativ geringe Mengen des N-alkylierten Nebenprodukts 84a.

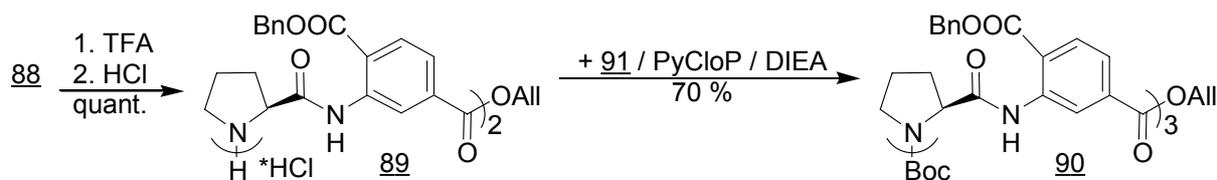
Die so dargestellte, an beiden Carbonsäuregruppen geschützte Aminoterephthalsäure konnte ich nun mit Boc-Prolin zum Dipeptid 85 umsetzen. Diese Reaktion verlief aufgrund der geringen Nukleophilie der Aminogruppe sehr langsam. Es wurden nach einer Woche 77%, nach vier Wochen aber 99% Ausbeute erzielt (Schema 2.29).



Schema 2.29 Darstellung des Dipeptids 85, das aus Aminoterephthalsäure und Prolin besteht und die richtigen Schutzgruppen zum Aufbau des cyclischen Peptids 78 besitzt.

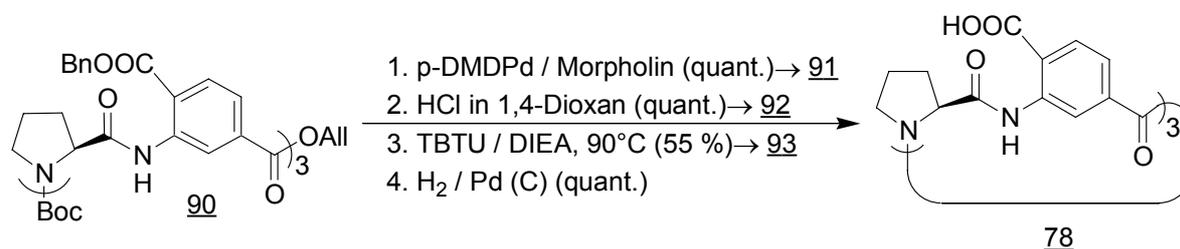
Nachdem auf diesem Wege genügend große Mengen des Dipeptids 85 dargestellt wurden, begann ich die Verlängerung der Peptidkette zum linearen Hexapeptid (Schema 2.30).





Schema 2.30 Verlängerung des Dipeptids 85 bis zum linearen Hexapeptid 90.

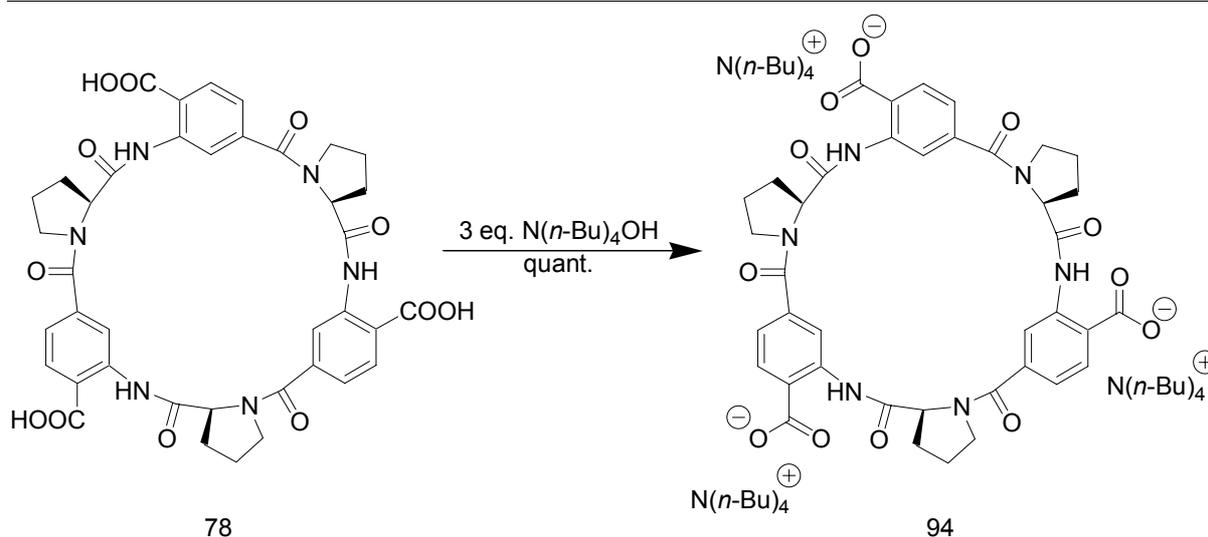
Nach Allylesterspaltung und Boc-Entschützung erhielt ich in guter Ausbeute das dreifach benzylestergeschützte Cyclopeptid 93 und konnte es unter Freisetzung der Tricarbonsäure 78 hydrogenolytisch entschützen (Schema 2.31).



Schema 2.31 Terminale Entschützen und Cyclisierung des linearen Hexapeptids 90. Letzter Schritt der Synthese von 78 ist die Spaltung der drei Benzylestergruppen vom Tribenzylester 93.

Der zweite cyclische Grundbaustein für neue Rezeptoren mit drei Carbonsäureankergruppen stand mir damit zur Verfügung. Ich versuchte nun, das Asparaginsäurederivat 28 mit Hilfe seiner freien Aminogruppe an diese Tricarbonsäure zu binden. Zunächst verwendete ich PyCloP als Kupplungsreagenz, das bei der analogen Kupplung der ersten Tricarbonsäure 4 mit verschiedenen Aminosäuren sehr gute Ausbeuten lieferte. In diesem Fall konnte ich aber weder durch Verlängerung der Reaktionszeit, Erhöhung der Reaktionstemperatur, Nachdosierung des Kupplungsreagenz oder Erhöhung der Hilfsbasenkonzentration das gewünschte Kupplungsprodukt beobachten. Als Alternative verwendete ich daher auch die bekannten und zur Amidkupplung oft verwendeten Reagenzien TBTU und BoP-Cl, beide allerdings ebenfalls ohne Erfolg. Dafür könnte eine intramolekulare Reaktion der durch die Kupplungsreagenzien aktivierten Carbonsäuregruppen mit den orthoständigen Amidgruppen verantwortlich sein. 78 konnte also nicht die erhoffte Rolle als zweiter zentraler Baustein und Stammverbindung einer weiteren Rezeptorfamilie einnehmen.

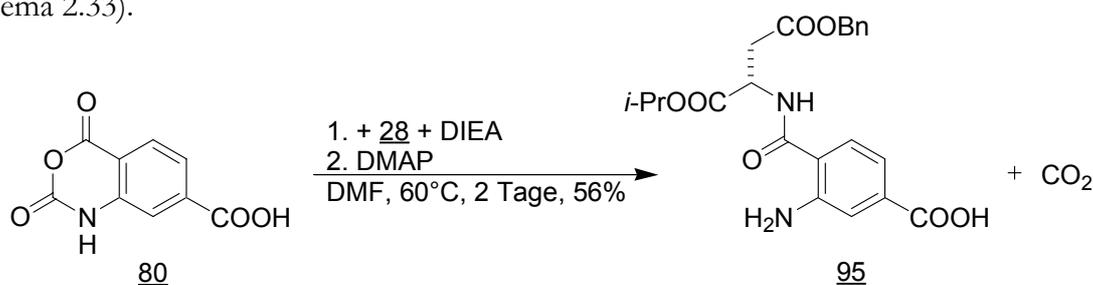
Es konnte aber durch Deprotonierung zur Synthese des Tricarboxylats 94 verwendet werden (Schema 2.32). Diese Verbindung ist ein Regioisomer von Cyclopeptid 41 und soll ebenfalls zur Komplexbildung chiraler organischer Kationen in kompetitiven Lösungsmitteln verwendet werden (siehe Kapitel 2.3.5).



Schema 2.32 Deprotonierung der Tricarbonsäure 78 zur Darstellung des Tricarboxylats 94. Es ist ein Regioisomeres des Tricarboxylats 41 (siehe Schema 2.8).

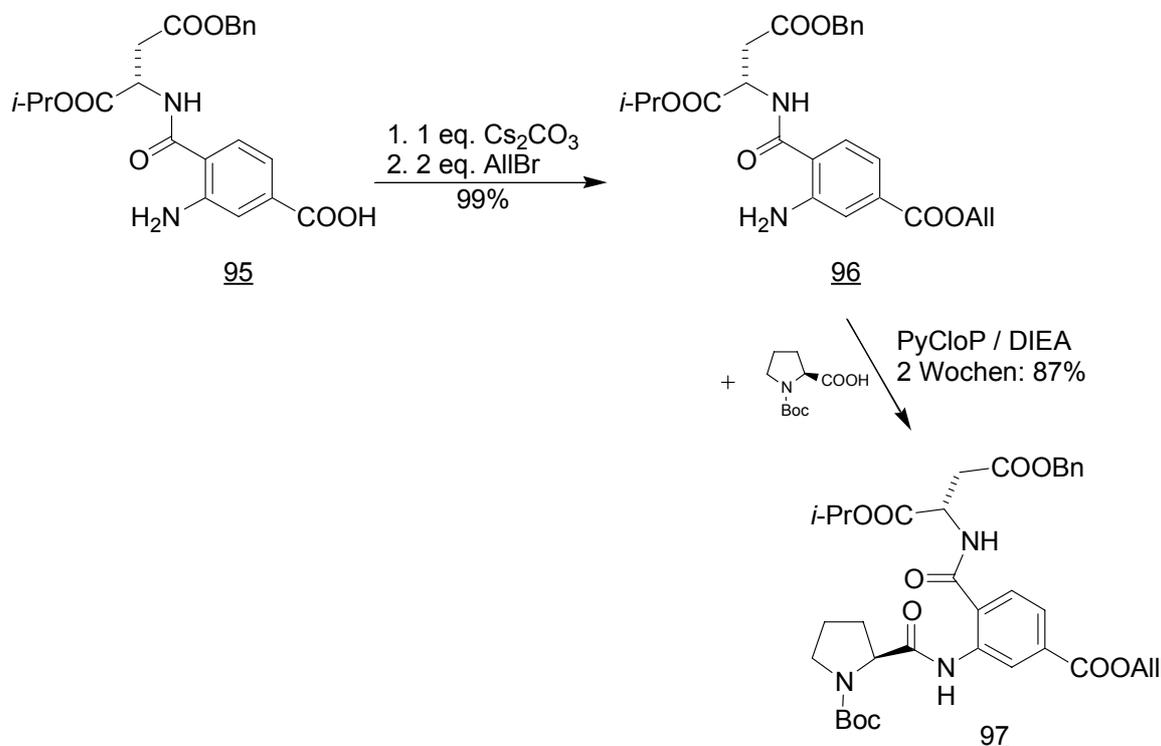
Die modulare Darstellung von Rezeptoren mit Aminoterephthalsäureeinheiten ist an den Schwierigkeiten bei der Kupplung von Substituenten an die Tricarbonsäure 78 gescheitert. Solche Verbindungen sind aber auch durch eine sequentielle Synthese zugänglich. Bei diesem Weg müssen die peripheren Aminosäuren bereits in der linearen Vorstufe vor der Cyclisierung vorhanden sein. Daß diese Synthesestrategie prinzipiell möglich ist, habe ich bereits bei der Synthese des linearen Tricarboxylats 52 zeigen können, dort allerdings für ein Peptid mit Isophthalsäureeinheiten. Aber auch für ein Peptid mit Aminoterephthalsäureeinheiten schien dies möglich zu sein, da sich das cyclische Anhydrid 80 nicht nur mit Alkoholen, sondern auch mit einem primären Amin wie dem Asparaginsäurederivat 28 nukleophil öffnen lassen sollte.

Ich entschied mich an dieser Stelle für die Synthese eines Rezeptors mit peripheren Asparaginsäuresubstituenten, da meine Untersuchungen zur Kohlenhydratkomplexierung mit den Rezeptoren auf Aminoisophthalsäurebasis 34, 5 und 6 zu diesem Zeitpunkt bereits gezeigt hatten, daß von diesen drei Cyclopeptiden der asparaginsäurehaltige Rezeptor 5 die größte Substrataffinität besitzt. Die nachfolgende Reaktion führte erfolgreich zu Verbindung 95, die nun eine amidisch an die Aminoterephthalsäure angebundene Asparaginsäureeinheit besitzt (Schema 2.33).



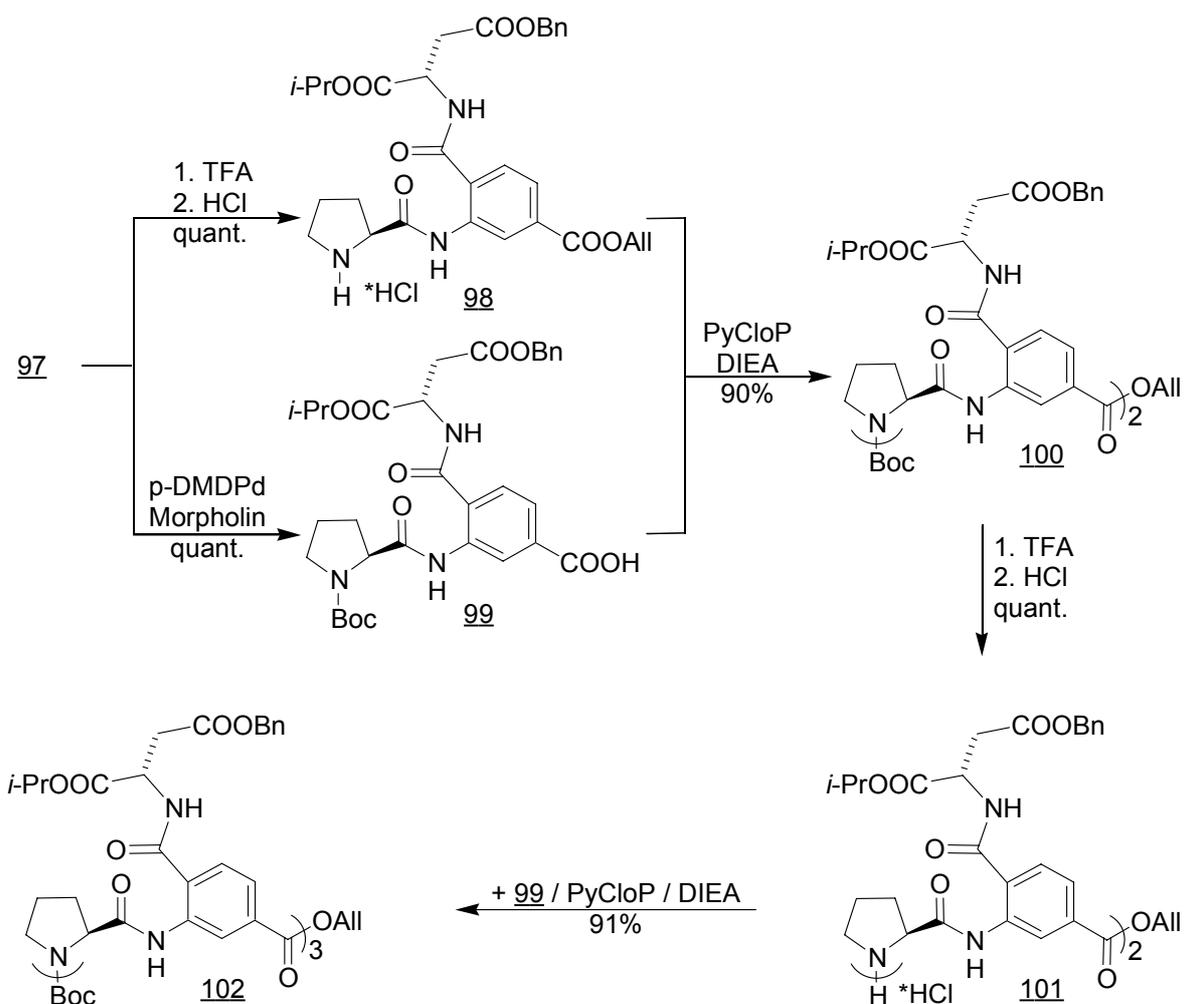
Schema 2.33 Das cyclischen Anhydrid 80 kann auch mit einem Amin nukleophil geöffnet werden.

Die Schwierigkeiten, die bei der Umsetzung der cyclischen Tricarbonsäure 78 zu einem Trisamid bestanden, traten hier nicht auf. In der weiteren Synthese mußte nun die zweite Carbonsäuregruppe von 95 zum Allylester umgesetzt und danach das erhaltene Produkt 96 mit Boc-Prolin zum Dipeptid gekuppelt werden (Schema 2.34).



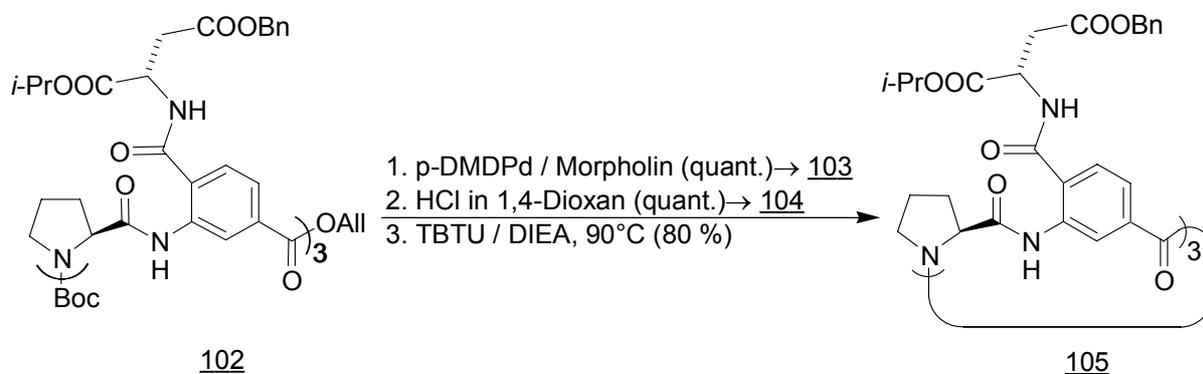
Schema 2.34 Darstellung des Dipeptids 97.

Bei der Umsetzung von 95 mit Allylbromid konnte die Reaktionszeit durch die Verwendung von Cäsiumcarbonat anstelle von Natriumhydrogencarbonat (wie beispielsweise bei der Reaktion von 83 mit Allylbromid) deutlich herabgesetzt werden. Zusätzlich wurde eine Alkylierung an der freien Aminogruppe von 95 so fast vollständig unterdrückt und eine nahezu quantitative Umsetzung erreicht. Die Kupplung zum Dipeptid benötigte erwartungsgemäß eine lange Reaktionszeit, die aber auf 2 Wochen beschränkt wurde. Die Verlängerung des Dipeptids 97 durch entsprechende Entschützungs- und Peptidkupplungsschritte verlief problemlos bis zum linearen Hexapeptid (Schema 2.35).



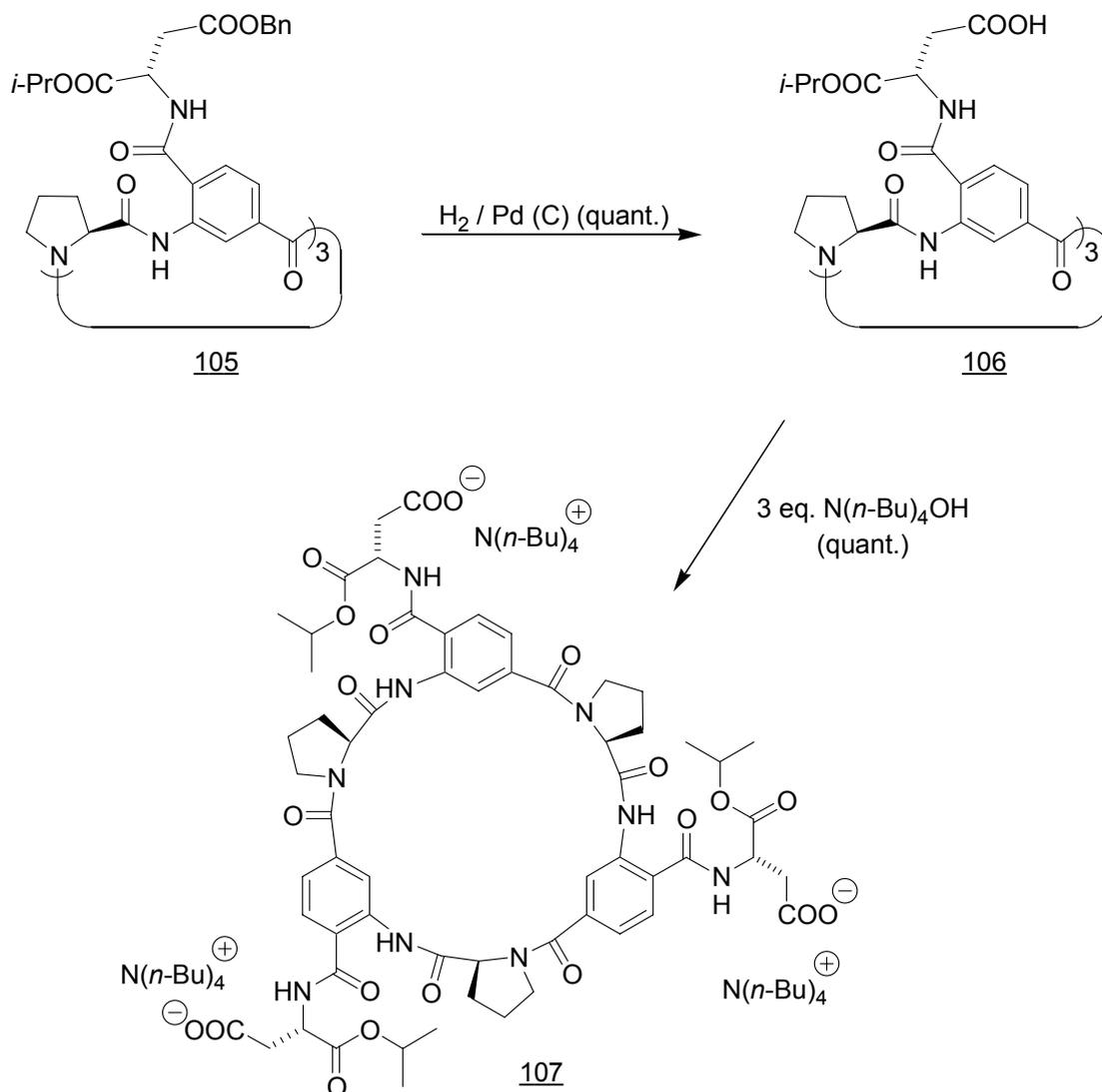
Schema 2.35 Verlängerung des Dipeptids **97** zum linearen Hexapeptid **102**.

Nach den terminalen Entschützungen von **102** konnte ich das Cyclopeptid **105**, das nun bereits die peripheren Asparaginsäuregruppen besitzt, mit der für eine Makrocyclisierung ungewöhnlich guten Ausbeute von 80% darstellen (Schema 2.36).



Schema 2.36 Darstellung des noch geschützten Cyclopeptids **105** mit peripheren Asparaginsäureresten.

Die beiden letzten Syntheseschritte, in denen die drei Carbonsäuregruppen entschützt und nachfolgend deprotoniert werden konnten, verliefen quantitativ (Schema 2.37).



Schema 2.37 Darstellung des Tricarboxylats 107, einem potentiellen Rezeptor mit Aminoterephthalsäure-untereinheiten.

So konnte ich zwar keine neue modulare Rezeptorfamilie aufbauen, trotzdem aber sequentiell ein Tricarboxylat auf der Basis eines Cyclopeptids mit peripheren Aminosäuren in 4-Position der aromatischen Untereinheiten darstellen. Die Gesamtausbeute betrug, ausgehend von der Aminoterephthalsäure, über 17 Syntheseschritte 29%.

Zum Abschluß dieses Kapitels möchte ich zusammenfassen, welche Peptide ich im Rahmen dieser Arbeit erstmals darstellen und, ebenso wie alle Zwischenstufen, vollständig charakterisieren konnte.

Insgesamt vier cyclische Peptide besitzen periphere Aminosäuren mit Carboxylatgruppen, nämlich die modular dargestellten 5-Aminoisophthalsäure-basierten Peptide 34, 5 und 6,

sowie das sequentiell synthetisierte Aminoterephthalsäure-basierte Peptid 107 (Abb. 2.7).

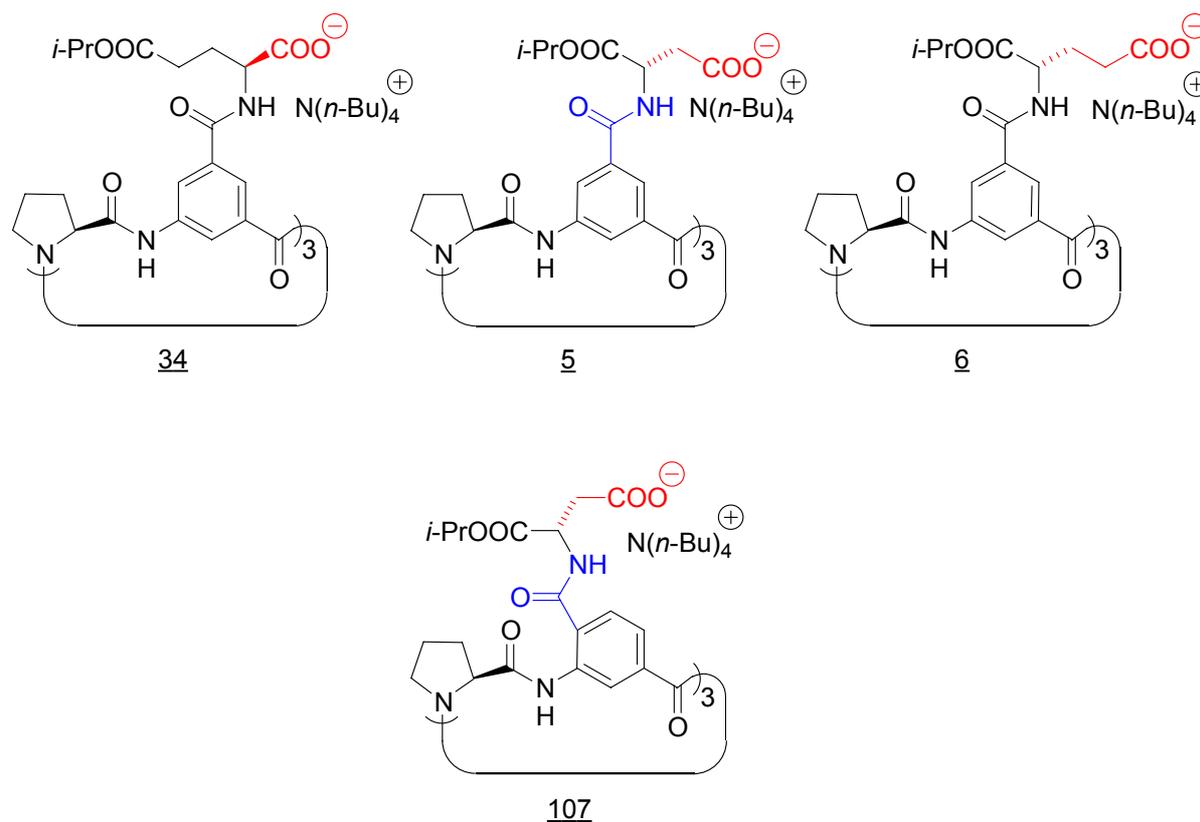


Abb. 2.7 Während dieser Arbeit entwickelte potentielle Rezeptoren mit peripheren Aminosäuren.

Diese Verbindungen unterscheiden sich einerseits im Abstand der gastbindenden Carboxylatgruppen zum cyclischen Grundgerüst (34, 5 und 6), andererseits stellen 5 und 107 Regioisomere dar. Sie differieren nur in der Stellung der Aspartatgruppen an den aromatischen Cyclopeptiduntereinheiten.

Zur Klärung der Frage, ob die Cavität zur Substratbindung notwendig ist, stellte ich die beiden linearen Peptide 52 und 54 erstmals dar (Abb. 2.8).

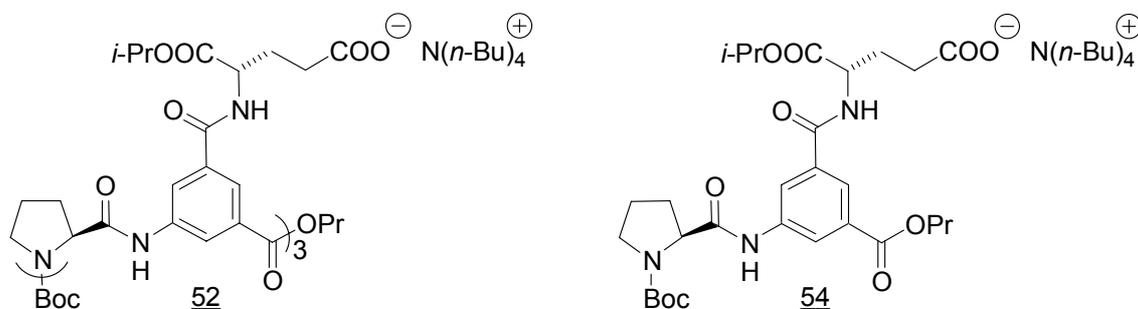


Abb. 2.8 Während dieser Arbeit entwickelte lineare Peptide mit Carboxylatgruppen.

Letztendlich konnte ich zwei Cyclopeptide darstellen, die Carboxylatgruppen direkt an den aromatischen Untereinheiten tragen. Auch 94 und 41 sind Regioisomere (Abb. 2.9).

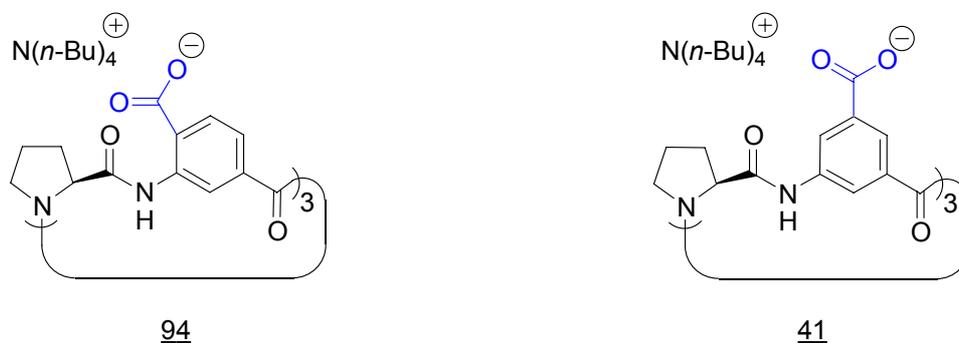


Abb. 2.9 Zwei potentielle Rezeptoren mit Carboxylatgruppen, die sich direkt an den aromatischen Einheiten befinden.

Mit diesen anionischen Peptiden konnte ich nun systematische Untersuchungen zu ihren Rezeptoreigenschaften, insbesondere zur Komplexierung von Kohlenhydraten, durchführen.

2.3 Rezeptoreigenschaften der neuen Peptide

2.3.1 Strukturen und Konformationen

Im Vorfeld dieser Arbeit hatten sich erste Anzeichen gefunden, daß 5 und 6 Rezeptoren für Monosaccharide sein könnten.^[45] Bevor ich aber mit diesen anionischen Peptiden weiterführende Wirt-Gast-Untersuchungen durchführte, interessierte mich die bevorzugte Konformation dieser Verbindungen. Eine sehr gute Möglichkeit, Molekülstrukturen aufzuklären, ist die Röntgenstrukturanalyse, für die man allerdings Einkristalle der zu analysierenden Verbindung benötigt. Kubik konnte so bereits zeigen, daß das „unsubstituierte“ Cyclopeptid 3 im 1:1-Komplex mit *N*-Methylchinuclidiniumiodid eine annähernd C_3 -symmetrische Konformation annimmt, in der die drei Benzenringe einen schalenförmigen Hohlraum aufspannen.^[44] In diesen kann dann ein Kation eingelagert werden, während das Gegenanion an der Unterseite des Cyclopeptids von Amid-NH-Gruppen über Wasserstoffbrücken gebunden wird.

Ich versuchte auf mehrere Arten, Einkristalle, vor allem von Komplexen von 5 und 6 mit verschiedenen Monosacchariden, darzustellen. Dies gelang jedoch nicht. Selbst der Austausch der Tetra-*n*-butylammoniumionen gegen Lithium, Cäsium oder gegen dreifach positiv geladene Europiumionen bei Verbindung 6 führten nicht zu Verbindungen, die als Reinverbindung oder als supramolekularer Komplex mit einem Substrat, kristallisierte.

Daher erschien es mir sinnvoll, mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nach Informationen über die Konformationen der Rezeptoren in Lösung zu suchen.

Die ^1H -NMR-Spektren sowohl des freien unsubstituierten Cyclopeptids 3 als auch des Komplexes mit *N*-Methylchinuclidiniumiodid zeigen, zumindest im zeitlichen Mittel, C_3 -symmetrische Konformationen an.

Für die ^1H -NMR-Spektren der freien Peptide 34, 5, 6 und 41 in DMSO-d_6 gilt das gleiche. Auch bei diesen Verbindungen ist die bevorzugte Konformation in Lösung im zeitlichen Mittel C_3 -symmetrisch. Da bei allen vier Peptiden die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der Protonen des makrocyclischen Grundgerüsts in den ^1H -NMR-Spektren im wesentlichen denen der unsubstituierten Stammverbindung 3 entsprechen, ist es wahrscheinlich, daß die substituierten Cyclopeptide in Lösung eine ähnliche Struktur wie 3 besitzen.

Die peripheren Aminosäuren bzw. Carboxylatgruppen scheinen die Konformation des Cyclopeptidgrundgerüsts also nicht wesentlich zu beeinflussen. Das erscheint plausibel, denn eine Wechselwirkung mit den Aminosäureeinheiten im Ring ist aufgrund der Position der peripheren Substituenten unwahrscheinlich. Einerseits stehen sie in meta-Position zu den beiden anderen aromatischen Substituenten und damit relativ weit von diesen entfernt, andererseits befinden sie sich an der offenen Seite (am wide rim) des schalenförmigen Hohlraums.

Einen entscheidenden Einfluß auf das Komplexierungsverhalten der cyclischen Peptide mit peripheren Aminosäuren 34, 5, 6 und 107 sollte die Konformation der peripheren Asparagin- und Glutaminsäurereste haben, die als Bindungsstellen für die Substrate ausgenutzt werden sollen. So wird durch ihre räumliche Anordnung die Stellung der Carboxylatgruppen zur Cavität bestimmt. Cyclopeptide, die diese funktionellen Gruppen nicht besitzen, wie die Tricarbonsäuren 36 und 38, sind nicht in der Lage, kleine Moleküle, wie z.B. Monosaccharide zu komplexieren.^[45]

Informationen über die Konformation der peripheren Aminosäuregruppen liefern die ^1H -NMR-Spektren der entsprechenden Cyclopeptide. Sie zeigen z.B., daß der letzte Schritt der Synthese des γ -Glutamats 6, nämlich die Deprotonierung der Carbonsäuregruppen, einen signifikanten Tieffeldshift des Signals der NH-Protonen der Glutaminsäureeinheiten um 3,14 ppm im ^1H -NMR-Spektrum verursachte (siehe Abb. 2.10 und Tabelle 2.1). Solch ein Shift ist üblicherweise ein Zeichen dafür ist, daß das betreffende Wasserstoffatom an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist. Im Unterschied hierzu wird die Resonanz der Peptid-NH-Gruppen im Makrocyclus von der Deprotonierung der Carbonsäuregruppen nicht beeinflusst. Eine ähnliche Situation, wenn auch weniger stark ausgeprägt, beobachtete ich auch bei Cyclopeptid 5.

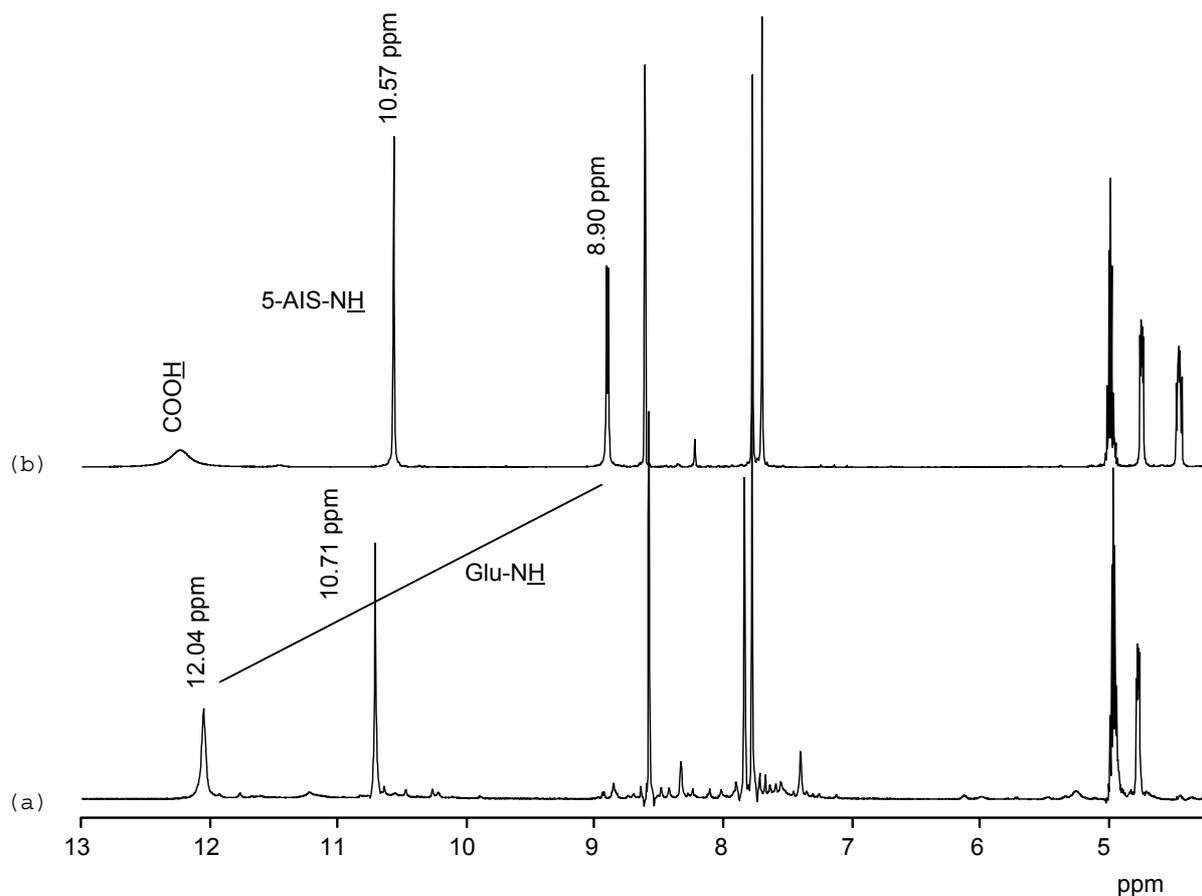


Abb. 2.10 Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren von 6 (a) und seinem protonierten Vorläufer 38 (b). Sichtbar wird die Verschiebung des Signals der Glutaminsäure-NH-Protonen. (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Um aus diesen experimentellen Daten Aussagen über die Konformationen der peripheren Aminosäuren machen zu können, mußte ich zunächst klären, ob die beobachteten Wasserstoffbrücken inter- oder intramolekular gebildet werden. Intermolekulare Wasserstoffbrücken würden auf eine Selbstassoziation der anionischen Cyclopeptide hindeuten. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, kann man z.B. die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung des betroffenen NH-Protons bestimmen.^[62,63] Für das Lösungsmittel DMSO existieren dabei die verlässlichsten Vergleichswerte in der Literatur. So werden Temperaturgradienten von -5 bis -7 ppb/K intermolekularen Wasserstoffbrücken (meist zum Solvens) zugeordnet, während Werte unter -2 ppb/K als Hinweis auf eine Abschirmung der betreffenden Protonen vom Lösungsmittel durch intramolekulare Wasserstoffbrücken angesehen werden. Diesen Effekt erklärt man dadurch, daß bei höheren Temperaturen aus entropischen Gründen intermolekulare Wasserstoffbrücken leichter gebrochen werden als intramolekulare. Deshalb ändert sich die chemische Umgebung intermolekular gebundener Wasserstoffatome stärker, was einen stärkeren Hochfeldshift der entsprechenden Signale mit steigender Temperatur zur Folge hat.

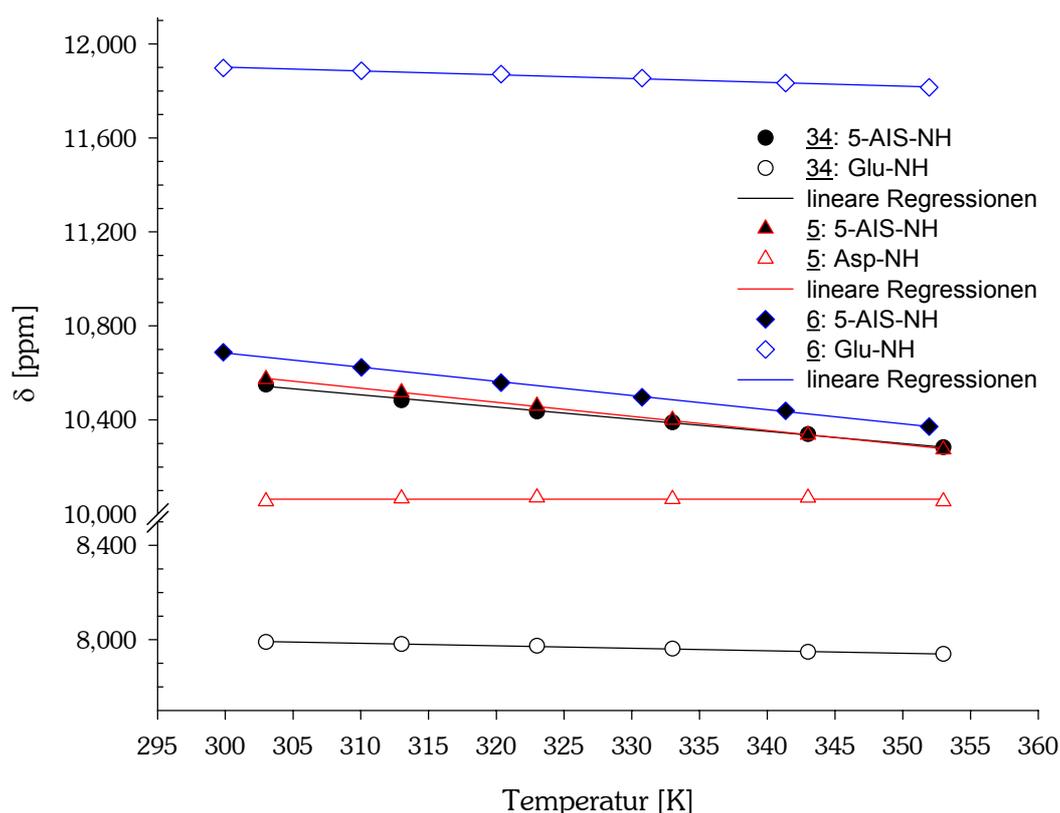
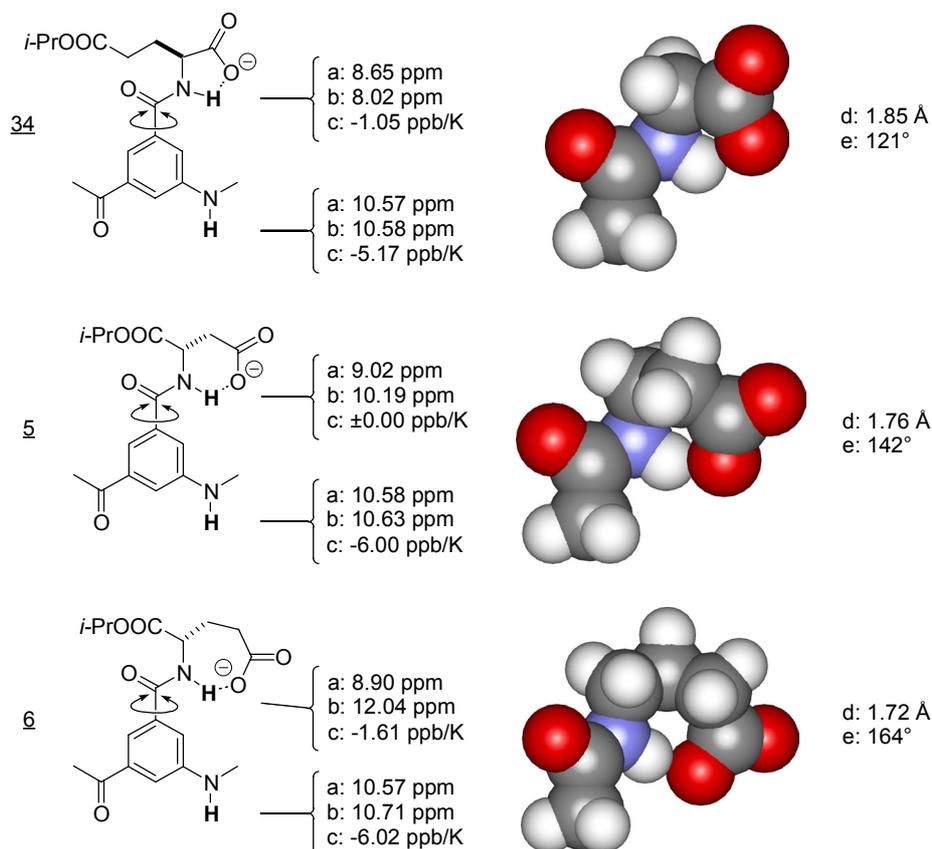


Abb. 2.11 Chemische Verschiebung δ der verschiedenen NH-Gruppen von 5, 6 und 34 in Abhängigkeit von der Temperatur. Ergebnisse der linearen Regressionen siehe Tabelle 2.1.

Für die NH-Gruppen der peripheren Aminosäuren in den Verbindungen 5, 6 und 34 ergaben solche Untersuchungen Werte für die Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen in

Abhängigkeit von der Temperatur zwischen 0,00 und -1,61 ppb/K (Abb. 2.11). Somit befinden sie sich in einer intramolekularen Wasserstoffbrücke, höchstwahrscheinlich mit den jeweils benachbarten Carboxylatgruppen desselben Substituenten als Wasserstoffbrückenakzeptor. Zum Vergleich dienen die Werte für die NH-Gruppen der Amidbindungen innerhalb des Ringes. Sie liegen zwischen -5,17 und -6,02 ppb/k. Diese NH-Gruppen bilden also nur Wasserstoffbrücken zum Solvens, nicht aber zu anderen Gruppen im selben Molekül.

Molecular-Modeling-Studien, insbesondere die Konformerensuche auf semiempirischem Level mit AM1 von Modellverbindungen für die peripheren Aminosäuren, halfen, eine räumliche Vorstellung der gebildeten intramolekularen Wasserstoffbrücken zu gewinnen. Von allen gefundenen Konformeren waren cyclische Strukturen mit intramolekularen H-Brücken durchgehend stabiler als offenkettige Konformere. Der enthalpische Energiegewinn durch die Wasserstoffbrücken überwiegt also den entropischen Nachteil der durch die cyclische Konformation verringerten Anzahl an Freiheitsgraden.



Tab. 2.1 Ergebnisse der Untersuchungen zur Konformationen der peripheren Aminosäuren. Angegeben sind die chemischen Verschiebungen der NH-Protonen vor (a) und nach (b) Deprotonierung der Carboxylgruppen. (c) ist die Temperaturabhängigkeit der NH-Resonanz in DMSO- d_6 , (d) die berechneten Längen und (e) die berechneten Winkel der N-H...O Wasserstoffbrücken.

Interessanterweise traten bei der Modellverbindung für **5**, in der durch die Wasserstoffbrücke

ein Sechsring gebildet wird, zwei sesselförmige und zwei Twist-Konformere auf. Letztere waren, wie die analogen Konformere des Cyclohexans, etwas energiereicher und damit ungünstiger.

In Tabelle 2.1 sind alle relevanten chemischen Verschiebungen vor und nach der Deprotonierung und die Werte der Temperaturgradienten für alle Amid-NH-Protonen der Verbindungen 5, 6 und 34 aufgelistet. Ebenfalls abgebildet sind die berechneten Konformere der Modellverbindungen mit den niedrigsten relativen Energien. Die dabei gefundenen N-H \cdots O-Winkel und H \cdots O-Abstände sind ebenfalls angegeben.

Von Verbindung 34 über 5 zu 6 hin nimmt die Größe der durch die Wasserstoffbrücken geschlossenen Ringstrukturen vom 5- über 6- zum 7-Ring hin zu. Auffällig ist, daß in der gleichen Reihenfolge, also mit steigender Ringgröße, der N-H \cdots O-Winkel und die chemische Verschiebung der NH-Gruppen zunehmen, während die Länge der Wasserstoffbrücken abnimmt. Daraus kann man schließen, daß höchstwahrscheinlich die Stabilität der Wasserstoffbrücken mit zunehmender Ringgröße zunimmt. Merkwürdig erscheint in diesem Zusammenhang auf den ersten Blick, daß die chemische Verschiebung der NH-Gruppe im 5-Ring (Verbindung 34) nach der Deprotonierung und damit nach Bildung der Wasserstoffbrücke nicht, wie bei Bildung der 6- und 7-Ringes, tieffeld-, sondern um 0,63 ppm hochfeldverschoben wird, obwohl man auch hier eine Entschirmung des NH-Protons und damit einen Tieffeldshift erwarten würde. Der Grund hierfür kann möglicherweise in der magnetischen Anisotropie in der Umgebung der Carboxylatgruppe liegen, die sich bei dem relativ kleinen Winkel von 121° anders auswirkt als bei den größeren Winkeln der Wasserstoffbrücken im 6- und 7-Ring. Kessler konnte für vergleichbare Systeme finden, daß die „chemische Verschiebung als sehr grobes Maß für die Stärke einer internen H-Brücke angesehen werden kann. Anisotropieeffekte müssen dabei jedoch vernachlässigt werden.“^[63]

Analoge Untersuchungen mit Cyclopeptid 107 waren leider aufgrund relativ breiter Signale der NH-Protonen im ¹H-NMR-Spektrum nicht möglich. Die chemische Verschiebung der Amidprotonen der Asparaginsäureseitengruppen beträgt hier vor der Deprotonierung 9,27 ppm. Der Shift auf 11,46 ppm nach der Deprotonierung läßt es aber sehr wahrscheinlich erscheinen, daß hier ähnliche intramolekulare Wasserstoffbrücken in den Seitenaminosäuren existieren wie in dem isomeren Cyclopeptid 5.

In Bezug auf die geometrischen Daten ergaben meine Berechnungen tendenziell ähnliche Werte, wie sie von Ramek für ω -Hydroxysäuren und ω -Aminosäuren beschrieben wurden, die ebenfalls durch Wasserstoffbrücken geschlossene 5- bis 8-Ringe bilden.^[64,65]

Es ist sehr wahrscheinlich, daß durch die intramolekularen Wasserstoffbrücken in den Tricarboxylaten 5, 6 und 34 die Beweglichkeit der peripheren Aminosäuren (zumindest in Lösungsmitteln mit ähnlicher oder geringerer Polarität wie DMSO) erheblich eingeschränkt

wird. Somit wird die Orientierung der Carboxylatgruppen zu den schalenförmigen Hohlräumen, die die Makrocyclen der Cyclopeptide aufspannen, im wesentlichen nur noch durch eine Rotation um die Bindungen der peripheren Aminosäuren zu den Aromaten beeinflusst (in Tabelle 2.1 mit kreisförmigen Pfeilen gekennzeichnet).

Eine konformative Fixierung der peripheren Aminosäuren durch intramolekulare Wasserstoffbrücken kann bezüglich der Rezeptoreigenschaften Vor- und Nachteile haben. Einerseits ist ein flexibler Rezeptor in der Lage, sich an ein Substrat anzupassen und so die Komplexierung zu ermöglichen. Andererseits kann eine große Flexibilität die Selektivität bei der Komplexierung ähnlicher Substrate verringern. Beide Effekte müssen bei meinen Rezeptoren berücksichtigt werden.

2.3.2 Bestimmung von Komplexstöchiometrien und Assoziationskonstanten

Die NMR-Spektroskopie hat sich in der Supramolekularen Chemie als Standardmethode zur Untersuchung von Komplexstöchiometrien, -bindungskonstanten und -strukturen etabliert. Hierbei wird ausgenutzt, daß eine Komplexbildung meist Veränderungen der chemischen Umgebung einzelner Protonen von Rezeptor und/oder Substrat verursacht, was sich in einer Verschiebung der Signallage in den NMR-Spektren äußert. Daher ist diese Methode nahezu universell verwendbar, um Komplexbildungen zu untersuchen. Andere spektroskopische Methoden sind hierzu zwar auch geeignet, sie benötigen jedoch meist spezielle Moleküleigenschaften, wie z.B. die Anwesenheit einer fluoreszierenden funktionellen Gruppe, damit die Komplexbildung nachgewiesen werden kann. Das schränkt ihre Anwendbarkeit ein.

Der erste Schritt meiner Untersuchungen zu den Rezeptoreigenschaften der von mir dargestellten Cyclopeptide bestand meist darin, das ^1H -NMR-Spektrum einer äquimolaren Mischung aus potentiell Rezeptor und Substrat mit den Spektren der Einzelkomponenten zu vergleichen. Fand eine intermolekulare Wechselwirkung statt, konnte ich Shifts in den chemischen Verschiebungen der Signale von Rezeptor und Substrat beobachten. Alle von mir untersuchten Komplexe zeigten im Vergleich zur NMR-Zeitskala schnelle Komplexierungsgleichgewichte, so daß in den Spektren der Mischungen eine zwischen gebundenen und freien Spezies gemittelte Signallage zu beobachten war. Der Wert für die Änderung der chemischen Verschiebung während der Komplexierung $\Delta\delta$ entspricht dabei der Differenz zwischen den chemischen Verschiebungen eines Signals der Mischung (δ_{obs}) und der freien, ungebundenen Spezies (δ_0). Separate Signalsätze für die im Gleichgewicht vorliegenden freien und gebundenen Spezies beobachtet man nur, wenn die Komplexierungsreaktion (Gl. 1) im Verhältnis zur NMR-Zeitskala langsam ist.



Der zweite Schritt zur Charakterisierung der gebildeten Komplexe besteht in der Bestimmung ihrer Stöchiometrie, ohne deren Kenntnis eine Bestimmung der Komplexstabilitätskonstante nicht möglich ist. Hierzu kann die Methode von Jobl^[66,67] verwendet werden, die von Blanda et al. auf die NMR-Spektroskopie übertragen wurde.^[68] Bei dieser sogenannten „Methode der kontinuierlichen Variationen“ wird die Summe der Konzentrationen von Rezeptor und Substrat in einer Serie von Proben konstant gehalten, das Verhältnis der beiden Konzentrationen aber variiert. Typischerweise stellt man Lösungen her, die die beiden Verbindungen im Molenbruchbereich X von 0,0 bis 0,9 in Schritten von 0,1 enthält und nimmt ihre NMR-Spektren auf. Die Konzentrationen müssen so gewählt werden, daß die beiden Verbindungen keine Selbstassoziation aufweisen. Ob dies im gewünschten Konzentrationsbereich tatsächlich der Fall ist, kann zuvor durch die Vermessung von

Verdünnungsreihen der Einzelverbindungen untersucht werden.

Bei der Methode von Job ist die Komplexkonzentration dann maximal, wenn Rezeptor und Substrat in einem Verhältnis vorliegen, das der Stöchiometrie des aus ihnen gebildeten Komplexes entspricht. Die Komplexkonzentration ist allerdings nicht direkt meßbar. Blanda konnte jedoch zeigen, daß die Komplexkonzentration im Falle von schnellen Gleichgewichten dem Wert $\Delta\delta$ und, bei konstanter Gesamtkonzentration von Rezeptor und Substrat, zusätzlich dem Molenbruch der beobachteten Komponente proportional ist. Daher erhält man aus der Auftragung des Produkts $\Delta\delta \cdot X$ gegen einen der beiden Molenbrüche eine Kurve, die ein Maximum bei dem Molenbruch besitzt, der mit der Komplexstöchiometrie korreliert.

Im dritten Schritt erfolgt erst die Bestimmung der Stabilitätskonstante mit Hilfe einer Wirt-Gast-NMR-Titration. Dabei titriert man zu konstanten Mengen der Verbindung, deren Signalshift verfolgt wird, steigende Mengen der anderen Komponente in einem geeigneten Lösungsmittel. Der durch die Komplexierung induzierte Signalshift wird im Verlauf der Titration mit steigender Konzentration der zutitrierten Komponente größer. Trägt man die beobachtete chemische Verschiebung in Abhängigkeit von dem Stoffmengenverhältnis zwischen Rezeptor und Substrat auf, resultiert eine Sättigungskurve. Sie nähert sich asymptotisch einem Grenzwert, der der chemischen Verschiebung für das beobachtete Proton im Komplex entspricht.

Die Konzentrationen und Stoffmengenverhältnisse, bei denen die Messungen durchgeführt werden, sollten idealerweise so gewählt werden, daß bei der Titration idealerweise 75% Sättigung erreicht wird.^[69]

Die beobachtete chemische Verschiebung δ_{obs} hängt in gewichteten Anteilen von den Werten für das freie Substrat δ_o und für das Substrat im Komplex δ_K ab. Für einen 1:1-Komplex ergibt sich die nachfolgende Gleichung (Gl.2).

$$\delta_{obs} = \frac{[S]_0 - [K]}{[S]_0} \times \delta_o + \frac{[K]}{[S]_0} \delta_K \quad \begin{array}{l} [S]_0 = \text{Ausgangskonzentration Substrat} \\ [K] = \text{Komplexkonzentration} \end{array} \quad \text{Gl. 2}$$

Mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes von Gleichung 1 für den Fall einer 1:1-Stöchiometrie (Gl. 3) und den entsprechenden Massenbilanzen kann man alle unbekanntes Konzentrationen so durch bekannte Ausdrücke ersetzen, daß nur noch die Assoziationskonstante K_a und δ_K als unbekannte Größen in einer Funktion übrigbleiben.

$$K_a = \frac{[K]}{[R][S]} \quad \begin{array}{l} [R] = \text{Rezeptorkonzentration} \\ [S] = \text{Substratkonzentration} \\ [K] = \text{Komplexkonzentration} \end{array} \quad \text{Gl. 3}$$

Dies läßt die Auswertung der Meßwerte mit Hilfe einer nicht-linearen Regression zu, in deren

Verlauf die Funktion durch iterative Änderung der beiden Unbekannten an die Meßwerte angepaßt wird.^[67,69-71] So erhält man Werte für δ_k , also dem Grenzwert, gegen den die Regressionskurve läuft, und für die Assoziationskonstante, die letztendlich mit der Krümmung der Sättigungskurve korreliert.

Diese Verfahren zur Untersuchung der Eigenschaften supramolekularer Komplexe sind analog auch mit jeder anderen Meßmethode durchführbar, bei der sich eine beobachtbare physikalische Größe durch die Komplexierung verändert. So können zur Bestimmung von Stabilitätskonstanten z.B. auch die Fluoreszenz-, UV-VIS- und CD-Spektroskopie verwendet werden.

2.3.3 Kohlenhydrate als Substrate

2.3.3.1 Besonderheiten der Kohlenhydraterkennung

In der Natur spielen Kohlenhydrate nicht nur eine wichtige Rolle als Nährstoffe, sondern sie sind ganz entscheidend an den sehr komplexen Vorgängen beteiligt, die es Zellen ermöglichen, andere Zellen zu erkennen und dabei körpereigene von körperfremden zu unterscheiden. Kohlenhydrate besitzen nämlich ein großes Potential als Informationsspeicher. Für ein Oligosaccharid beispielsweise sind durch Variation der Substitutionsorte und Verwendung verschiedener isomerer Monosaccharideinheiten viel mehr Strukturisomere möglich als für ein Oligopeptid mit der gleichen Anzahl von Aminosäurebausteinen.

Oligosaccharide sind Bestandteile von Glycoproteinen und Glycolipiden, die an vielen Zelloberflächen die interzelluläre Erkennung durch Rezeptorproteine vermitteln.^[72-76] Diese Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen spielen beispielsweise bei Infektionen, Entzündungsvorgängen und der Zellhaftung eine zentrale Rolle. Aber auch für ihre Funktion als Energielieferant ist die molekulare Erkennung von Sacchariden entscheidend. Sie stellt den ersten Schritt in der Arbeitsweise von Enzymen dar, die Kohlenhydrate für den Organismus als Nährstoffe erschließen.

Eine selektive molekulare Erkennung von Kohlenhydraten ist schwierig, da diese Verbindungen weder geladene funktionelle Gruppen noch besonders basische oder saure Eigenschaften besitzen, die spezifische Wechselwirkungen mit einem Rezeptor erleichtern würden. Insgesamt können sie deshalb nur relativ schwache intermolekulare Wechselwirkungen eingehen.^[77,78] Ihre Hydroxygruppen besitzen eine komplexe, divergente Anordnung im Raum. Ein Monosaccharid unterscheidet sich nur durch deren exakte Anordnung und zusätzliche kleine unpolare Flächen seiner CH-Gruppen von z.B. einem Cluster aus Wassermolekülen. In der Natur findet man dennoch Enzyme und Rezeptoren mit großen Selektivitäten für Kohlenhydrate (siehe Einleitung, Abb. 1.5). Deren Funktion nachzuahmen ist eine große Herausforderung für die Supramolekulare Chemie.

In der letzten Zeit konnten in diesem Zusammenhang einige leistungsfähige Kohlenhydratrezeptoren entwickelt werden. Eine Übersicht über solche Strukturen und ihre Fähigkeiten ist vor kurzem von Davis et al. veröffentlicht worden.^[32] Es handelt sich dabei meist um makrocyclische Rezeptoren, die konvergent angeordnete funktionelle Gruppen zur Kohlenhydratbindung besitzen. Ein frühes Beispiel hierfür ist das bereits in der Einleitung erwähnte Resorcinaren **1**, das in bestimmter Hinsicht sogar Eigenschaften eines künstlichen Enzyms zeigte.

Das tricyclische Amid **108** (Abb. 2.12) hat die Arbeitsgruppe um Davis entwickelt. Es verfolgt einen biomimetischen Ansatz, denn oberhalb und unterhalb des Hohlraums sind

aromatische Gruppen für CH- π -Wechselwirkungen angebracht, während in der Ebene um den Hohlraum Amidgruppen als Wasserstoffbrückenbindungspartner zur Verfügung stehen. 108 ist in der Lage, Octyl- β -D-glucopyranosid (109) in dem kompetitiven Lösungsmittelgemisch Chloroform/Methanol (92:8) mit einer Stabilitätskonstante $K_a \approx 1000 \text{ M}^{-1}$ zu binden. Auch die Selektivität von etwa 50 gegenüber dem entsprechenden α -Anomer ist bemerkenswert.^[79] Sie läßt sich anhand der Rezeptorstruktur erklären: bei dem β -D-Glucosid stehen alle Substituenten äquatorial und damit in der Ebene, die durch den pyranosiden Ring aufgespannt wird und in der im Komplex auch die Amidbindungen des Rezeptors stehen. Beim entsprechenden α -Anomer stört der lange Octylrest, da er in seiner axialen Stellung eine sterische Hinderung im Komplex darstellt.

Dieses Grundgerüst konnte auch zur Extraktion von Monosacchariden aus Chloroformlösungen verwendet^[80] und durch Vergrößerung des Hohlraums zu einem Disaccharidrezeptor weiterentwickelt werden.^[81]

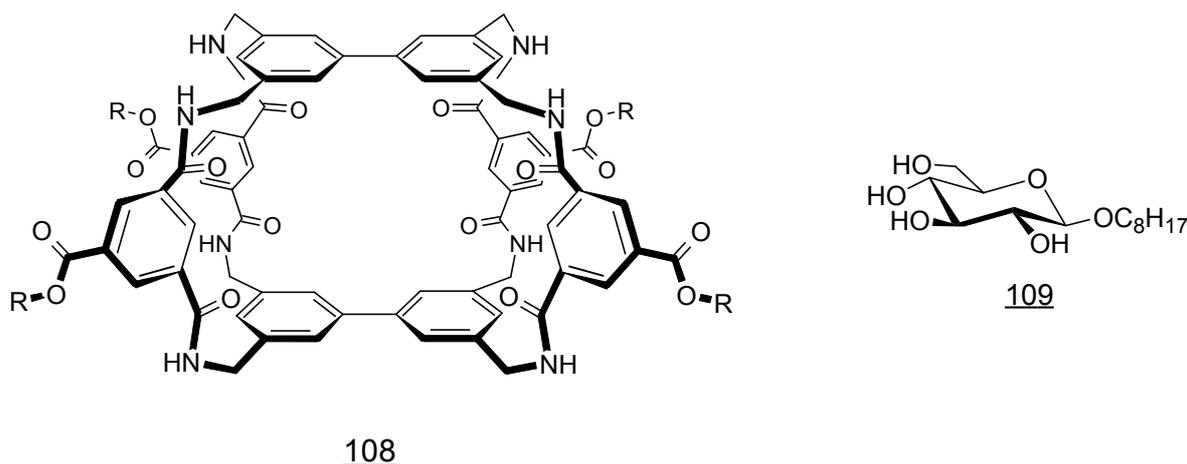


Abb. 2.12 Dieses tricyclische Amid von Davis ist ein Kohlenhydratrezeptor (z.B. für das Octylglucosid 109) mit ausgeprägter Selektivität.

Die Natur zeigt, daß anionische Gruppen sehr gut zur Fixierung von Hydroxygruppen geeignet sind (Abb. 1.5). Auch in künstlichen Kohlenhydratrezeptoren nutzt man diese Wechselwirkung zur Bindung von Kohlenhydraten aus, wie die Beispiele einiger anionischer Kohlenhydratrezeptoren zeigen.^[51-54] Beispielsweise besitzt der Komplex aus dem cyclischen Trisphosphat 110 und dem Glucosid 109 eine Stabilitätskonstante $K_a = 3500 \text{ M}^{-1}$ in Acetonitril (Abb. 2.13).

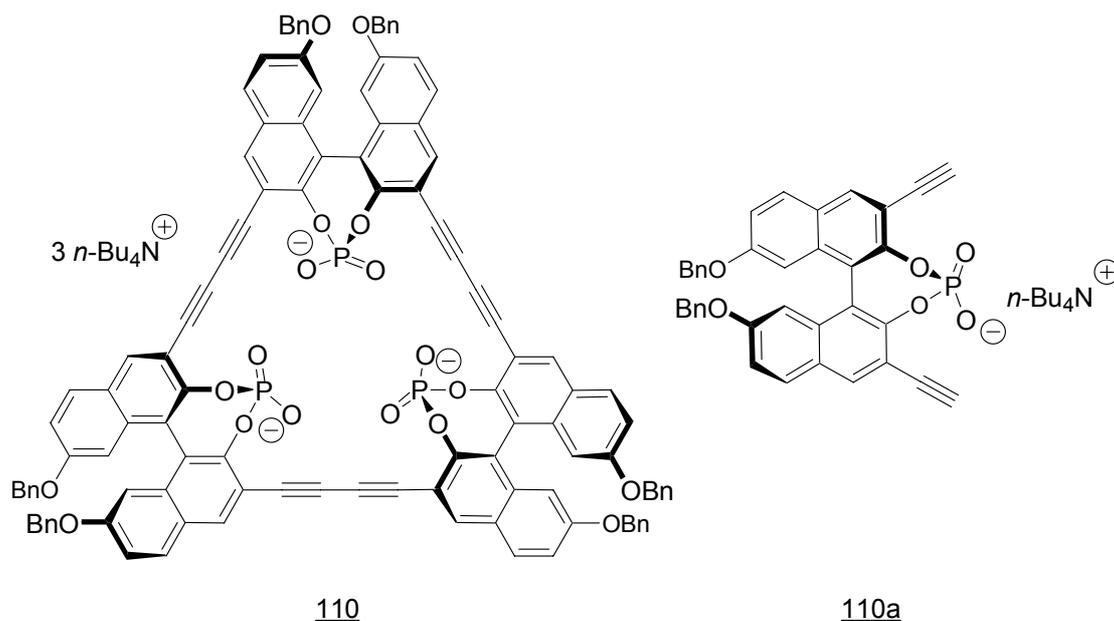


Abb. 2.13 Das von Diederichs entwickelte Trisphosphat 110 bindet ebenfalls das Glucosid 109.

Interessanterweise konnte Diederich zeigen, daß das nicht-cyclische Analogon 110a dasselbe Substrat wesentlich schlechter bindet, nämlich mit einer Assoziationskonstante von nur $K_a = 170 \text{ M}^{-1}$ im gleichen Lösungsmittel. Das gleichzeitige Zusammenwirken von drei anionischen Gruppen, die gemeinsam von einem makrocyclischen Grundgerüst aus ein Substrat binden können, wirkt sich also positiv auf die Affinität dieses Rezeptors aus.^[82]

Auch wenn, wie hier gezeigt, schon einige Schritte auf dem Weg zu biomimetischen Kohlenhydratrezeptoren gegangen worden sind, ist die selektive intermolekulare Komplexierung von Zuckern in wäßrigen Lösungsmitteln bisher erst ansatzweise gelungen.^[79, 83-87]

Bei der Entwicklung von künstlichen Kohlenhydratrezeptoren ist die Wahl der substratbindenden funktionellen Gruppe ein entscheidender Faktor. Grundlegende Arbeiten von Schneider et al. zeigen, wie unterschiedlich einfach geladene anionischen Gruppen mit Hydroxygruppen wechselwirken können. Er fand sowohl für das 1,2-*trans*-Cyclohexandiol als auch für verschiedene Monosaccharidderivate, daß die Affinität von Monoanionen zu diesen Hydroxyverbindungen in der Reihenfolge Iodid < Benzensulfonat < Bromid < Diphenylphosphat < Chlorid < Benzoat zunimmt. Der Grund für die Reihenfolge der organischen Ionen (Benzensulfonat, Diphenylphosphat und Benzoat) liegt wohl in der abnehmenden Acidität der entsprechenden konjugierten Säuren dieser Anionen und der damit verbundenen Tendenz, durch eine Komplexierung von OH-Gruppen stabilisiert zu werden.^[53] Diese These wird dadurch unterstrichen, daß Wilcox et al. die gleiche Reihenfolge bei der Wechselwirkung dieser Anionen mit einem Harnstoffderivat fand.^[88] Es überrascht nicht, daß die Natur das aus dieser Auswahl beste Anion, nämlich das Carboxylat, zur Kohlenhydraterkennung nutzt.

Im Vergleich zu Monohydroxyderivaten werden 1,2-Dihydroxyverbindungen wie das 1,2-*trans*-Cyclohexandiol von Carboxylaten etwa zwanzigfach besser gebunden. Die Ausbildung von kooperativen Wasserstoffbrücken zwischen Rezeptor und Substrat hat also synergetische Wirkung und vervielfacht die Assoziationskonstante.^[89] Dieser Effekt wird ebenfalls bei der Komplexierung von Polyolen wie den Kohlenhydraten genutzt.

Die von mir synthetisierten Cyclopeptide mit peripheren Aminosäuresubstituenten 5, 6, 34 und 107 enthalten alle Strukturelemente, die auch die Natur zur Kohlenhydraterkennung nutzt: sie bestehen aus Aminosäurebausteinen und besitzen aufgrund ihrer makrocyclischen Struktur einen Hohlraum, der gut zur Aufnahme eines Monosaccharids geeignet sein sollte. Außerdem besitzen sie aromatische Bausteine, die zur Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen zu den CH-Gruppen des Substrats fähig sein sollten. Zur Bindung der Hydroxygruppen des Substrats stellen sie jeweils drei Carboxylatgruppen zur Verfügung, die um den Hohlraum angeordnet sind.

Verglichen mit anderen künstlichen Kohlenhydratrezeptoren sind sie den von Diederich, Schneider und Hamilton beschriebenen Phosphonat- bzw. Phosphaten wohl am nächsten verwandt.^[51,52,54]

2.3.3.2 Eigene Untersuchungen^[90,91]

Ist das Cyclopeptid **6** ein Rezeptor für Monosaccharide?

Um grundsätzlich zu klären, ob die dargestellten Tricarboxylate mit peripheren Aminosäureresten mit Monosacchariden wechselwirken, nahm ich ¹H-NMR-Spektren von **6**, von *n*-Octyl- α -D-glucopyranosid **111** sowie einer äquimolaren Mischung dieser beiden Verbindungen in CDCl₃ auf. Dieses Lösungsmittel ermöglicht es, auch relativ schwach wasserstoffbrückengebundene Komplexe zu untersuchen, da es aprotisch und daher nicht-kompetitiv ist.^[51]

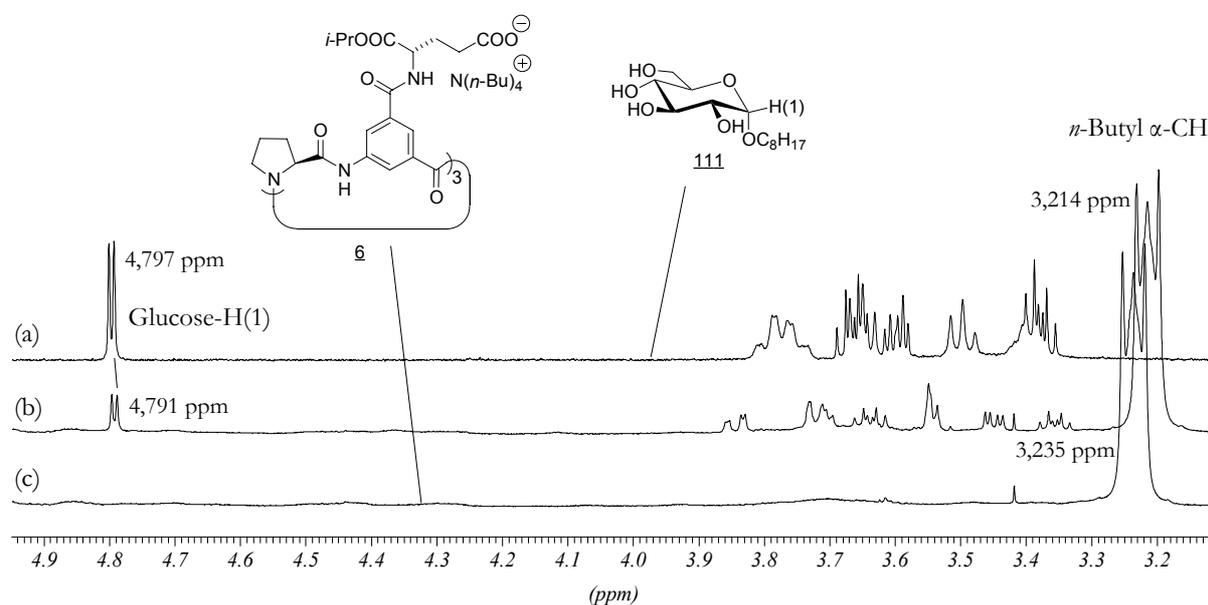


Abb. 2.14 Stack-Plot der ¹H-NMR-Spektren von **111** (a), **6** (c) und einer äquimolaren Mischung aus beiden (b). Lösungsmittel: CDCl₃, interner Standard: TMS, alle Konzentrationen: 1 mmol/l.

Abb. 2.14 zeigt, daß die Anwesenheit des Cyclopeptids einen deutlichen Einfluß auf die Signallagen und -formen des Monosaccharids besitzt. Dies kann als Hinweise auf eine intermolekulare Wechselwirkung gewertet werden. Das Signal des anomeren Protons H(1) von **111**, das relativ isoliert im Spektrum bei ca. 4,79 ppm sichtbar ist, shiftet aufgrund der Wechselwirkungen z.B. um einen geringen Betrag zu höheren Feldstärken. Solche Hochfeldshifts findet man häufig, wenn ein Substrat in die Cavität eines Wirtmoleküls mit aromatischen Substituenten eingelagert wird und dadurch in die Nähe dieser π -Systeme gelangt.^[92,93] Der beobachtete Hochfeldshift des Gastprotonensignals deutet also eine Einlagerung des Monosaccharids in die Cavität von **6** an.

Das Spektrum des Cyclopeptids ((c) in Abb. 2.14) zeigt, ausgenommen der Signale der Tetra-

n-butylammoniumionen, sehr breite Signale. Die Ursache könnten einerseits langsame Konformerengleichgewichte, andererseits aber auch eine Selbstassoziation sein. Dies ändert sich auch nach der Substratzugabe nicht. Die Substratzugabe verursacht lediglich einen Hochfeldshift der Tetra-*n*-butylammoniumsignale, der für die α -CH₂-Gruppen am größten ist und mit abnehmender Nähe zum Stickstoffatom kleiner wird. Einen solchen Shift würde man erwarten, wenn in Chloroform enge Ionenpaare aus Kationen und Carboxylatgruppen durch die Kohlenhydratkomplexierung getrennt werden. Im ungestörten, engen Ionenpaar ist die Bildung von N⁺-CH...-OOC -Wasserstoffbrücken möglich,^[94] wodurch die CH-Gruppen entschirmt werden. Die Verdrängung der Ionen von den Carboxylatgruppen durch die Monosaccharidmoleküle könnte dann den beobachteten Hochfeldshift der Kationensignale erklären.

Auch dieser Effekt spricht also für eine Komplexierung des Monosaccharids durch Rezeptor 6. Da in Chloroform aber offensichtlich Substrat und Gegenionen um die Substratbindungsstellen des Rezeptors konkurrieren, verkompliziert sich das Komplexierungsgleichgewicht. Aus diesem Grund versuchte ich, durch eine Erhöhung der Lösungsmittelpolarität die Wechselwirkungen der Carboxylate mit den Kationen zu unterdrücken, möglichst ohne dabei die Komplexierung des Monosaccharids durch 6 zu verhindern.

Ich fand in dem Gemisch Chloroform/Methanol (96:4) ein Lösungsmittel, das beide Anforderungen erfüllt. In Abb. 2.15 ist der Stack-Plot der NMR-Spektren abgebildet, die ansonsten unter den gleichen Bedingungen wie die in Abb. 2.14 gezeigten aufgenommen wurden. Einziger Unterschied ist, daß das Methylglucosid Methyl- α -D-glucoopyranosid (112) anstelle des Octylderivats (111) als Substrat verwendet wurde. Dieses Glycosid ist einem unsubstituierten Monosaccharid strukturell ähnlicher und darum für solche Untersuchungen sehr viel besser geeignet. In reinem Chloroform ist es aber unlöslich. Außerdem sind die Signale des Cyclopeptids in dem Chloroform-Methanol-Gemisch wesentlich schärfer, was ebenfalls ein Vorteil für die Wirt-Gast-Untersuchungen ist.

Abb. 2.15 zeigt, daß nach Zugabe des Monosaccharids zum Cyclopeptid 6 keine Shifts bei den Signalen der Tetra-*n*-butylammoniumionen zu beobachten sind. Dies zeigt, daß in dem gewählten Lösungsmittelgemisch keine engen Ionenpaare auftreten. Dagegen sind immer noch, wie in Chloroform, Shifts der Saccharidsignale zu beobachten. Das anomere Proton shiftet sogar deutlicher zu höheren Feldstärken als bei der Komplexierung in Chloroform. Mit der Methylgruppe ist außerdem eine weitere im Spektrum aufgrund ihrer Signallage und -Form gut zu beobachtende Gruppe im Substrat vorhanden. Ihre chemische Umgebung ändert sich ebenfalls deutlich während der Komplexierung, was der Shift ihres Signals um ca. 0,02 ppm zu höheren Feldstärken anzeigt. Die Größenordnung der Shifts der Substratsignale ist zwar vergleichsweise klein, steht aber im Einklang mit Werten, die bei der Komplexierung von Monosacchariden durch andere Rezeptoren ebenfalls gefunden wurden.^[53]

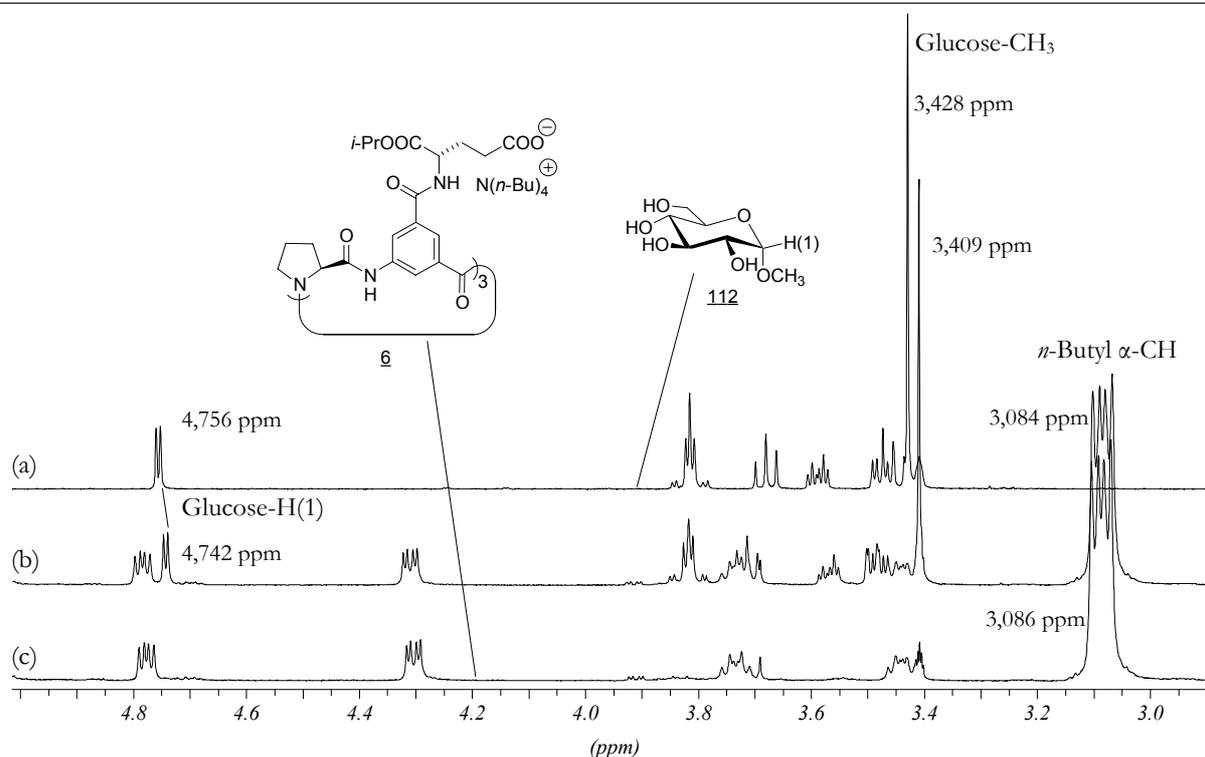


Abb. 2.15 Stack-Plot der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **112** (a), **6** (c) und einer äquimolaren Mischung aus beiden (b). Lösungsmittel: $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (96:4), alle Konzentrationen: 1 mmol/l.

Diese Untersuchungen zeigen also, daß Rezeptor **6** tatsächlich das verwendete Monosaccharid bindet. Die Komplexbildung findet sogar in einem Lösungsmittel statt, in dem Methanol, ein starker Konkurrent um die Substratbindungsstellen, bereits in einem 10.000-fachen Überschuß bezogen auf das Substrat vorliegt.

Für dieses Wirt-Gast-System bestimmte ich nun die Komplexstöchiometrie nach der Methode von Job. Es ergab sich, daß der Komplex wie erwartet eine 1:1-Stöchiometrie besitzt (Abb. 2.16).

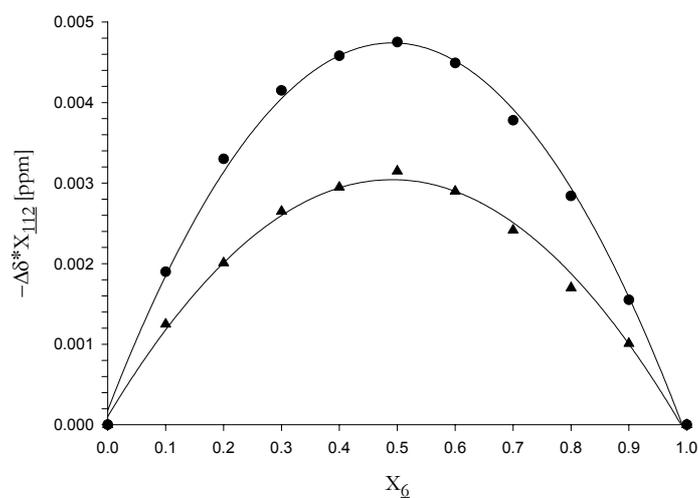


Abb. 2.16 Job-Plot des Komplexes aus **6** und **112** in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (96:4). Dreiecke: $\text{CH}(1)$ -, Kreise: O-CH_3 -Gruppe. Beide Maxima liegen bei $X_6 = 0,49$.

Um eine Selbstassoziation von Rezeptor oder Substrat, die auf das Gleichgewicht der Komplexierung einen Einfluß hätten und eine quantitative Auswertung erschweren würden, auszuschließen, nahm ich $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Verdünnungsreihen von 5, 6 und 107 sowie von 112, 114 und 115 (siehe Abb. 2.20) als repräsentative Vertreter der verwendeten Monosaccharide auf. In keinen Fall konnte ich konzentrationsabhängige Veränderungen der Spektren im für die quantitativen Untersuchungen relevanten Konzentrationsbereich (0,2 - 2 mM für die Rezeptoren und 0,01 - 1 mM für die Substrate) bei Verwendung von Chloroform/Methanol (96:4) als Lösungsmittel beobachten. Eine Selbstassoziation findet also nicht statt.

Daher konnte ich nun mit Hilfe einer Wirt-Gast-Titration die Stabilitätskonstante des Komplexes aus 6 und 112 bestimmen. Die beobachteten Meßwerte (Punkte) und das Ergebnis der nichtlinearen Regression (Kurve) sind in Abb. 2.17 dargestellt. Die Stabilitätskonstante ergab sich zu $K_a = 550 \text{ M}^{-1}$, bei einem Wert für $\Delta\delta_{\text{max}} = -0,05 \text{ ppm}$ für den Shift der chemischen Verschiebung der Methylgruppe des Substrats.

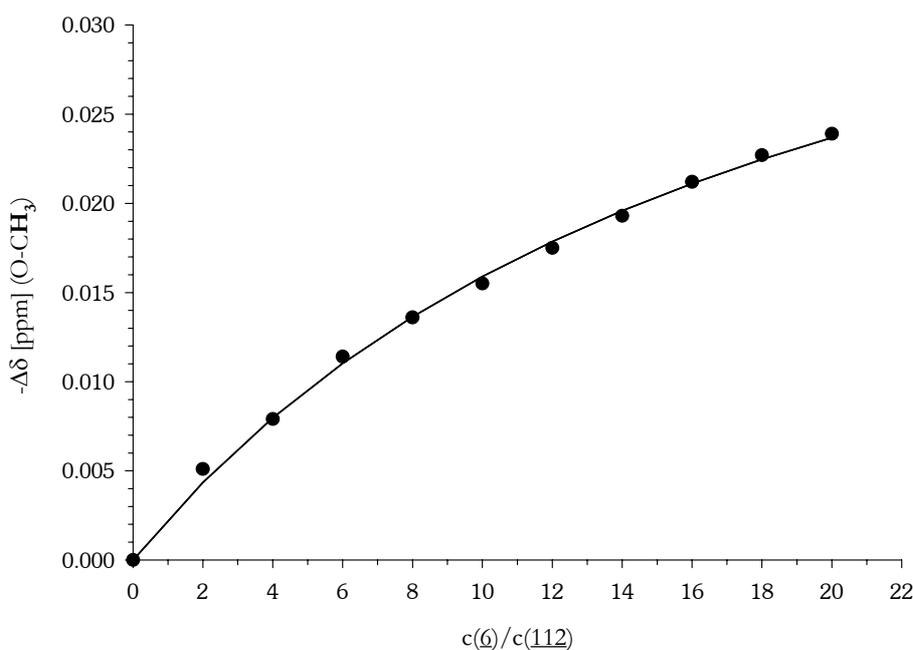


Abb. 2.17 Ergebnis der Wirt-Gast-Titration von 6 mit 112 in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (96:4). Interner Standard: TMS. Punkte: Meßwerte, Linie: Ergebnis der nicht-linearen Regression.

Die Größe der Bindungskonstanten und vor allem die 1:1-Komplexstöchiometrie lassen darauf schließen, daß das Substrat von allen drei Carboxylatgruppen des Rezeptors gleichzeitig gebunden und in die Cavität von 6 eingelagert wird. Eine räumliche Vorstellung von diesem Komplex konnte ich durch Molecular-Modeling-Rechnungen gewinnen. Die erhaltene Komplexstruktur, die mit allen experimentellen Daten in Einklang steht, ist in Abb. 2.3 dargestellt (Kapitel 2.1).

Um die Frage zu klären, ob die Cavität des Rezeptors wirklich zur Bindung eines Monosaccharid notwendig ist, führte ich nun analoge Wirt-Gast-Untersuchungen mit den beiden linearen Spezies 52 und 54 (Abb. 2.18) durch.

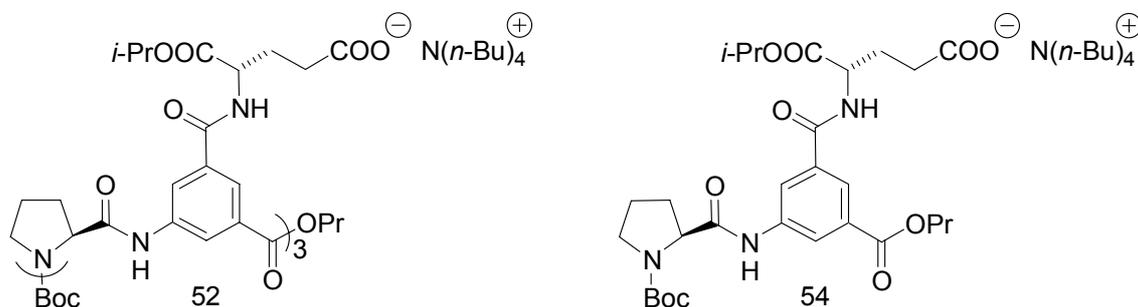


Abb. 2.18 Die linearen Peptide 52 und 54 sollen die Frage klären, ob die dargestellten Peptide auch ohne präorganisierte Cavität Substrate binden können.

Die Wechselwirkung zwischen dem linearen Dipeptid 54 und dem Methyl- α -D-glucopyranosid (112) ist so schwach ($K < 10 \text{ M}^{-1}$), daß man sie nicht mit einer NMR-Wirt-Gast-Titration quantifizieren kann. Das Signal der OCH_3 -Gruppe des Monosaccharids shiftet während der Titration nahezu linear um den verhältnismäßig kleinen Betrag von 0,01 ppm nach der Zugabe von 20 Äquivalenten des Carboxylats. Dies läßt auf unspezifische Wechselwirkungen oder einen bloßen Effekt der Erhöhung der Lösungsmittelpolarität während der Titration schließen.

Unspezifisch ist auch die Wechselwirkung des linearen Hexapeptids 52 mit dem Methylglucosid 112. Obwohl deutlich höhere Shifts der Substratsignale im ^1H -NMR auftreten, zeigt der Job-Plot (Abb. 2.19), daß das gebildete Aggregat eine Stöchiometrie zwischen 3:4 und 2:3 (52:112) besitzt. Eine Auswertung der NMR-Titration, die zudem einen nahezu linearen Shift für die Substratprotonen zeigte, war damit nicht möglich.

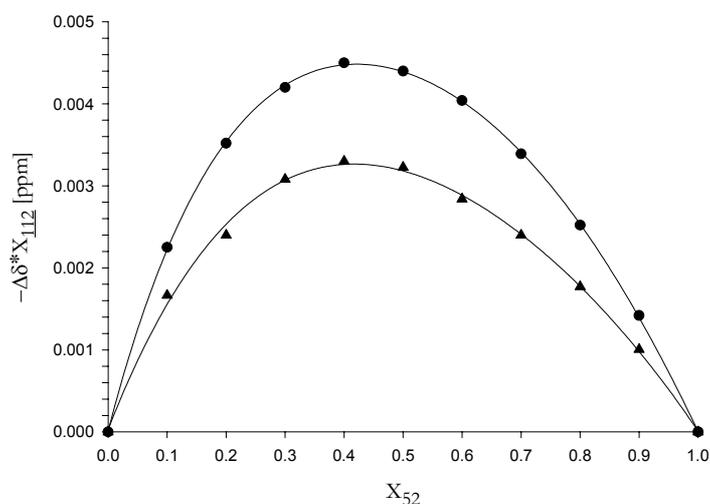


Abb. 2.19 Job-Plot von 52 und 112 in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (96:4). Beide Maxima liegen bei $X_{52} = 0,41$.

Diese Ergebnisse zeigten also eindeutig, daß das lineare Hexapeptid 52 keinen definierten 1:1-Komplex mit dem untersuchten Substrat bildet. Es müßte hierzu wahrscheinlich eine Konformation annehmen, in der wie bei den cyclischen Derivaten alle drei Carboxylatgruppen konvergieren und das Peptidrückrat ebenfalls eine Art Hohlraum bildet. Dazu müßten aber eine Vielzahl von Einfachbindungen in einer bestimmten Konformation fixiert werden, so daß die Freiheitsgrade des Gesamtmoleküls erheblich verringert würden. Diese Art der Komplexbildung wäre entropisch unvorteilhaft. Ein makrocyclisches Molekül ist dagegen erheblich besser vororganisiert und eine kooperative Wechselwirkung aller Bindungsstellen mit dem eingelagerten Substrat ist leichter möglich.

Damit konnte ich zeigen, daß die Cavität bei den hier verwendeten Cyclopeptiden für die Monosaccharidkomplexierung essentiell ist. Die fehlenden Rezeptoreigenschaften vom Monocarboxylat 54 zeigen, daß das kooperative Zusammenspiel dreier anionischer Gruppen die Substratbindung wesentlich verbessert, bzw. in dem verwendeten Lösungsmittel überhaupt erst ermöglicht. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Abb. 2.13 gezeigten Binaphthylphosphaten in der Arbeitsgruppe von Diederich gefunden.

Vergleich und Selektivität der Rezeptoren auf 5-Aminoisophthalsäure-Basis

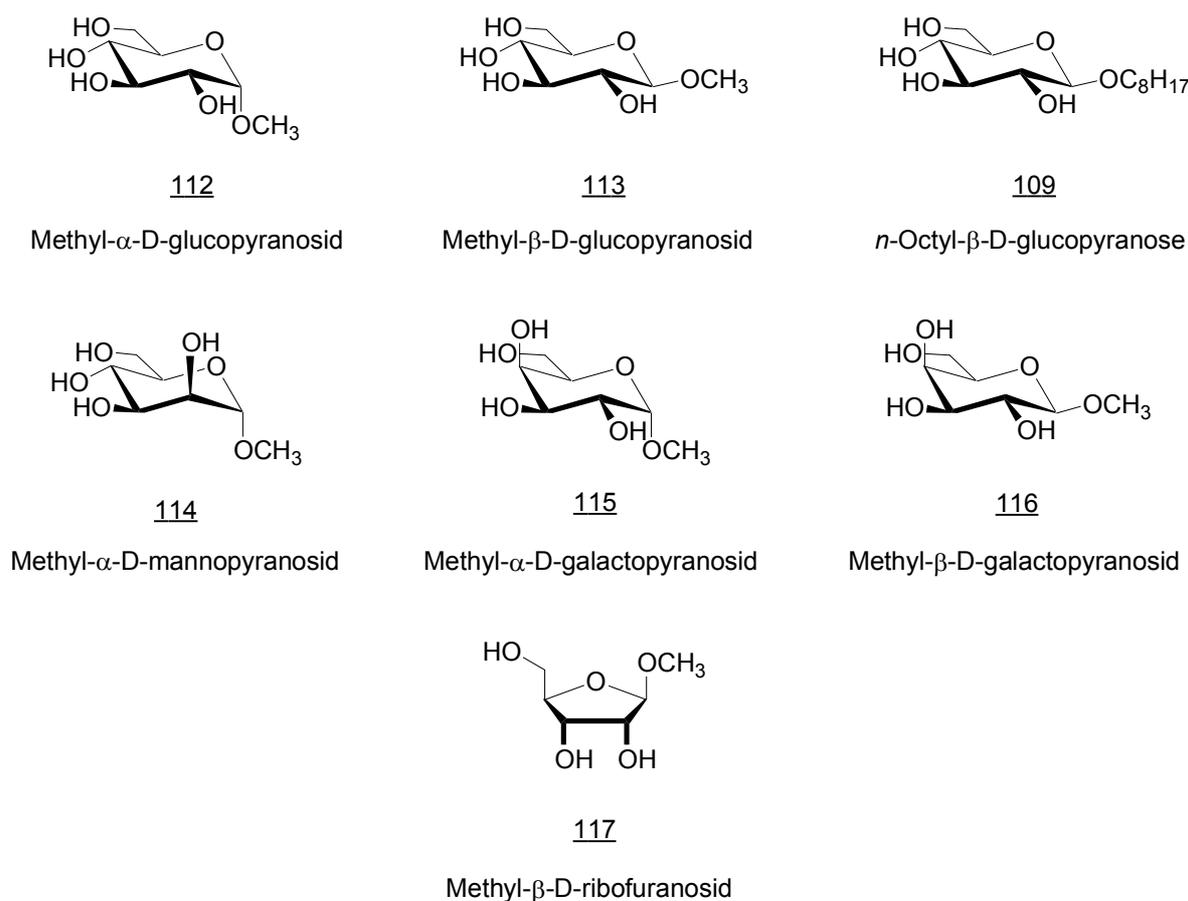


Abb. 2.20 Im Rahmen dieser Arbeit als Substrate verwendete Monosaccharide. Außer der Pentose 117 sind alle Verbindungen Hexosen.

Um die Selektivität von 6 und die Rezeptoreigenschaften und Selektivität der ebenfalls auf der nicht-natürlichen Aminosäure 5-Aminoisophthalsäure basierenden Rezeptoren 5 und 34 zu untersuchen, müssen noch andere Monosaccharide als das Glucosederivat 112 als mögliche Substrate untersucht werden. Ich habe mich für die in Abb. 2.20 aufgeführten Monosaccharide entschieden, deren Vorteil u.a. ihre kommerzielle Verfügbarkeit war.

In Tabelle 2.2 sind alle durch ¹H-NMR-Wirt-Gast-Titrations bestimmten Assoziationskonstanten aufgelistet. Eine 1:1-Stöchiometrie der Komplexe wurde mit Hilfe von Job-Plots auch für 5@116 und 6@112 gefunden. Da alle gemessenen Titrationskurven sehr gut mit den auf der Basis des mathematischen Formalismus von 1:1-Komplexen berechneten Kurven übereinstimmen, ist diese Stöchiometrie für alle anderen Komplexe sehr wahrscheinlich.

Auswertbare Titrationskurven konnten allerdings nur dann erhalten werden, wenn der Wassergehalt des Lösungsmittels mindestens 0,002% betrug. Nur dann ließen sich die Werte gut reproduzieren und Doppelbestimmungen ergaben stets im Rahmen des Meßfehlers übereinstimmende Ergebnisse. Ein doppelt so großer Wassergehalt beeinflusste die Größe der Assoziationskonstanten und den Wert für $\Delta\delta_{\max}$ dann nicht mehr signifikant. Über die genaue

Substrat \ Rezeptor	$K_a/\Delta\delta_{\max}^a)$		
	<u>34</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Methyl- α -glucopyranosid (<u>112</u>) ^{b)}	420/-0,06	660/-0,07	550/-0,05
Methyl- β -glucopyranosid (<u>113</u>)	550/-0,04	810/-0,07	650/-0,06
<i>n</i> -Octyl- β -glucopyranosid (<u>109</u>)	560/0,05 ^{c)}		
Methyl- α -mannopyranosid (<u>114</u>)	450/-0,04	700/-0,04	440/-0,06
Methyl- α -galactopyranosid (<u>115</u>) ^{b)}	300/-0,05	790/-0,06	390/-0,04
Methyl- β -galactopyranosid (<u>116</u>)	400/-0,06	540/-0,08	430/-0,05
Methyl- β -ribofuranosid (<u>117</u>) ^{b)}	160/-0,07	290/-0,08	190/-0,08

Tab. 2.2 Assoziationskonstanten der Rezeptoren auf 5-Aminoisophthalsäurebasis mit Monosaccharid-substraten. Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD (96:4), interner Standard: TMS. a) K_a in M⁻¹, Fehler <20%, $\Delta\delta_{\max}$ der O-CH₃-Gruppen in ppm. b) Es wurde CD₃OD mit 99,95-Atom-% D verwendet. c) Werte bestimmt für die Verschiebung der O-CH₂-Gruppe des Octylrestes.

Rolle des Wassers, das essentiell für die Komplexbildung zu sein scheint, kann hier nur spekuliert werden. Es erscheint jedoch möglich, daß Wassermoleküle in die Komplexe eingebaut werden und kooperative Wasserstoffbrücken zwischen Rezeptor und Substrat bilden. Dafür spricht, daß das Wasser eine Mindestkonzentration besitzen muß, um eine auswertbare Komplexbildung zu ermöglichen. In natürlichen Kohlenhydratrezeptoren (siehe z.B. die Wassermoleküle in Abb. 1.5) vermitteln Wassermoleküle oft die Bindung eines Monosaccharids.^[95] Aber auch in bestimmten künstlichen Kohlenhydratrezeptoren konnte nachgewiesen werden, daß Wassermoleküle für die Komplexbildung wichtig sind.^[96]

Die gemessenen Assoziationskonstanten und $\Delta\delta_{\max}$ -Werte liegen alle in der gleichen Größenordnung. Trotzdem sind einige Trends zu erkennen. Der Rezeptor 5 bindet alle untersuchten Monosaccharide besser als die Rezeptoren 6 und 34. Anscheinend sind seine Carboxylatgruppen besser zur Monosaccharidbindung vororientiert als die der beiden anderen Cyclopeptide. Es ist denkbar, daß sich die Carboxylatgruppen beim α -Glutamat (34) etwas zu weit und beim γ -Glutamat (5) etwas zu nah an der Cavität des cyclischen Grundgerüsts befinden, so daß die Assoziationskonstanten für die untersuchten Monosaccharide beim β -Aspartat ein Maximum durchlaufen.

Sehr deutlich ist, daß die Pentose 117 von allen drei Rezeptoren schlechter gebunden wird als die Hexosen. Zwei Gründe erscheinen hierfür plausibel: die Ribose besitzt eine Hydroxygruppe und damit auch eine Bindungsstelle für den Rezeptor weniger als die Hexosen. Zum anderen ist die Ribose kleiner als die Hexosen, so daß sie möglicherweise etwas schlechter in die Cavität der Cyclopeptide passt. Beide Gründe verringern die Assoziationskonstante, nicht aber die Werte für $\Delta\delta_{\max}$, was zeigt, daß die Ribosekomplexe eine ähnliche Geometrie besitzen wie die Komplexe der Hexosen.

Anders verhält sich die Octylglucose 109. In ihrem Komplex mit 5 ist der $\Delta\delta_{\max}$ -Wert für die O-CH₂-Gruppe positiv, d.h. der Shift ist im Gegensatz zu allen anderen in Tab. 2.2 ein Tieffeldshift. Das deutet darauf hin, daß diese Protonen während der Komplexbildung in eine andere chemische Umgebung gelangen als die O-CH₃-Gruppen der anderen Monosaccharide. Eine etwas andere Komplexgeometrie könnte die Ursache sein. Das erscheint nicht unwahrscheinlich, denn der große sterische Anspruch des *n*-Octylrestes könnte eine ungünstigere Orientierung des Saccharids im Komplex erforderlich machen. Resultat ist, daß das *n*-Octyl- β -glucopyranosid etwas schlechter gebunden wird als das Methyl- β -glucopyranosid.

Sanders et al. konnten zeigen, daß bestimmte Kohlenhydratrezeptoren Monosaccharide in folgender Reihenfolge immer schlechter binden : α -Mannose > β -Mannose > β -Glucose > α -Glucose \approx β -Galactose > α -Galactose.^[96] Der Grund hierfür liegt allerdings darin, daß diese Monosaccharide in dieser Reihenfolge verstärkt intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und dadurch ihre Neigung zur Selbstassoziation abnimmt. Zucker am

Ende dieser Reihenfolge sind also weniger stark aggregiert und stehen damit für eine Wechselwirkung mit einem Rezeptor eher zur Verfügung. Findet man für einen Rezeptor also eine Zunahme der Substrataffinität in der gleichen Reihenfolge, so spiegelt sich darin nur die Eigenschaft der Monosaccharide, nicht aber eine Selektivität des Rezeptors wieder. Meine Rezeptoren zeigen eine andere Reihenfolge in der Größe der Assoziationskonstanten. Insbesondere wird von allen das Methyl- β -glucopyranosid am besten gebunden. Ein Grund hierfür könnte sein, daß die drei Carboxylgruppen der Rezeptoren jeweils etwa in einer Ebene und damit komplementär zu den OH-Gruppen des Methyl- β -glucopyranosids (113) liegen, die aufgrund ihrer äquatorialen Stellung ebenfalls nahezu in einer Ebene angeordnet sind. Alle drei Rezeptoren besitzen also eine, wenn auch geringe, Selektivität bei der Komplexierung isomerer Hexosen.

Grund für diese geringe Selektivität bei der Substratbindung könnte die zu große Flexibilität der Cyclopeptide sein, denn die peripheren Substituenten können sich noch von dem schalenförmigen Hohlraum weg drehen (siehe Tabelle 2.1). Hier wäre ein Ansatzpunkt, um die Selektivität der Rezeptoren zu verbessern

Um mehr Informationen über die Komplexstrukturen zu erhalten, versuchte ich, Einkristalle für eine Röntgenstrukturanalyse vom Komplex mit der größten Bindungskonstante 5@113 darzustellen. Dies gelang jedoch nicht, u.U. wegen einer zu geringen Neigung des Rezeptors zur Kristallisation.

Auch der Versuch mit Hilfe von 2D- ^1H -NOESY- und 2D- ^1H -ROESY-NMR-Spektren Informationen dieses Komplexes zu gewinnen, schlugen fehl.

Da die Rezeptoren chiral sind und zudem aromatische Gruppen besitzen, die im UV-Bereich des elektromagnetischen Spektrums absorbieren, lag es nahe, die Komplexbildung auch CD-spektroskopisch zu untersuchen. In der Hoffnung, daß sich die Komplexbildung in einer Änderung des CD-Spektrums von Rezeptor 5 bemerkbar macht, nahm ich Spektren einer Lösung von 5 in An- und Abwesenheit von Substrat 113 auf. Dieser Komplex besitzt den NMR-Untersuchungen nach die größte Assoziationskonstante der untersuchten Komplexe und die Chance für einen Erfolg war hier dementsprechend am größten. Die entsprechenden CD-Spektren sind in Abb. 2.21 zu sehen. Im Spektrum von 5 tritt bei ca. 265 nm eine Bande auf, die nach der Zugabe von 32 Äquivalenten des Monosaccharids 113 eine Intensitätszunahme um 14% erfuhr (Abb. 2.21). Dieser Effekt ist zwar klein, erschien mir aber deutlich genug, um eine CD-spektrometrische Wirt-Gast-Titration zu versuchen.

Da während der Titration eine spektroskopische Eigenschaft des Cyclopeptids verfolgt wurde, mußte ich bei der Titration dessen Konzentration konstant halten und in separaten Probenlösungen die Konzentration des Monosaccharids sukzessive steigern. Bei den NMR-Titrationen waren die Verhältnisse gerade umgekehrt, hier titrierte ich bei konstanter

Monosaccharidkonzentration. Die Meßbedingungen von CD- und NMR-Wirt-Gast-Titrationsen sind also nicht direkt vergleichbar.

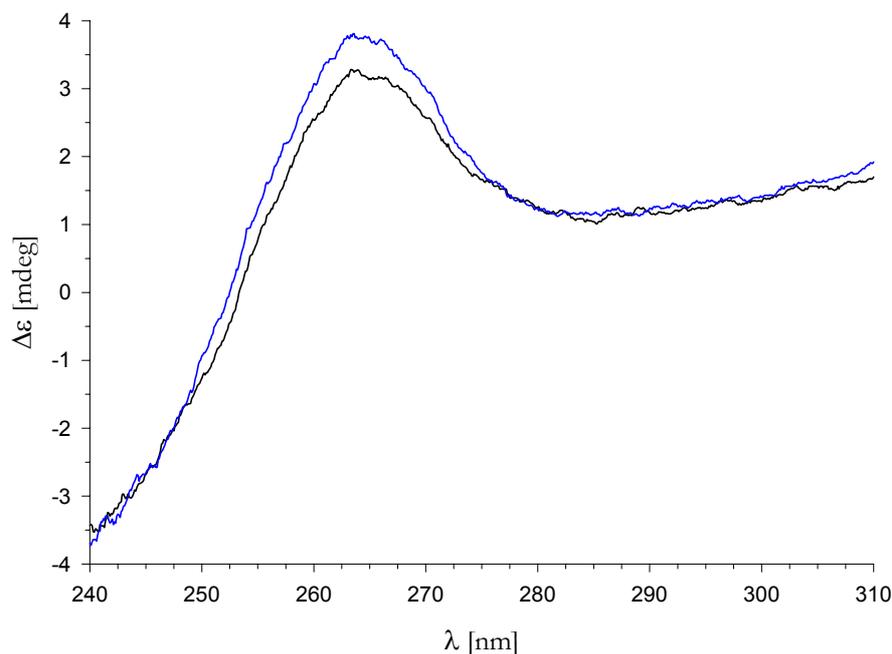


Abb. 2.21 Schwarz: CD-Spektrum einer Lösung von Rezeptor 5 in Chloroform/Methanol (96:4), Konzentration: $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$; Blau: Spektrum einer Lösung von 5 gleicher Konzentration nach Zugabe von mit 32 Äquivalenten 113.

Zur Auswertung der CD-Titration mußte ich zunächst die genaue Lage der Maxima der einzelnen Spektren bestimmen, da die Spektren trotz sorgfältiger Aufnahme ein leichtes Rauschen zeigten. Deshalb berechnete ich für jedes Spektrum im Bereich des Maximums bei ca. 265 nm eine lineare Regressionsfunktion. Das Maximum dieser Regressionskurve fand ich dann durch eine Nullstellenbestimmung ihrer 1. Ableitung. Danach bestimmte ich analog zu den bei den NMR-Titrationsen erhaltenen $\Delta\delta$ -Werten die $\Delta\Delta\epsilon$ -Werte für jede Probenlösung der Titration. Die nicht-lineare Regression ergab eine Assoziationskonstante von $K_a(\text{CD}) = 240 \text{ M}^{-1}$ bei einem $\Delta\Delta\epsilon_{\text{max}} = 14,0 \text{ mdeg}$ (Abb. 2.22). Der NMR-spektroskopisch bestimmte Wert für $K_a(\text{NMR}) = 810 \text{ M}^{-1}$ ist zwar größer, liegt jedoch in der gleichen Größenordnung. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Bedingungen, unter denen die beiden Werte ermittelt wurden (wie Konzentration, Titrationsrichtung und spektroskopisches Verfahren) stimmen die Werte akzeptabel überein. Ich konnte also ein zweites spektroskopisches Verfahren verwenden, um eine der Assoziationskonstanten zu überprüfen. Aufgrund der einfacheren Messung und der besseren Reproduzierbarkeit ist jedoch die NMR-Spektroskopie der CD-Spektroskopie in diesem Fall eindeutig überlegen.

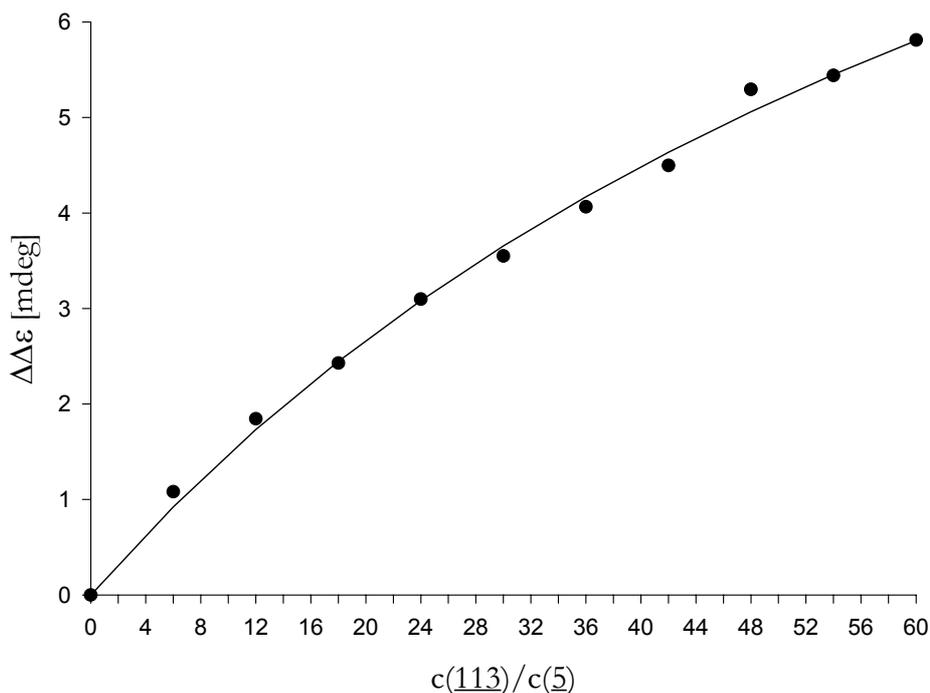


Abb. 2.22 Ergebnis der CD-Wirt-Gast-Titration des Komplexes aus 5 und 113 in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (96:4). Punkte: Meßwerte, Linie: Ergebnis der nicht-linearen Regression.

Vergleich der regioisomeren Rezeptoren 5 und 107

Ob auch das Cyclopeptid auf Aminoterephthalsäurebasis (107, Abb. 2.23) Rezeptoreigenschaften für Monosaccharide besitzt, sollten Wirt-Gast-Untersuchungen mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie klären. Ein Job-Plot des Komplexes aus 107 und dem Methyl- β -glucopyranosid (113) bestätigte sowohl eine Komplexbildung als auch die erwartete 1:1-Stöchiometrie.

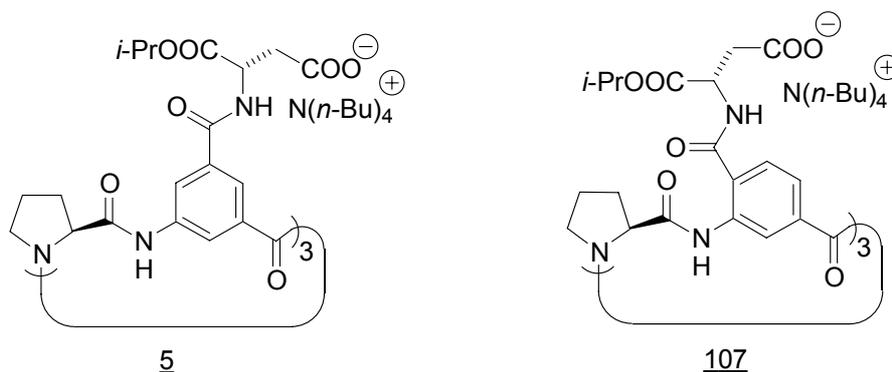


Abb. 2.23 Die beiden Regioisomere 5 und 107 im strukturellen Vergleich.

Der Rezeptor 107 besitzt im Vergleich zu den bisher vorgestellten Cyclopeptiden eine neue Eigenschaft: er fluoresziert bläulich, wenn er mit ultraviolettem Licht bestrahlt wird. Daher untersuchte ich, ob die Komplexbildung des Monosaccharids im Fluoreszenzemissions-

spektrum von 107 eine Änderung hervorruft, die signifikant genug ist, um auch mit dieser spektroskopischen Methode die Komplexbildung zu quantifizieren. Das Fluoreszenzspektrum von 107 zeigte zwei stark ausgeprägte Emissionsmaxima bei 380 nm und 477 nm. Die Intensität des ersteren Maximums wurde bei Zugabe von Monosaccharid 113 etwas verstärkt, so daß ich eine Wirt-Gast-Titration versuchte, bei der ich die Veränderung der Intensität dieser Bande verfolgte. Es stellte sich jedoch heraus, daß ihre Intensitätszunahme im Vergleich zum Rauschen und damit zur Meßgenauigkeit des Spektrometers nicht ausreichte, um die Assoziationskonstante des Komplexes zu bestimmen. Daher verwendete ich wiederum die NMR-Spektroskopie zur Bestimmung einiger repräsentativer Assoziationskonstanten. Die so ermittelte Affinität und Selektivität von 107 gegenüber Monosacchariden ist in Tabelle 2.3 im Vergleich zu den Rezeptoreigenschaften des regioisomeren Cyclopeptids 5 zusammengefaßt.

Substrat	Rezeptor	
	<u>5</u>	<u>107</u>
Methyl- α -glucopyranosid (<u>112</u>) ^b	660/-0,07	870/-0,07
Methyl- β -glucopyranosid (<u>113</u>)	810/-0,07	1300/-0,05
Methyl- α -galactopyranosid (<u>115</u>) ^b	790/-0,06	1350/-0,08
Methyl- β -ribofuranosid (<u>117</u>) ^b	290/-0,08	225/-0,08

Tab. 2.3 Vergleich der Assoziationskonstanten von 5 und 107 mit Monosacchariden. Lösungsmittel: CDCl₃/CD₃OD (96:4), interner Standard: TMS. a) K_a in M⁻¹, Fehler < 20%, $\Delta\delta_{\max}$ der O-CH₃-Gruppen in ppm. b) Es wurde CD₃OD mit 99,95-Atom-% D verwendet.

Die Tabelle zeigt eindeutig, daß der Rezeptor 107 alle untersuchten Hexosen besser als Rezeptor 5 bindet und damit auch besser als die anderen Rezeptoren auf 5-Aminoisophthalsäurebasis. Die Selektivität für Hexosen gegenüber der Pentose 117 ist ebenfalls deutlich stärker ausgeprägt, denn 117 wird von 107 noch etwas schlechter gebunden als von Rezeptor 5, während die Hexosen besser gebunden werden. Die Selektivität zwischen den einzelnen Hexosen ist ebenfalls etwas größer, auch wenn dieser Effekt nicht stark ausgeprägt ist. Immerhin konnte die Selektivität für die Methyl- β -glucopyranosid gegenüber dem α -Anomer von 1,2 für Rezeptor 5 auf 1,5 für Rezeptor 107 gesteigert werden.

Zur Verdeutlichung der Unterschiede bei den NMR-Titrations sind in Abb. 2.24 die Titrationskurven für die Komplexe 107@113 und 5@113 aufgetragen. Deutlich zu erkennen sind die stärkere Krümmung der Titrationskurve, die zum stabileren Komplex gehört und die Unterschiede in den gemessenen $\Delta\delta$ -Werten, die in unterschiedlichen Werten für $\Delta\delta_{\max}$ resultieren.

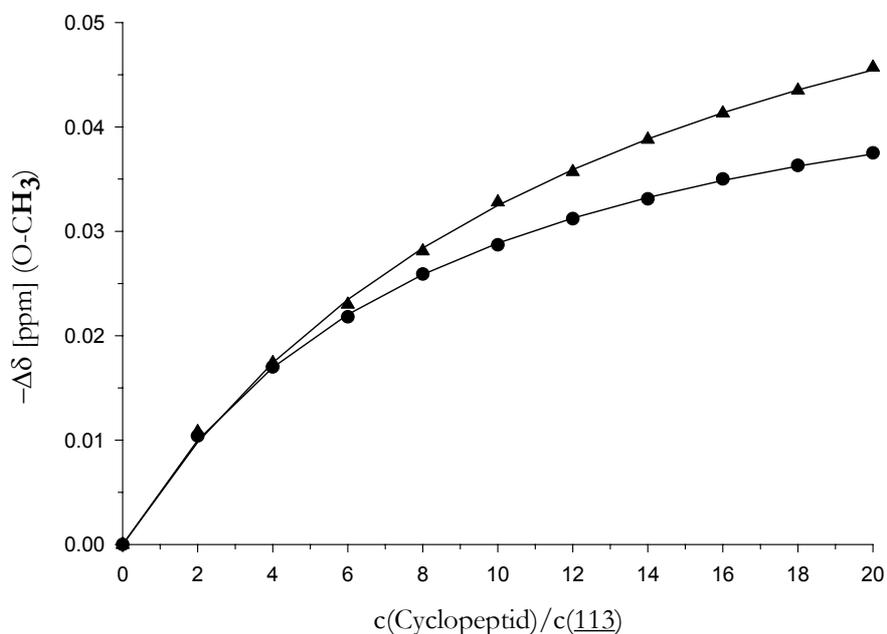


Abb. 2.24 Ergebnisse der Wirt-Gast-Titrations der Komplexe aus 5 und 113 (Dreiecke) und 107 und 113 (Kreise) in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (96:4). Interner Standard: TMS. Punkte: Meßwerte, Linien: Ergebnisse der nicht-linearen Regression. Beobachtet wurde jeweils die chemische Verschiebung der O-CH₃-Gruppe des Monosaccharids.

Mit einer Verbesserung der Affinität zu den untersuchten Hexosen in dem kompetitiven Lösungsmittel Chloroform/Methanol (96:4) im Vergleich zum regioisomeren Rezeptor 5 entsprach Rezeptor 107 tendenziell meinen Erwartungen. Die Selektivitätssteigerung bei der Unterscheidung der epimeren Hexosen 112, 113 und 115 ist vorhanden, allerdings nur relativ schwach ausgeprägt. Eine bessere Selektivität ist zumindest in Bezug auf die Unterscheidung zwischen den Hexosen und der Pentose zu erkennen. Die etwas größere konformative Starrheit des Rezeptors 107 gegenüber dem regioisomeren Rezeptor 5 wirkt sich also tatsächlich, wie aufgrund struktureller Vorüberlegungen vorhergesagt, positiv auf die Rezeptoreigenschaften aus. Die Verbesserung der Kohlenhydrataffinität und -selektivität blieb aber leider in einem verhältnismäßig geringen Rahmen.

Der direkte Vergleich der Rezeptoreigenschaften der neuen Monosaccharidrezeptoren mit literaturbekannten Rezeptoren fällt schwer, da häufig andere Monosaccharidderivate und andere Lösungsmittelgemische verwendet wurden. Es sind aber inzwischen Rezeptoren beschrieben, die Monosaccharide mit gleicher oder größerer Affinität und Selektivität komplexieren können als meine Cyclopeptide.^[32]

2.3.4 Untersuchungen mit Guanidiniumionen

2.3.4.1 Vorüberlegungen und bekannte Rezeptorstrukturen

Sowohl Wirt-Gast-Untersuchungen mit Kohlenhydraten als auch Molecular-Modeling-Studien zeigten, daß die neuen Rezeptoren in der Lage sind, mit ihren Carboxylatgruppen kooperativ ein geeignetes Substrat zu binden. Die Tatsache, daß ein Monosaccharid am besten gebunden wird, dessen Hydroxygruppen alle nahezu in einer Ebene liegen, weist darauf hin, daß die drei Carboxylatgruppen der Rezeptoren bei der Substratbindung ebenfalls in einer Ebene angeordnet sein können.

Es ist zu erwarten, daß die Tricarboxylate durch starke elektrostatische Wechselwirkungen auch mit geeigneten Kationen wechselwirken. Aufgrund der C_3 -Symmetrie der Rezeptoren sind für ein Kation mit ähnlicher Symmetrie besonders stabile Komplexe zu erwarten.^[97] Mit Hilfe semiempirischer Molecular-Modeling-Rechnungen untersuchte ich deshalb, ob das Guanidiniumion als mögliches Substrat dienen könnte. Für die Tricarboxylatrezeptoren stellte sich heraus, daß der Rezeptor mit den Aspartatseitengruppen (**5**) aufgrund der räumlichen Anordnung der Carboxylatgruppen der beste Rezeptor sein sollte.

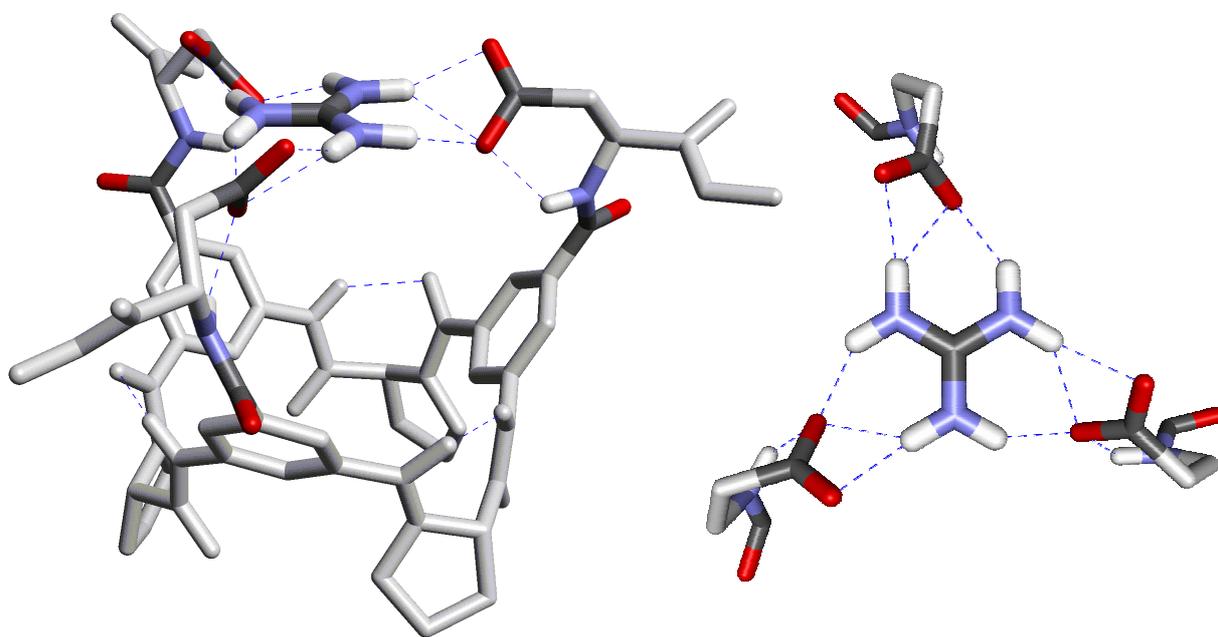


Abb. 2.25: Links: Semiempirisch mit PM3 optimierte Struktur eines Komplexes aus **5** und dem Guanidiniumkation. Die Isopropylgruppen von **5** wurden der Einfachheit halber durch Methylgruppen ersetzt. Blau gestrichelte Linien sind inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken. Rechts: Gleiche Struktur von oben mit Blick auf die Ebene des Kations. Zur Vereinfachung sind hier nur Teile der drei Aspartatreste, die das Kation binden, dargestellt. Das cyclische Grundgerüst (links grau) wurde weggelassen.

Dabei können die drei in einer Ebene liegenden Carboxylatgruppen das planare Kation in einem Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen fixieren. Man muß natürlich berücksichtigen, daß bei Komplexen mit einer solch großen Zahl von Freiheitsgraden und damit entsprechend großen Anzahl möglicher Konformere Rechnungen sicherlich nur Hinweise auf die Komplexstruktur geben können. Allerdings steht das in Abb. 2.25 gezeigte Ergebnis im Einklang mit allen bisher gewonnen experimentellen Daten.

Eine Untersuchung der Affinität von **5** für Guanidiniumionen und ein Vergleich mit dem Regioisomeren **107** schien somit vielversprechend, weshalb ich meine Untersuchungen auf diese beiden Cyclopeptide konzentrierte.

Das Guanidiniumion an sich ist allerdings im Hinblick auf biomimetische Aspekte nicht von allzu großem Interesse. In der Natur kommen Guanidiniumreste aber in der Aminosäure Arginin vor. Diese spielt für die Funktion einiger Enzyme eine wichtige Rolle. So wird in den aktiven Zentren vieler anionenbindender Proteine das Potential des Arginins genutzt. Das Phosphatanion wird beispielsweise von seinem Transportprotein durch zwölf Wasserstoffbrücken erkannt, wie Abb. 2.26 zeigt.^[98] Zwei davon werden von der Guanidiniumgruppe eines Argininrestes gebildet. Diese ist zusätzlich durch zwei ebenfalls parallele Wasserstoffbrücken an die Carboxylatgruppe eines Aspartatrestes gebunden.

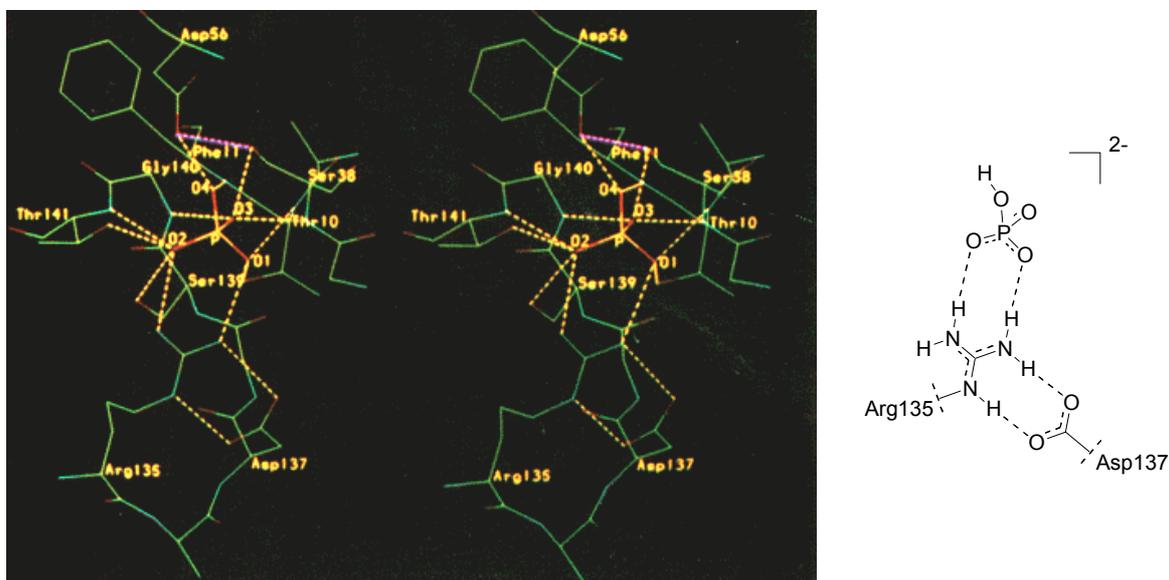


Abb. 2.26 Links: Stereobild des Komplexes aus einem Hydrogenphosphatanion und einem Phosphattransportprotein. Rechts ist die Wechselwirkung zwischen dem Hydrogenphosphatanion und der Carboxylatgruppe der Aminosäure Asp137 mit dem Guanidiniumrest der Aminosäure Arg135 hervorgehoben.^[98]

Außerdem erkennen Arginin- und lysinreiche Abschnitte in RNA-bindenden Proteinen

sequenzspezifisch bestimmte RNA-Abschnitte, wobei sie an die Phosphorsäurediestergruppen der Polynucleotide binden.^[99,100] DNA-Doppelstränge wickeln sich um Histon-Proteine, wodurch diese hochgeladenen, linearen Biopolymere überhaupt erst in den Zellkern passen.^[101] Für diese Wechselwirkung sind elektrostatische Kontakte zwischen basischen Aminosäuren wie Arginin und den Phosphatgruppen der DNA ebenfalls wichtig.^[102] Außerdem können beispielsweise die Proteasen Thrombin und Trypsin einen Peptidstrang unter Ausnutzung der Bindung eines Argininrestes an eine Carboxylatgruppe direkt hinter dieser Aminosäure spalten.^[103]

Durch diese Beispiele wird deutlich, daß Arginin in natürlichen Strukturen spezifisch mit Anionen wie Phosphaten und Carboxylaten wechselwirkt, die jeweils zwei parallele Wasserstoffbrücken zu den NH-Gruppen der Guanidiniumgruppe ausbilden können. Im Zusammenspiel mit einer elektrostatischen Anziehung ermöglicht dies die Argininerkennung oder umgekehrt die Erkennung der Anionen durch einen Argininrest in polaren Lösungsmitteln. Insofern sollte Rezeptor 5 prinzipiell ebenfalls Guanidiniumionen komplexieren können (siehe Abb. 2.25).

Aufgrund der Wichtigkeit dieser Wechselwirkungen ist verständlich, daß schon seit langem ein großes Interesse an der Erforschung sowohl natürlicher als auch künstlicher argininbindender Strukturen besteht. Verbindungen, die in eine der genannten biologischen Wechselwirkungen eingreifen können, sind z.B. von medizinischem Interesse. Die Geschichte künstlicher Guanidinium- und Argininrezeptoren geht bis in die Anfänge der Supramolekularen Chemie zurück. Pedersen untersuchte 1967 mit Kronenethern nicht nur die Komplexbildung von anorganischen Kationen, sondern auch die des Guanidiniumions. Dieses Kation bildet im Gegensatz zum *N,N,N',N'*-Tetramethylguanidiniumion einen Komplex mit Dibenzo[18]kronen-6.^[9] Die Komplexbildung verschiedener Kronenether mit Guanidiniumionen konnte später von Cram zur gezielten, templatgesteuerten Synthese eines Kronenethers verwendet werden.^[104,105]

Eines der frühesten Beispiele für eine selektive Guanidiniumionenbindung stammt von Lehn.^[106] Der strukturell auf Weinsäure basierende Kronenether 118 (Abb. 2.27) bindet das Guanidiniumion (G^+) ($K_a = 9000 \text{ M}^{-1}$) besser als das Methylguanidiniumion ($K_a = 450 \text{ M}^{-1}$) und L-Arginin ($K_a = 250 \text{ M}^{-1}$) in wäßriger Pufferlösung bei $\text{pH} = 7,3$. Reinhoudt konnte die zunächst postulierte Komplexstruktur später durch Röntgenstrukturanalysen bestätigen.^[107,108]

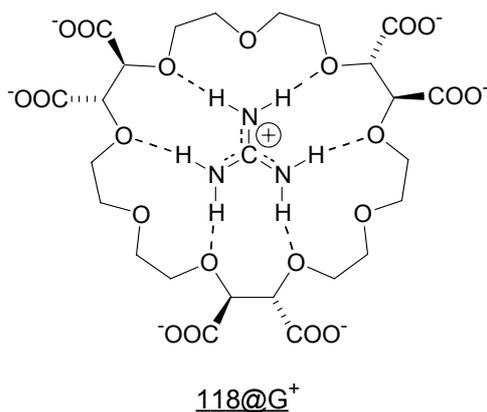


Abb. 2.27 Von Lehn entwickelter Rezeptor für Guanidiniumionen in wässriger Lösung.

In den letzten zehn Jahren wurden einige weitere leistungsfähige Guanidinium- und Argininrezeptoren entwickelt. Als Grundgerüst fungierten beispielsweise Toranden^[23], Calixarene^[109], Cyclophane^[110] oder, besonders bei Schrader, offenkettige, pinzetenartige Verbindungen.^[111-116] Als Wasserstoffbrückenakzeptoren waren hauptsächlich Carboxylat- und Phosphonatgruppen erfolgreich, in einigen Fällen konnten auch Kation- π -Wechselwirkungen zur Substratbindung genutzt werden. Interessanterweise gehört zu den offenkettigen Beispielen auch ein Argininrezeptor von Eliseev, der eines der frühesten Beispiele für die Optimierung eines Rezeptors durch molekulare Evolution ist.^[111] Besonders hervorheben möchte ich noch zwei Rezeptoren von Bell^[114] (119) und Dougherty^[110] (120), die eine besonders große Affinität zu Arginin in wässrigen Systemen zeigten (Abb. 2.28).

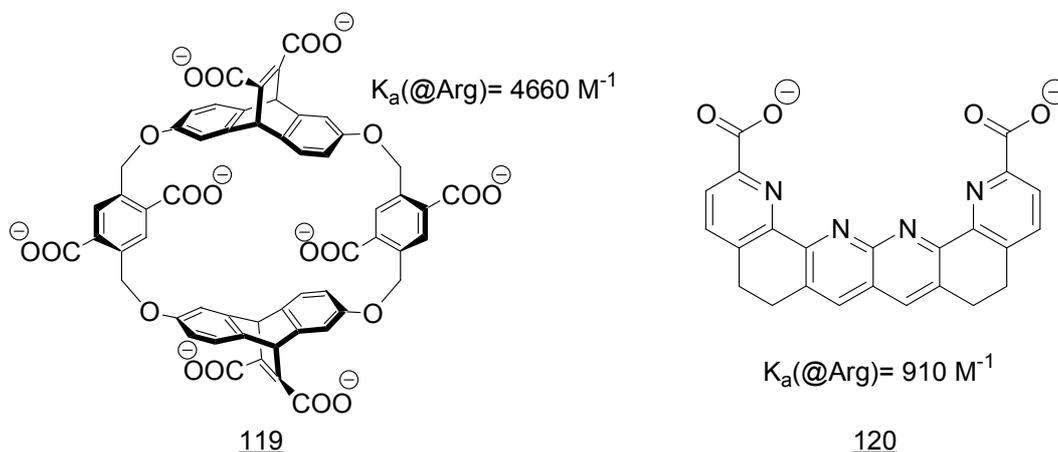


Abb. 2.28: Künstliche Argininrezeptoren von Dougherty^[110] (links) und Bell^[114] (rechts) mit ihren Assoziationskonstanten für Arginin in wässrigen Lösungen.

Für die chirale Erkennung, d.h. für die Unterscheidung der beiden Enantiomere von Arginin existieren allerdings bisher nur wenige Beispiele. Der Grund hierfür könnte in dem relativ großen Abstand der Guanidiniumgruppe von dem stereogenen Zentrum dieser Aminosäure liegen. Bisher wurden ein spaltenförmiges Bisphosphonat^[115], Kronenether und offenkettige

Podanden^[117], RNA-Aptamere, die nach einem kombinatorischen Ansatz entwickelt wurden^[118] und interessanterweise auch auf Sensoroberflächen immobilisierte Cyclohexapeptide erfolgreich zur enantioselektiven Argininerkennung verwendet. Schrader konnte dabei zeigen, daß hierfür mindestens eine Dreipunkt-Wechselwirkung notwendig ist.^[115]

2.3.4.2 Eigene Untersuchungen^[119]

Komplexierungsversuche mit verschiedenen Guanidiniumionen

Für meine Untersuchungen zur Komplexierung von Guanidiniumionen verwendete ich drei verschiedene Substrate (Abb. 2.29). Die einfachen Guanidiniumionen 121⁺ und 122⁺ ermöglichen es, den Einfluß eines Substituenten an der kationischen Gruppe auf die Komplexstabilität festzustellen. Das Argininderivat 123⁺ ist an beiden terminalen Enden geschützt und in Form seiner Enantiomere erhältlich. Es kann deshalb sowohl für die Untersuchung einer möglichen enantioselektiven Erkennung als auch zur Bestimmung des Einflusses der Substituenten am Guanidiniumion auf die Komplexstabilität verwendet werden.

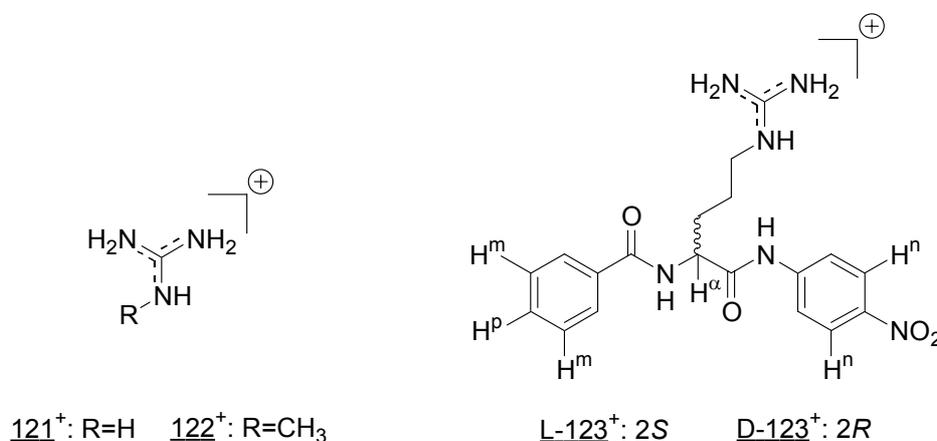


Abb. 2.29: Für Wirt-Gast-Experimente ausgesuchte Guanidiniumderivate als potentielle Gäste für die Cyclopeptide 5 und 10Z. Gegenionen waren stets Chloridionen.

Mit Hilfe der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) konnte ich erste Hinweise auf eine Komplexbildung finden. Im den Spektren einer äquimolaren Lösung von 5 und L-123⁺ bzw. D-123⁺ in Methanol konnten Ionen detektiert werden, die die Bildung von 1:1-Komplexen anzeigen (Abb. 2.30). Die Signale bei $m/z = 1647,8$ lassen sich dem Komplex [5@L/D-123⁺ - 3(*n*-Bu)₄N⁺ + H⁺] (ber. 1648,6) und die Signale bei $m/z = 1887,9$ dem Komplex [5@L/D-123⁺ - 2(*n*-Bu)₄N⁺] (ber. 1889,9) zuordnen. Molekülionen für Komplexe mit höheren Stöchiometrien waren nicht nachweisbar. Eine 1:1-Komplexstöchiometrie konnte für beide Komplexe durch Job-Plots bestätigt werden.

Die Komplexbildung von 5 mit 121⁺, 122⁺, L-123⁺ und D-123⁺ verursacht Änderungen in den ¹H-NMR-Spektren der Substrate in DMSO-d₆. Die Signale aller Guanidiniumgruppen erfahren Tieffeldshifts. Beispielsweise wird das Singulett des Guanidiniumkations durch die Anwesenheit von 5 in DMSO-d₆ um 1,40 ppm tieffeldverschoben. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die NH-Protonen aller verwendeten Guanidiniumionen in intermolekulare Wasserstoffbrücken mit Rezeptor 5 eingebunden werden.^[120]

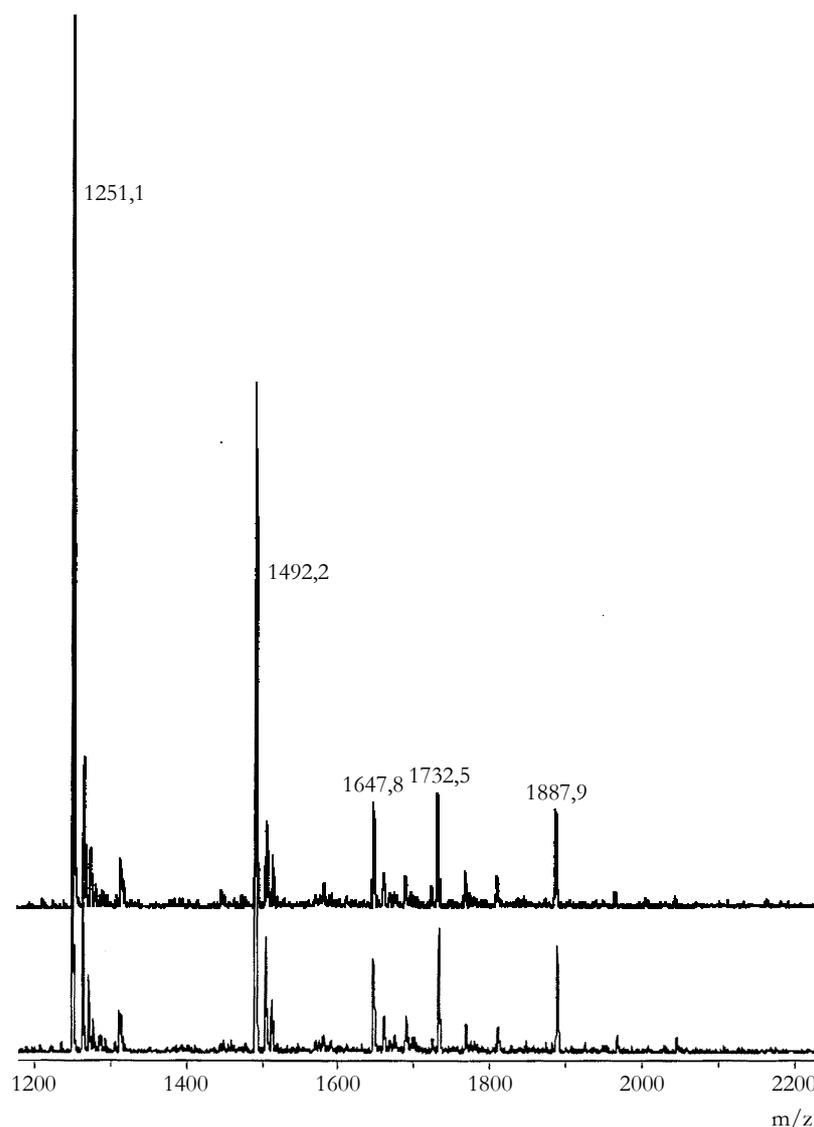


Abb. 2.30: Stack-Plot der ESI-Massenspektren äquimolarer Lösungen von 5 und a) D- bzw. b) L-123⁺ in Methanol. Die Signale bei $m/z = 1251,1$ ($[\underline{5} - 3(n\text{-Bu})_4\text{N}^+ + 2\text{H}^+]$, ber. 1250,4); 1492,2 ($[\underline{5} - 2(n\text{-Bu})_4\text{N}^+ + \text{H}^+]$, ber. 1491,7) und 1732,5 ($[\underline{5} - (n\text{-Bu})_4\text{N}^+]$, ber. 1733,0) gehören zum unkomplexierten Cyclopeptid. Andere Signale siehe Text. Detektiert wurden Anionen.

Zusätzlich sind in den Spektren Signalshifts der Methylgruppe vom Methylguanidiniumion und aller Protonen der beiden enantiomeren Argininderivate sichtbar. Besonders eindeutig sind bei L-123⁺ und D-123⁺ die durch die Komplexbildung verursachten Hochfeldshifts der in Abb. 2.29 markierten Protonen H^α, Hⁿ, H^m und H^p. Sie entsprechen in ihrer Richtung und ihrem Ausmaß den bei der Kohlenhydratkomplexierung beobachteten Hochfeldshifts und werden daher wahrscheinlich durch die Annäherung des Substrats an die aromatischer Gruppen der Rezeptoren verursacht.^[92,93]

Da ich mit Hilfe von 2D-¹H-NOESY- oder 2D-¹H-ROESY-NMR-Spektren der Komplexe aus 5 und 123⁺ keine eindeutige Information zur Komplexgeometrie erhalten konnte, habe

ich durch Molecular-Modeling mögliche Komplexstrukturen berechnet. Insbesondere sollten diese Berechnungen zeigen, ob im Komplex die aromatischen Substituenten tatsächlich in die Nähe der π -Systeme des Cyclopeptids gelangen können, wodurch der Hochfeldshift der entsprechenden Substratprotonen erklärbar wäre. Wie bei den Rechnungen zu den Kohlenhydratkomplexen ging ich dabei von einer Konformation des Cyclopeptids aus, die mit den vorher ermittelten experimentellen Daten in Einklang steht.^[44,90]

In Abb. 2.31 wird deutlich, daß bei der Komplexbildung jeweils einer der beiden aromatischen Reste von L-123⁺ in die Cavität des Cyclopeptids eingelagert werden kann, während der Guanidiniumrest gleichzeitig (vergleiche Abb. 2.25) durch ein Netz von Wasserstoffbrücken zwischen den drei Carboxylatgruppen gebunden wird. Sowohl hydrophobe Wechselwirkungen als auch zusätzliche Wasserstoffbrücken (Pfeile in Abb. 2.31) zwischen den Substituenten des Argininderivats und dem Cyclopeptid sollten einen solchen Komplex stabilisieren.

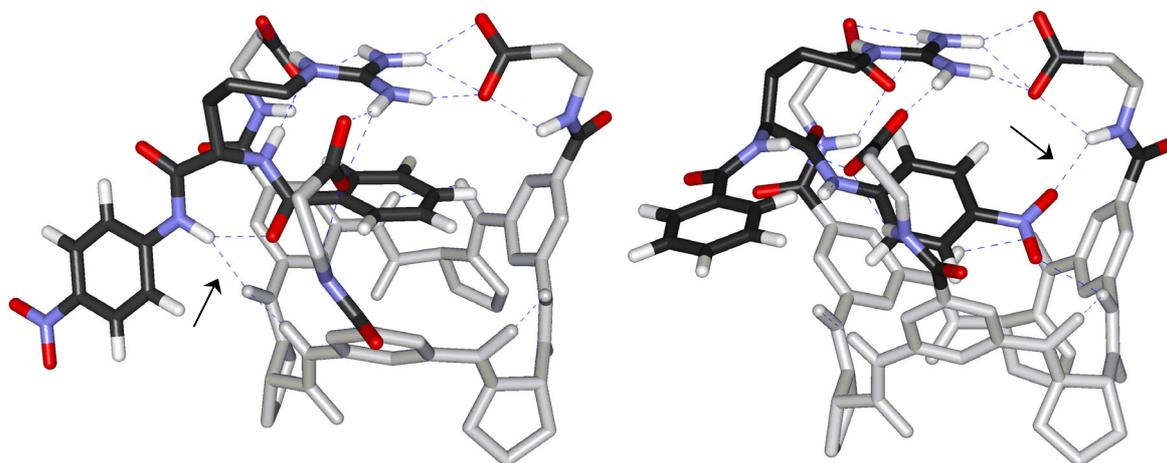


Abb. 2.31: Mit AM1 optimierte Strukturen eines Komplexes aus 5 und L-123⁺. Zur Vereinfachung wurden in dieser Darstellung bis auf alle NH- und die aromatischen Wasserstoffatome des Substrats keine Wasserstoffatome abgebildet. Das Grundgerüst des Cyclopeptids wurde einheitlich hellgrau eingefärbt, die Isopropylestergruppen ebenfalls nicht dargestellt.

Die durch die Wechselwirkung verursachten Signalshifts der aromatischen Protonen von 123⁺ ermöglichte eine Untersuchung der gebildeten Komplexe in Lösungsmitteln, in denen die Guanidinium-NH-Protonen durch Deuteronen des Lösungsmittels austauschen und deshalb im ¹H-NMR nicht mehr beobachtet werden können. Während aller NMR-Untersuchungen wurden keine Shifts der Terta-*n*-butylammoniumionen gefunden. Sie stören die Komplexbildung also offensichtlich nicht.

Daher war es möglich, die Assoziationskonstanten der Komplexe von 5 mit den in Abb. 2.29 aufgeführten Guanidiniumionen mit Hilfe der üblichen NMR-Titrationen zu bestimmen. Für die Auswertung wurde in allen Fällen die durch ESI-MS und Job-Plots (siehe Abb. 2.33) am

Beispiel der Komplexe $\underline{5@L-123}^+$ und $\underline{5@D-123}^+$ ermittelte 1:1-Komplexstöchiometrie zugrundegelegt. In Tabelle 2.4 und Abbildung 2.32 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefaßt. Wegen des großen Wertes für $\Delta\delta_{\max}$ wurde die Titrationskurve mit Guanidiniumhydrochlorid als Substrat in Abb. 2.32 nicht dargestellt. Für die Wirt-Gast-Titration mit dem Methylguanidiniumhydrochlorid mußte unter ^{13}C -Entkopplung der Protonen gearbeitet werden, da sonst das Signal der Methylgruppe des Substrats, deren Shift während der Titration verfolgt wurde, von einem ^{13}C -Satelliten des Lösungsmittelsignals überlagert wurde.

In DMSO- d_6 wird das Guanidiniumion $\underline{121}^+$ von Rezeptor $\underline{5}$ wie erwartet stark gebunden. Die Assoziationskonstante von $K_a = 52.000 \text{ M}^{-1}$ ist ein guter Hinweis auf die kooperative Beteiligung aller drei Carboxylatgruppen des Rezeptors an der Bindung des Kations, denn Hamilton konnte zeigen, daß der Komplex aus einem einfachen Guanidiniumion und einem Acetatanion nur eine Assoziationskonstante von $K_a = 12.000 \text{ M}^{-1}$ besitzt.^[120]

	$\underline{121}^+$ $K_a/\Delta\delta_{\max}^a)$	$\underline{122}^+$ $K_a/\Delta\delta_{\max}$	$\underline{L-123}^+$ $K_a/\Delta\delta_{\max}$	$\underline{D-123}^+$ $K_a/\Delta\delta_{\max}$
DMSO- d_6	52.000/1,94 (NH)	19.300/-0,08 (CH ₃)	31.000/-0,07 (H ⁿ)	29.300/-0,10 (H ⁿ)
			37.000/-0,05 (H ^m)	37.000/-0,04 (H ^m)
			31.000/-0,05 (H ^p)	35.500/-0,05 (H ^p)
CD ₃ OD		3.360/-0,07 (CH ₃)	8.300/-0,07 (H ⁿ)	8.800/-0,08 (H ⁿ)
			8.300/-0,04 (H ^m)	8.800/-0,10 (H ^m)
			7.000/-0,04 (H ^p)	9.000/-0,06 (H ^p)
			8.200/-0,14 (H ^z)	8.400/-0,17 (H ^z)
D ₂ O (pD 7,2) ^{b)}		Kein Shift (CH ₃)	210/-0,22 (H ⁿ)	215/-0,22 (H ⁿ)
				260/-0,17 (H ^m)

Tab. 2.4 Assoziationskonstanten der Komplexe von $\underline{5}$ mit verschiedenen Guanidiniumionen. a) K_a in M^{-1} , Fehler < 20%, $\Delta\delta_{\max}$ der angegebenen Protonen in ppm. b) Puffer: 10 mM Lösung von $[(n\text{-Bu})_4\text{N}]\text{H}_2\text{PO}_4/[(n\text{-Bu})_4\text{N}]_2\text{HPO}_4$ in D_2O , pD auf 7,2 eingestellt. Abkürzungen für die Protonen von \underline{L} - und $\underline{D-123}^+$ siehe Abbildung 2.29.

Das Methylguanidiniumion $\underline{122}^+$ wird mit einer Assoziationskonstante $K_a = 19.300 \text{ M}^{-1}$ deutlich schlechter gebunden als das unsubstituierte Guanidiniumion. Dies läßt sich mit der verringerten Symmetrie des Substrats und der dadurch kleineren Anzahl von möglichen Wasserstoffbrückenbindungen zum Rezeptor erklären. Die Methylgruppe des Substrats ist wie zu erwarten nicht in der Lage, zusätzliche komplexstabilisierende Wechselwirkungen mit dem Rezeptor auszubilden.

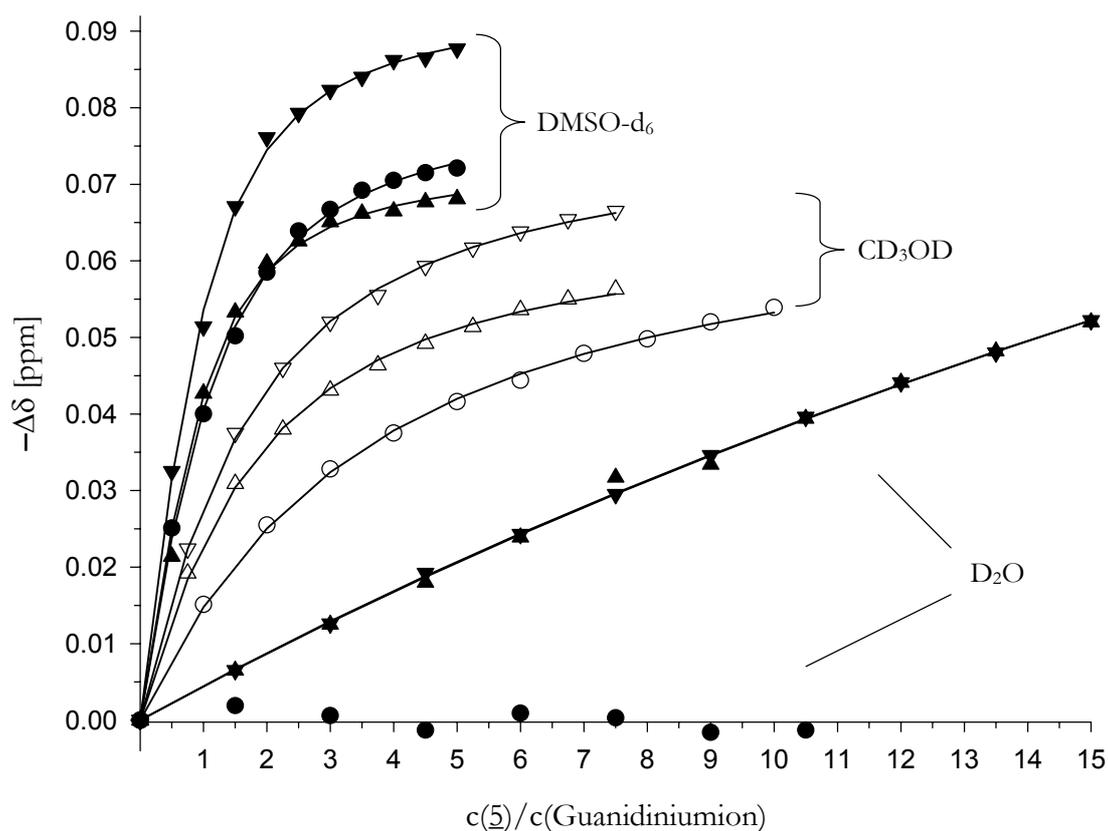


Abb. 2.32: Wirt-Gast-Titrationskurven von 5 mit den Guanidiniumionen 122^+ (Kreise), $L-123^+$ (Dreiecke, Spitze nach oben) und $D-123^+$ (Dreiecke, Spitze nach unten) in den Lösungsmitteln DMSO- d_6 (oben, ausgefüllte Symbole), CD_3OD (Mitte, nicht ausgefüllt), D_2O -Puffer (unten, ausgefüllt).

Anders verhält es sich bei den Argininderivaten $L-$ und $D-123^+$. Diese werden besser gebunden als das Methylguanidiniumion, obwohl die Anzahl der möglichen Wasserstoffbrücken zwischen Guanidiniumion und 5 gleich groß ist. Der Grund hierfür sind höchstwahrscheinlich zusätzliche komplexstabilisierende Wechselwirkungen z.B. zwischen dem Cyclopeptidring und den Substituenten des Arginins.

Auch in kompetitiveren Lösungsmitteln werden die verwendeten Substrate von 5 gebunden. Wie erwartet sinken die Stabilitätskonstanten mit steigender Polarität des Lösungsmittels in der Reihenfolge $DMSO-d_6 > CD_3OD > D_2O$. Im wässrigen Puffer wird das Methylguanidiniumion gar nicht mehr gebunden, während 5 und 123^+ sogar in diesem Lösungsmittel noch einen Komplex bilden. Offensichtlich spielen in D_2O die hydrophoben Wechselwirkungen und möglicherweise die durch Molecular-Modeling gefundenen zusätzlichen Kontakte zwischen dem Cyclopeptid und dem Argininderivat eine dominante Rolle bei der Komplexbildung.

Bei den Wirt-Gast-Untersuchungen mit D- und L-123⁺ fand ich sowohl in den Job-Plots (Abb. 2.33) als auch bei den entsprechenden NMR-Titrations (Tab. 2.4) für die Komplexbildung mit diesen beiden Enantiomeren deutliche Unterschiede. So zeigen die Signale analoger Substratprotonen der diastereomeren Komplexe 5@L-123⁺ und 5@D-123⁺ während der Komplexbildung unterschiedlich ausgeprägte Signalshifts. Besonders groß ist der Unterschied bei den H^m-Protonen von 123⁺, die im Komplex 5@D-123⁺ einen mehr als doppelt so großen Signalshift zeigen wie im Komplex 5@L-123⁺.

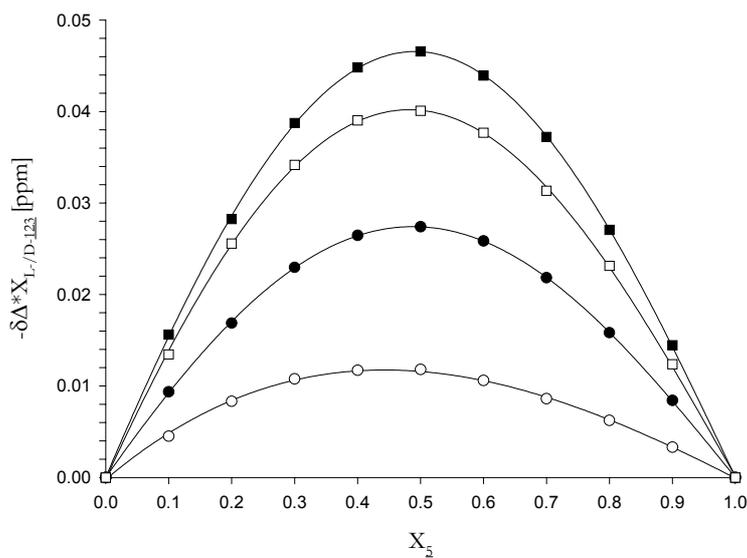


Abb. 2.33: Job-Plots der Komplexe aus 5 und L-123⁺ (Nicht-ausgefüllte Symbole) bzw. D-123⁺ (Ausgefüllte Symbole). Beobachtet wurden die Signale der Protonen H^m (Kreise) und H^a (Quadrate).

Diese Protonen gelangen in diesen diastereomeren Komplexen offensichtlich in eine unterschiedliche chemische Umgebung. Die Ursache könnten verschiedene Komplexgeometrien sein, die jedoch nicht zu einer Enantioselektivität bei der Argininkomplexierung führen, denn beide Substratenantiomere werden im Rahmen der Meßgenauigkeit in allen verwendeten Lösungsmitteln von Rezeptor 5 gleich stark gebunden.

Zusammenfassend zeigt Cyclopeptid 5 eine hohe Affinität zu den untersuchten Guanidiniumionen, die in der gleichen Größenordnung liegt wie die einiger bekannter Rezeptoren. Direkte Vergleiche fallen allerdings auch hier schwer, da in der Literatur oftmals die Komplexbildung anderer Argininderivate beschrieben ist. 5 besitzt aber eine Selektivität für das verwendete Argininderivat gegenüber dem Methylguanidiniumion, was diesen Rezeptor z.B. gegenüber dem Lehnschen Kronenether 118 auszeichnet, der mit dem Methylguanidiniumion in wässrigem Puffer einen stabileren Komplex bildet als mit Arginin. Zusätzlich komplexiert das Cyclopeptid sogar ein geschütztes Argininderivat in Wasser. Hierfür sind wahrscheinlich hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich.

Vergleich der regioisomeren Rezeptoren 5 und 107

Für das Cyclopeptid mit Aminoterephthalsäureeinheiten 107 habe ich gezeigt, daß es eine etwas größere Affinität und Selektivität bei der Erkennung diastereomerer Monosaccharide besitzt als sein Regioisomer 5. Gleiches gilt auch für seine Rezeptoreigenschaften bei der Argininerkennung, wie NMR-Wirt-Gast-Titrations zeigen. In Methanol bindet 107 das L-Enantiomer von 123⁺ mit einer Assoziationskonstante von $K_a = 9900 \text{ M}^{-1}$ etwas besser als der Rezeptor 5 ($K_a = 8300 \text{ M}^{-1}$). Das D-Enantiomer wird von 107 noch stärker gebunden ($K_a = 12800 \text{ M}^{-1}$). Die beiden Werte für die enantiomeren Substrate wurden in zwei unabhängigen Messungen bestimmt, so daß das Verhältnis der Assoziationskonstanten von 107 mit D- bzw. L-123⁺ von 1,30 (und der sich daraus ergebende Diastereomerenüberschuß von 13%) nur als erster Hinweis auf eine Enantioselektivität zu interpretieren sind. Die Unterschiede, die bei den Untersuchungen mit den enantiomeren Argininderivaten mit Rezeptor 5 in dem Ausmaß der Signalshifts auftraten, fand ich bei den Komplexen mit Rezeptor 107 in ähnlicher Größenordnung wieder. Die gebildeten diastereomeren Komplexe besitzen auch hier unterschiedliche Geometrien, durch die vergleichbare Substratprotonen in unterschiedliche chemische Umgebungen gelangen.

	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>107</u>	<u>107</u>
	<u>L</u> - <u>123</u> ⁺	<u>D</u> - <u>123</u> ⁺	<u>L</u> - <u>123</u> ⁺	<u>D</u> - <u>123</u> ⁺
	$K_a/\Delta\delta_{\max}^a)$	$K_a/\Delta\delta_{\max}$	$K_a/\Delta\delta_{\max}$	$K_a/\Delta\delta_{\max}$
CD ₃ OD	8.300/-0,07 (H ⁿ)	8.800/-0,08 (H ⁿ)	9.900/-0,05 (H ⁿ)	12.800/-0,06 (H ⁿ)
	8.300/-0,04 (H ^m)	8.800/-0,10 (H ^m)	10.100/-0,04 (H ^m)	12.200/-0,10 (H ^m)
D ₂ O (pD 7,2) ^{b)}	210/-0,22 (H ⁿ)	215/-0,22 (H ⁿ)	sehr kleiner linearer Shift	nicht bestimmt

Tab. 2.4 Assoziationskonstanten der Komplexe von 5 und 107 mit den Argininderivaten L- und D-123⁺. a) K_a in M^{-1} , Fehler < 20%, $\Delta\delta_{\max}$ der angegebenen Protonen in ppm. b) Puffer: 10 mM Lösung von $[(n\text{-Bu})_4\text{N}]\text{H}_2\text{PO}_4 / [(n\text{-Bu})_4\text{N}]_2\text{HPO}_4$ in D_2O , pD auf 7,2 eingestellt. Abkürzungen für die Protonen von L- und D-123⁺ siehe Abb. 2.29.

Etwas unerwartet bindet 107 das untersuchte L-Enantiomer von 123⁺ nicht mehr meßbar in Wasser. Aus diesem Grunde wurde die Bindung des entsprechenden D-Enantiomeren nicht mehr untersucht. Es kann hier nur spekuliert werden, daß die hydrophoben Wechselwirkung, die für die Wechselwirkung von 5 mit den Argininderivaten in Wasser verantwortlich gemacht werden, in den Komplexen von 107 nicht in ausreichendem Maße ausgeprägt sind. Den bereits bei der Kohlenhydratkomplexierung aufgefallenen Unterschied zwischen den

Rezeptoren 5 und 107 konnte ich bei den Untersuchungen mit den Argininderivaten wiederfinden: der konformativ starrere Rezeptor 107 scheint auch für diese Substratklasse besser präorganisiert zu sein und zeigt eine etwas größere Affinität als 5 und erstmals auch Anzeichen einer Enantioselektivität. Eine Argininbindung in Wasser ist mit 107 aber nicht möglich.

2.3.5 Enantioselektive Erkennung eines chiralen Ammoniumions

2.3.5.1 Die enantioselektive Erkennung

Die selektive Unterscheidung der beiden Enantiomere eines Substrats ist eine wichtige Fähigkeit natürlicher Rezeptoren und Enzyme. Welche unterschiedliche Wirkung die beiden Enantiomere einer chemischen Substanz in einem Organismus haben können, zeigt ein populäres Beispiel: das Thalidomid, der Wirkstoff des Contergans. Das R-Enantiomer ist ein wirksames Schlafmittel, während das S-Enantiomer eine stark teratogene Wirkung beim Menschen zeigt.^[121]

Die Nachahmung der enantioselektiven Erkennung durch einen künstlichen Rezeptor stellt eine der größten Herausforderungen an die Supramolekulare Chemie dar. Solche Rezeptoren müssen selber chiral sein, um ein Enantiomer des Substrats besser binden zu können, während das andere idealerweise nicht erkannt wird. Dazu ist ein sehr hohes Maß an Präorganisation und eine möglichst große Anzahl an Wechselwirkungen mit dem Substrat nötig. Werden beide Enantiomere eines Substrats von einem enantiomerenreinen Rezeptor in 1:1-Komplexen gebunden, so resultieren zwei diastereomere Komplexe. Die Enantiomere des Substrats werden dadurch durch Methoden unterscheidbar, mit denen dies sonst nicht möglich ist. So kann man verschiedene Signalsätze für die Enantiomere des Substrats in den NMR-Spektren der beiden diastereomeren Komplexe beobachten. Dies bedeutet aber nicht zwangsläufig, daß die beiden Enantiomere auch unterschiedlich stark gebunden werden müssen, wie beispielsweise meine Untersuchungen zur Komplexierung von zwei enantiomeren Argininderivaten (siehe Kapitel 2.3.4.2.) mit Rezeptor 5 gezeigt haben. Ob tatsächlich eine enantioselektive Erkennung vorliegt, kann nur die Bestimmung der beiden Assoziationskonstanten klären.

Mit der Herstellung chiraler Kronenether durch Cram begann die Entwicklung künstlicher enantioselektiver Rezeptoren.^[122] So bindet der Kronenether (R,R)-124 (Abb. 2.34), dessen Chiralität auf die Binaphthylgruppen zurückzuführen ist, das R-Enantiomer des Ammoniumions 125 besser als das entsprechende S-Enantiomer.^[123]

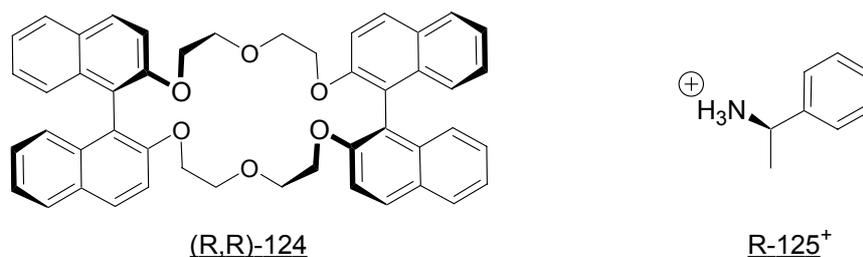


Abb. 2.34: Einer der ersten chiralen Kronenether, der das Ammoniumion 125⁺ enantioselektiv erkennt.

Später konnte Cram zeigen, daß diese enantioselektive Erkennung durch 124 und einer Vielzahl anderer verwandter Kronenether und Azakronenether auch gegenüber verschiedenen Aminosäuren (in Form ihrer Methylester) besteht.^[124,125] Diese Kronenether besaßen alle eine C_1 oder C_2 -Symmetrie.

Erstaunlicherweise sind Makrocyclen mit einer C_1 -Symmetrie, obgleich sie den geringsten Grad an Symmetrie besitzen, prinzipiell nicht am günstigsten für eine enantioselektiven Erkennung. Besser geeignet sind häufig Rezeptoren mit C_2 , C_3 , oder D_2 -Symmetrie, wie Zhang, Bradshaw und Itzatt nicht nur aus experimentellen Daten, sondern auch aufgrund theoretischer Überlegungen erklären konnten.^[126] Bei einem C_3 -symmetrischen Rezeptor sind für ein chirales Substrat prinzipiell nur zwei Arten der Komplexierung möglich, genau eines für jedes Enantiomer. „Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine chirale Erkennung“.^[97] Daher ist zu erwarten, daß auch die in dieser Arbeit vorgestellten Cyclopeptide grundsätzlich die Fähigkeit zur enantioselektiven Erkennung besitzen sollten.

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl chiraler Makrocyclen für die enantioselektive molekulare Erkennung entwickelt werden.^[126] Unter den wenigen bisher untersuchten C_3 -symmetrischen Strukturen erwiesen sich die von Still et al. vorgestellten schüsselförmigen Makrocyclen,^[127-129] die ihre Enantioselektivität gegenüber verschiedenen Aminosäuren beispielsweise im Screening von Peptidbibliotheken unter Beweis stellen konnten, als besonders erfolgreich.^[129] Ein Beispiel für diese Strukturen ist in Abb. 2.35 dargestellt.

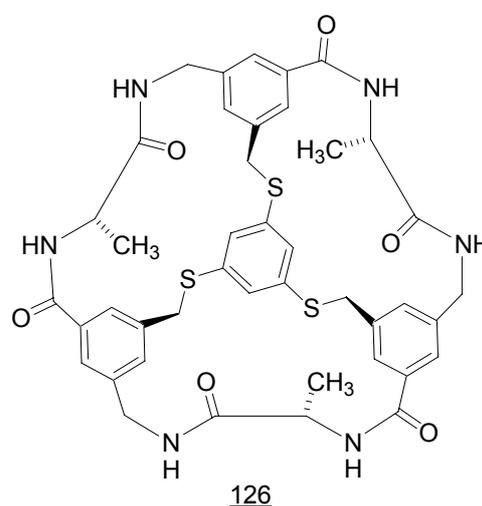


Abb. 2.35: Ein C_3 -symmetrischer Rezeptor, der enantioselektiv Aminosäuren erkennt.

Kürzlich wurde über C_3 -symmetrische Makrocyclen mit Tris(oxazolin)-Gruppen^[130] bzw. einer in eine Cavität gerichteten Phosphinoxidgruppe^[131] berichtet, die ebenfalls eine Enantioselektivität bei der intermolekularen Erkennung von verschiedenen Aminosäuren besitzen.

In unserer Arbeitsgruppe konnte Kubik erstmals zeigen, daß die von ihm entwickelten Cyclohexapeptide quaternäre Ammoniumionen komplexieren.^[44] Verbindungen vom Typ 7, mit Substituenten in 4-Position an den aromatischen Untereinheiten, waren dabei besonders effizient.^[47] Da diese chiral (und C_3 -symmetrisch) sind, stellte sich die Frage, ob sie bei der Erkennung dieser Substratgruppe auch Enantiomere unterscheiden können. Untersuchungen von Heinrichs zeigten vor kurzem, daß dies tatsächlich der Fall ist. So wird das chirale quaternäre N,N,N -Trimethyl-1-phenylethylammoniumion 127⁺ von den Cyclopeptiden 7a-d

(Abb. 2.36) enantioselektiv erkannt, wobei das R-Enantiomer des Substrats von allen untersuchten Cyclopeptiden besser gebunden wird als das S-Enantiomer. In Chloroform betragen die Diastereomerenüberschüsse (d.e.) der Komplexe von **7b** und **7c** etwa 20%, die der Komplexe von **7a** und **7d** etwa 8%. Die Assoziationskonstanten bewegen sich in Chloroform im Bereich von 1000 M^{-1} - 4600 M^{-1} .^[132] Dabei ist **7c** in Bezug auf d.e. und Affinität der erfolgreichste Rezeptor in dieser Reihe. Die Enantioselektivität ist zwar noch nicht groß, sie ist aber die bisher höchste, die für die enantioselektive Erkennung des verwendeten Substrats nachgewiesen werden konnte.

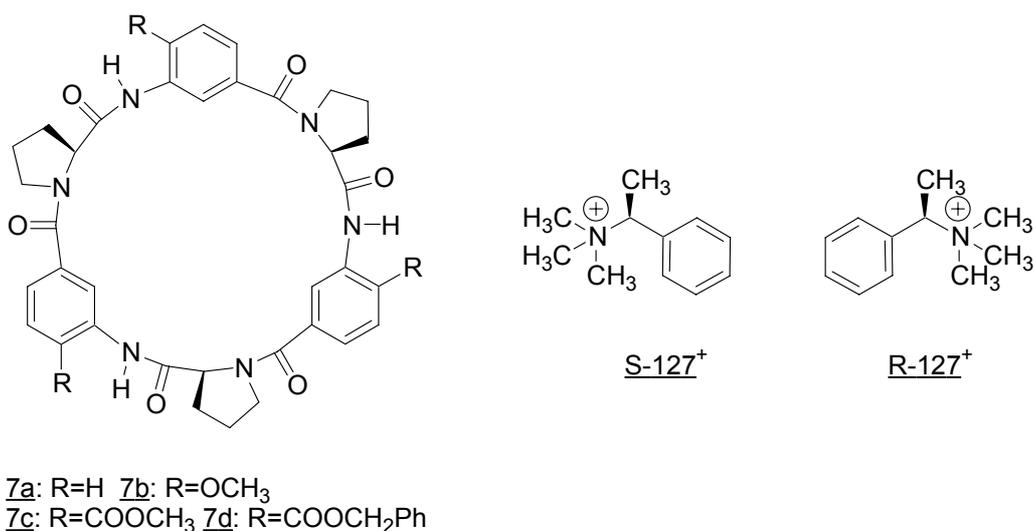


Abb. 2.36: Für die von Kubik entwickelten Cyclopeptide **7a-d** konnte Heinrichs eine Enantioselektivität bei der Komplexierung des chiralen quaternären Ammoniumions **127⁺** finden.

In der Literatur findet sich bisher nur ein einziges weiteres Beispiel für Untersuchungen zur enantioselektiven Erkennung eines quaternären Ammoniumions. Bei Anwesenheit eines C₁-symmetrischen Homoazacalix[4]arens zeigen die beiden Enantiomere des Kations **127⁺** im ¹H-NMR-Spektrum verschiedene Signalsätze. Dies schlägt sich jedoch nicht in unterschiedlichen Assoziationskonstanten und damit nicht in einer Enantioselektivität nieder.^[133]

2.3.5.2 Eigene Untersuchungen

Die Tricarboxylate **94** und **41** (Abb. 2.37) wurden von mir synthetisiert, um die Rezeptoreigenschaften unserer Cyclopeptide für quaternäre Ammoniumionen in polarere Lösungsmittel zu übertragen. Dies soll durch die zu erwartenden zusätzlichen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen kationischem Substrat und anionischen Rezeptoren erreicht werden.

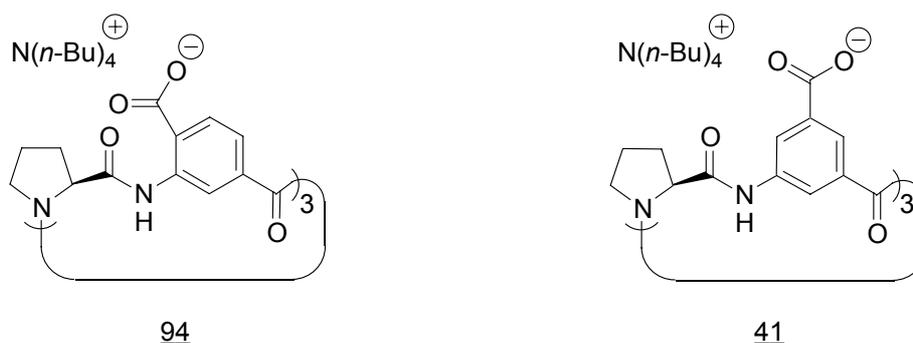


Abb. 2.37: Cyclische Tricarboxylate zur Erkennung von organischen Kationen in polaren Lösungsmitteln.

Eine ähnliche Strategie ist erfolgreich von Schneider mit einem Resorcinaren, das in seiner Struktur dem Rezeptor **1** (siehe Einleitung, Abb. 1.3) sehr ähnelt, verfolgt worden. Bei diesem Resorcinaren wurden vier Phenolgruppen in wässriger NaOD-Lösung deprotoniert, so daß dieser Makrocyclus wie die Cyclopeptide **94** und **41** einen schalenförmigen Hohlraum besitzt, der an der offenen Seite von anionischen Substituenten flankiert wird. Es gelang ihm so, quaternäre Ammoniumionen in wässriger Lösung mit Assoziationskonstanten von bis zu $2,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (für das Tetramethylammoniumion) zu komplexieren.^[134,135]

Das Cyclopeptid **94** entspricht den Rezeptoren **7c** und **7d** insofern, daß lediglich die Estergruppen dieser beiden Verbindungen gegen die Carboxylatgruppen ausgetauscht wurden. Bei **7b-d** wurden intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den COOR- bzw. OCH₃-Gruppen und den Amid-NH-Wasserstoffatomen nachgewiesen, die zu starreren Makrocyclen und damit einer besseren Präorganisation des Hohlraums zur Substratbindung führten.^[47] Im Lösungsmittel DMSO-d₆ konnte ich für die Amid-NH-Gruppen von **94** eine chemische Verschiebung von 14,8 ppm im ¹H-NMR-Spektrum beobachten. Dies ist eine ungewöhnlich hohe Resonanz für solche Protonen, insbesondere, wenn man berücksichtigt, daß die analogen Gruppen im Spektrum von **41** eine chemische Verschiebung von 10,2 ppm besitzen. In Analogie zu den in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Ergebnissen meiner Untersuchungen zu intramolekularen Wasserstoffbrücken in solchen Cyclopeptiden kann man also annehmen, daß auch die Amid-NH-Gruppen von **94** an intramolekularen Wasserstoffbrücken zu Carboxylatgruppen beteiligt sind. Dadurch sollte die Flexibilität von **94** im Vergleich zu **41** herabgesetzt sein und **94** könnte dadurch eine größere Affinität zu geeigneten

Substraten zeigen. Bei den regioisomeren Rezeptoren 5 und 107 konnte ich die positive Auswirkung einer geringeren konformativen Flexibilität auf die Affinität gegenüber Kohlenhydraten bzw. Guanidiniumionen bereits zeigen.

Als Lösungsmittel für diese Untersuchungen wählte ich Methanol- d_4 . Die Veränderungen der Signallagen im NMR-Spektrum eines Gemisches von rac-127⁺ und 41 im Vergleich zu den Spektren der Reinsubstanzen waren vielversprechend. Alle Signale des Ammoniumions zeigten ausgeprägte Hochfeldshifts von bis zu 0,29 ppm für das CH-Proton des stereogenen Kohlenstoffatoms, was wiederum als ein eindeutiger Hinweis gewertet werden kann, daß das Ammoniumion in der Cavität des Rezeptors in die Nähe der aromatischen Gruppen gelangt.^[92,93] Außerdem zeigte das Substrat nach Zugabe von 41 zwei Signalsätze im NMR-Spektrum, was die Bildung diastereomerer Komplexe beweist. Um zuzuordnen, welcher Signalsatz zu welchem Komplex gehört, untersuchte ich auf die gleiche Art eine äquimolare Mischung des Rezeptors 41 mit dem enantiomerenreinen Substrat S-127⁺. Abb. 2.38 zeigt eindeutig, daß die Protonen dieses Enantiomeren durch die Komplexbildung die kleineren Hochfeldshifts erfahren.

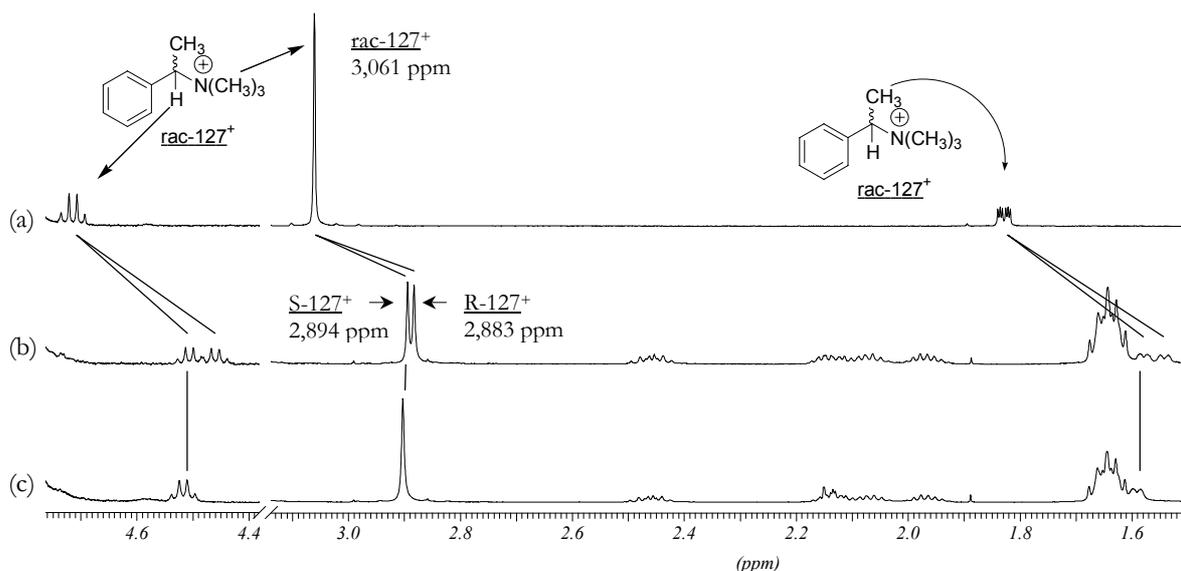


Abb. 2.38 Stack-Plot der ¹H-NMR-Spektren von rac-127⁺ (a), einer äquimolaren Mischung aus 41 und rac-127⁺ (b) und einer äquimolaren Mischung aus 41 und S-127⁺ (c). Lösungsmittel: Methanol- d_4 , alle Konzentrationen: 0,5 mmol/l. Am Beispiel des Signals der Trimethylammoniumgruppe von rac-127⁺ ist die Aufspaltung der Signale der Enantiomere durch die Komplexbildung verdeutlicht.

Ein sehr ähnliches Bild ergaben auch analoge Untersuchungen mit dem Rezeptor 94. Beide Rezeptoren bilden also Komplexe mit 127⁺ in Methanol- d_4 , wobei bei Verwendung des racemischen Substrats diastereomere Komplexe gebildet werden, die im ¹H-NMR-Spektrum unterscheidbar sind.

In gepuffertem D₂O mit einem pD-Wert von 7,2 konnte dagegen keine Wechselwirkung der beiden Rezeptoren mit dem Ammoniumion 127⁺ beobachtet werden.

Um zu untersuchen, ob sich die molekulare Erkennung chiraler Substrate auch enantioselektiv ist, existieren zwei Methoden. Einerseits kann man die Assoziationskonstanten beider diastereomerer Komplexe unabhängig voneinander in zwei Titrationsbestimmungen und dann mit Hilfe des Verhältnisses K_R/K_S Aussagen zur Enantioselektivität erhalten. Ein Problem tritt bei diesem Verfahren dann auf, wenn sich die Assoziationskonstanten der diastereomeren Komplexe nicht allzu stark unterscheiden, da auch bei guter Reproduzierbarkeit der Fehler nicht unerheblich sein kann.

Die andere Möglichkeit ist, die Assoziationskonstante für ein Enantiomer (und mit ihr den zugehörigen Wert für $\Delta\delta_{\max}$) in einer Wirt-Gast-Titration zu bestimmen und in einer kompetitiven Titration mit dem Racemat als Substrat das Verhältnis der Assoziationskonstanten K_R/K_S zu ermitteln. Die Untersuchungen von Heinrichs mit den Rezeptoren vom Typ 7 in Chloroform zeigten, daß beide Methoden gut übereinstimmende Ergebnisse liefern.^[132] Um jedoch einen zufälligen Fehler möglichst auszuschließen, wählte ich die Methode der kompetitiven Titration für meine Untersuchungen.

In einer solchen Titration mit dem Racemat des Substrats liegen zwei konkurrierende Komplexierungsgleichgewichte vor (Gl. 4/5).



Mit R = Rezeptor, S_1 und S_2 = Enantiomere des Substrats, $K_{a1/d1}$ und $K_{a2/d2}$ = Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten der entsprechenden Komplexe K_1 und K_2 .

Die beiden verschiedenen Assoziationskonstanten K_{a1} und K_{a2} sind nach dem Massenwirkungsgesetz wie folgt definiert (Gl. 6/7).

$$K_{a1} = \frac{[K_1]}{[R][S_1]} \quad K_{a2} = \frac{[K_2]}{[R][S_2]} \quad \text{Gl. 6/7}$$

Da den beiden Komplexen auch verschiedene Werte für $\Delta\delta_{\max}$ zugeordnet werden müssen, sind also insgesamt vier Unbekannte (K_{a1} , K_{a2} , $\Delta\delta_{\max1}$ und $\Delta\delta_{\max2}$) zu bestimmen. Löst man alle erforderlichen Gleichungen auf, erhält man einen Ausdruck, der als Variablen das Verhältnis der Bindungskonstanten K_{a1}/K_{a2} und die beiden Werte für $\Delta\delta_{\max}$ enthält.^[136,137] Bestimmt man in einer weiteren Titration mit einem der Enantiomere des Substrats die Assoziationskonstante und das zugehörige $\Delta\delta_{\max}$ für den Komplex mit diesem Enantiomer, so kann man dieses bekannte $\Delta\delta_{\max}$ in die Auswertung der kompetitiven Titration einbeziehen. Die nicht-lineare Regression liefert dann den Wert für das zweite $\Delta\delta_{\max}$ und das Verhältnis der beiden Assoziationskonstanten.

Zunächst habe ich die Assoziationskonstante und das $\Delta\delta_{\max}$ für den Komplex aus Rezeptor 41 und Substrat S-127⁺ in einer Wirt-Gast-Titration bestimmt.^[138] In Abb. 2.39 sind Titra-

tionskurve und Job-Plot für diesen Komplex abgebildet. Er besitzt eine Assoziationskonstante von 9940 M^{-1} und wie erwartet eine 1:1-Stöchiometrie.

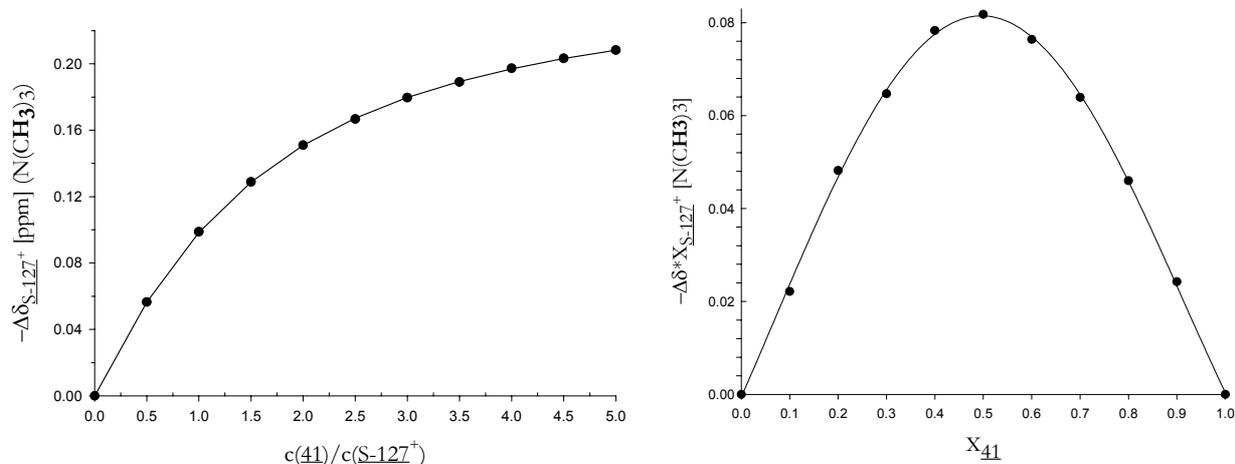


Abb. 2.39 Wirt-Gast-Titration (links) und Job-Plot (rechts), erhalten mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie für den Komplex $41@S-127^+$. Verfolgt wurde während der Messungen das Signal der Trimethylammoniumgruppe. Lösungsmittel: Methanol- d_4 . Interner Standard: TMS.

In einer kompetitiven Titration mit dem Racemat rac-127^+ und Rezeptor 41 konnte ich das Verhältnis der Assoziationskonstanten K_R/K_S und den Wert für $\Delta\delta_{\text{max}}$ vom Komplex mit dem R-Enantiomeren erhalten. Das Ergebnis dieser Titration ist in Abb. 2.40 zu sehen. Zur Veranschaulichung des Titrationsverlaufes ist hier ein Stack-Plot aller zur Titration gehörenden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren dargestellt und die daraus erhaltene Titrationskurve abgebildet.

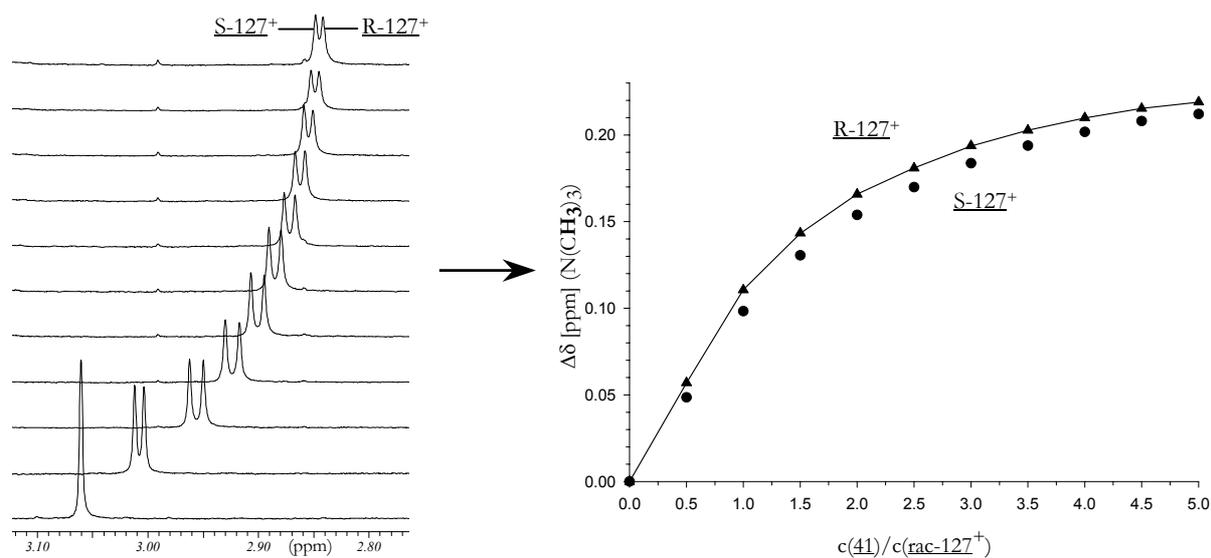


Abb. 2.40 Kompetitive Wirt-Gast-Titration von Rezeptor 41 mit dem Racemat rac-127^+ . Beobachtet wurde das Signal der $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe. Links: Stack-Plot der NMR-Spektren, rechts: daraus gewonnene Titrationskurven, Dreiecke: R-127^+ , Kreise: S-127^+ , Kurve: Ergebnis der nicht-linearen Regression.

Das R-Enantiomer (vergleiche Abb. 2.38) zeigt im Verlauf der Titration in der stärker gekrümmte Kurve den größeren Signalshift. Die stärkere Krümmung äußert sich entsprechend in einer höheren Assoziationskonstante des Komplexes von 41 mit diesem Enantiomer. Das Verhältnis K_R/K_S beträgt 1,22. Eine Enantioselektivität ist also vorhanden. Die $\Delta\delta_{\max}$ -Werte für beide Komplexe sind fast identisch, weshalb beide Titrationskurven im weiteren Verlauf der Titration wieder näher beieinander liegen und sich asymptotisch nahezu dem gleichen Wert annähern.

Die aus diesen Untersuchungen erhaltenen Werte und die Ergebnisse der analogen Titrations für Rezeptor 94 sind in Tabelle 2.5 zusammengefaßt.

Rezeptor	Substrat	K_a [M^{-1}]	$\Delta\delta_{\max}$ [ppm]	K_R/K_S ^{a)}	K_a (ber.) ^{a)}	%d.e. ^{a)}
<u>41</u>	<u>S-127</u> ⁺	9.940	-0,26 (N(CH ₃) ₃)	1,22	12.130	10
	<u>rac-127</u> ⁺					
	<u>R-127</u> ⁺		-0,26 (N(CH ₃) ₃) ^{a)}			
<u>94</u>	<u>S-127</u> ⁺	14.900	-0,30 (N(CH ₃) ₃)	1,26	18.780	12
	<u>rac-127</u> ⁺					
	<u>R-127</u> ⁺		-0,29 (N(CH ₃) ₃) ^{a)}			

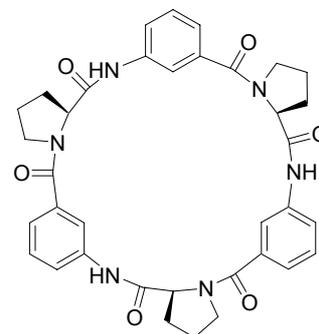
Tab. 2.5 Ergebnisse der Wirt-Gast-Titrations der regioisomeren Rezeptoren 94 und 41 mit den Enantiomeren des quaternären Ammoniumions 127⁺. Lösungsmittel: Methanol-d₄. a) Die Werte stammen aus den kompetitiven Titrations, K_a (ber.) wurde durch Multiplikation der Assoziationskonstanten für die Komplexe mit dem S-Enantiomer mit dem Faktor K_R/K_S erhalten.

Die Rezeptoren 94 und 41 bilden mit dem chiralen Ammoniumion 127⁺ in dem polaren Lösungsmittel Methanol-d₄ also Komplexe mit recht hohen Assoziationskonstanten. Dabei ist die von Heinrichs bei ähnlichen Verbindungen allerdings in weniger kompetitiven Lösungsmitteln beobachtete Enantioselektivität erhalten geblieben. Nicht unerwartet bevorzugen die von mir untersuchten Rezeptoren wie die von Heinrichs verwendeten Derivate ebenfalls das R-Enantiomer des Substrats. Die Diastereomerenüberschüsse sind zwar noch relativ klein, liegen aber in der gleichen Größenordnung wie die von Heinrichs für 7a-d bestimmten Werte. Im Vergleich der regioisomeren Rezeptoren 94 und 41 fällt auf, daß das Cyclopeptid mit Aminoterephthalsäureeinheiten das Substrat deutlich besser bindet. Dies ist anscheinend eine Folge der größeren konformativen Rigidität aufgrund intramolekularer Wasserstoffbrücken, die auch in dem kompetitiven Lösungsmittel Methanol-d₄ noch eine Rolle zu spielen scheinen. Die Enantioselektivität ist jedoch bei beiden Rezeptoren annähernd gleich groß ausgeprägt. Offensichtlich beeinflußt hier die Stellung der Carboxylatgruppen an den aromatischen Untereinheiten die Enantioselektivität der Cyclopeptide 94 und 41 nicht stark, wohl aber ihre Affinität.

3. Zusammenfassung und Ausblick

In unserer Arbeitsgruppe entwickeln wir künstliche Rezeptoren, denen ein makrocyclisches Peptidgerüst gemeinsam ist.

Ziel meiner Arbeit war es, auf Basis des Grundgerüsts **3**, das in alternierender Sequenz aus einer natürlichen α -Aminosäure und einer aromatischen γ -Aminosäure besteht, substituierte Derivate zu synthetisieren und ihre Rezeptoreigenschaften zu untersuchen. Dabei sollten sich die Substituenten an den aromatischen Cyclopeptiduntereinheiten befinden, wodurch sie um den Hohlraum des Cyclopeptids angeordnet wären und sich so an der Gastbindung beteiligen könnten.

**3**

Darüber hinaus sollten sie sich von Aminosäuren ableiten, um funktionelle Gruppen als Bindungsstellen ausnutzen zu können, die auch in der Natur zur molekularen Erkennung dienen. Eine möglichst große Flexibilität bei der Rezeptorsynthese sollte durch Verwendung von Cyclopeptidgrundstrukturen erreicht werden, an die auf einfache, modulare Art und Weise diese Aminosäurereste gebunden werden können.

Das erste Cyclopeptidderivat **4** (Abb. 3.1), das ich in diesem Zusammenhang verwendete, konnte ich bereits während meiner Diplomarbeit in einer 16-stufigen Synthese darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, die Synthese zu optimieren. Insbesondere konnte ich die Ausbeute der Makrocyclisierung von anfangs 23% auf 50% steigern. Peptid **4** trägt in 5-Position der aromatischen Cyclopeptiduntereinheiten freie Carboxylgruppen, an die weitere Aminosäuren amidisch angeknüpft werden können. Ausgehend von **4** synthetisierte ich drei Derivate mit Asparaginsäure- bzw. Glutaminsäuresubstituenten. Alle drei Verbindungen besitzen jeweils drei Carboxylatgruppen entlang der Ringe und unterscheiden sich im wesentlichen in der Stellung der Carboxylatgruppen (z.B. in ihrem Abstand) zum Zentrum des Rings. **5**, **6** und **34** wurden von mir in Gesamtausbeuten (alle über je 21 Stufen) von ca. 10% synthetisiert.

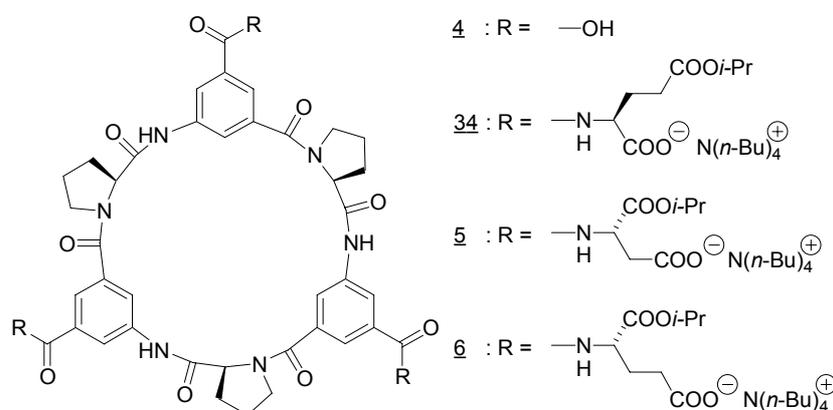


Abb. 3.1: Die Tricarbonsäure **4** stellt den zentralen Grundbaustein für eine Familie von Rezeptoren dar. **5**, **6**, und **34** wurden durch Kupplung von **4** mit geeigneten Aminosäurederivaten im Grammaßstab erhalten.

Untersuchungen zur bevorzugten Konformation dieser Verbindungen ergaben, daß die Flexibilität der peripheren Substituenten in allen drei Fällen durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den Carboxylatgruppen und den jeweils benachbarten NH-Gruppen im selben Substituenten eingeschränkt ist.

Diese Cyclopeptide sollten als Rezeptoren für Kohlenhydrate und Guanidiniumderivate, also Verbindungen, deren Wechselwirkungen mit natürlichen Rezeptoren ebenfalls im wesentlichen auf Wasserstoffbrückenbindungen zu Carboxylaten zurückzuführen ist, dienen.

Im Falle der Kohlenhydratkomplexierung konnte ich zeigen, daß alle drei Rezeptoren verschiedene Monosaccharide mit Assoziationskonstanten von bis zu 800 M^{-1} in dem recht kompetitiven Lösungsmittel Chloroform/Methanol (96:4) binden. Eine Vorstellung über mögliche Komplexstrukturen gaben Molecular-Modeling-Studien (siehe Abb. 3.2). Das Monosaccharid kann vom Rezeptor eingeschlossen und durch Wasserstoffbrücken gebunden werden. Der Abstand der Carboxylatgruppen vom Hohlraum der Rezeptoren hat einen entscheidenden Einfluß auf die Rezeptorselektivität. In der Reihenfolge α -, β - und γ -Carboxylat wird ein Maximum für die Stärke der Monosaccharidbindung durchlaufen. Außerdem ist eine Selektivität aller drei Rezeptoren für Hexosen gegenüber einer Pentose vorhanden.^[90,91]

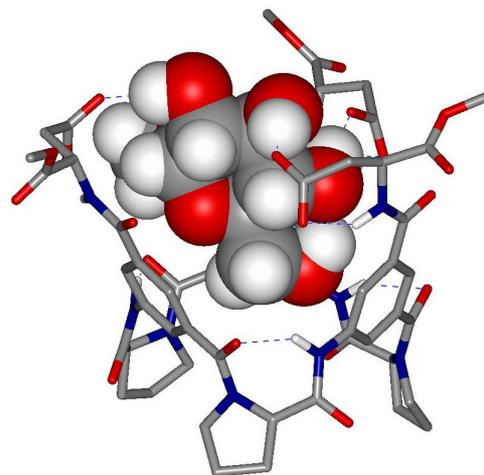
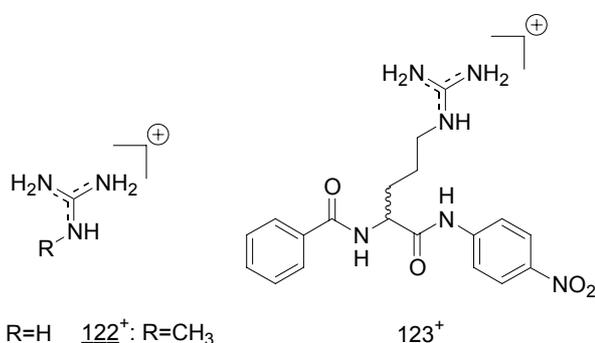


Abb. 3.2: Komplex aus 5 (Stäbchen) und dem Methyl- α -D-glucopyranosid.

Bei der Komplexierung von Guanidiniumionen besteht eine hohe Affinität von 5 zu dem unsubstituierten Kation 121⁺, die sich in einer Assoziationskonstante von 52.000 M^{-1} in DMSO- d_6 für diesen Komplex ausdrückt. Dieses Substrat besitzt wie der Rezeptor eine C_3 -



Achse und wird deshalb sehr effektiv von drei Seiten durch die Carboxylatgruppen des Rezeptors gebunden, wie Molecular-Modeling-Studien zeigten. Das substituierte Methylguanidiniumion 122⁺ wird schlechter gebunden. Das Arginin-derivat 123⁺ wird allerdings zusätzlich zu den Guanidinium-Carboxylat-

Wasserstoffbrücken durch weitere Wasserstoffbrücken zwischen den funktionellen Gruppen des Substrats und den Peptidgruppen im Cyclopeptidring sowie wahrscheinlich durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden. Dies führt dazu, daß 123⁺ sogar in hochkompetitiven Lösungsmitteln wie einer gepufferten wäßrigen Lösung von 5 komplexiert

wird, während das Methylguanidiniumion darin nicht gebunden werden kann. Eine mögliche Komplexstruktur, die mit allen experimentellen Daten in Einklang steht, zeigt Abb. 3.3. Leider konnte eine Enantioselektivität bei der Arginin-komplexierung nicht festgestellt werden, obwohl die diastereomeren Komplexe, die bei der Bindung der Enantiomeren von 123^+ gebildet werden, im $^1\text{H-NMR}$ an ihren chemischen Verschiebungen eindeutig zu unterscheiden sind.^[119]

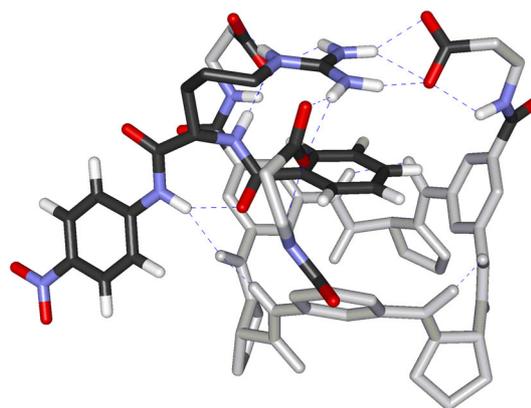
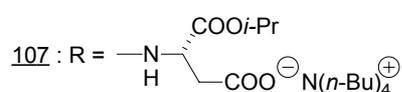
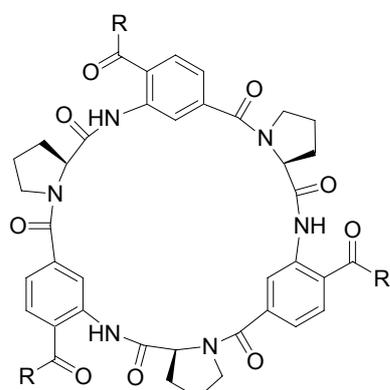


Abb. 3.3: Komplex aus $\underline{5}$ (teilweise hellgrau) und dem Argininderivat $L\text{-}123^+$.

Zur Veränderung der Rezeptoreigenschaften dieser Rezeptoren versuchte ich, die peripheren Substituenten durch Aminophosphonsäuren oder teilweise durch Tryptophan zu ersetzen. Solche Cyclopeptidderivate konnten aber nicht erfolgreich synthetisiert werden.

Um den leistungsfähigsten von mir dargestellten Rezeptor $\underline{5}$ zu optimieren, synthetisierte ich das Regioisomer $\underline{107}$. Seine aromatischen Carboxylatgruppen befinden sich in 4-Position und sind mit Aspartatresten substituiert. Dadurch sollte Rezeptor $\underline{107}$ besser zur Substratbindung



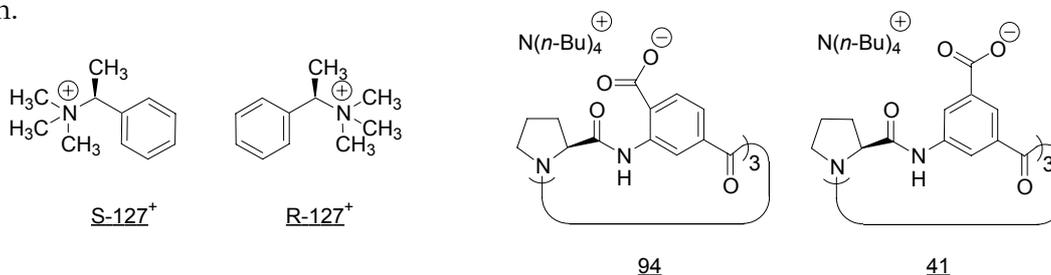
präorganisiert sein, denn vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, daß Carboxylgruppen in 4-Position der aromatischen Cyclopeptiduntereinheiten den Makrocyclus durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zu den aromatischen NH-Gruppen konformativ stabilisieren. Verbindung $\underline{107}$ konnte nur mit Hilfe einer sequentiellen Synthese erhalten werden. Wie erwartet ist seine Affinität zu Kohlenhydraten höher als die von $\underline{5}$. So wird Methyl- α -D-galactopyranosid mit einer Assoziationskonstante von 1350 M^{-1} gebunden. Ebenfalls erhöht ist die Selektivität von $\underline{107}$ im Vergleich zu $\underline{5}$ sowohl bei der Komplexierung isomerer Hexosen als auch bei der Bevorzugung von Hexosen im Vergleich zu einer Pentose.

Rezeptor $\underline{107}$ zeigte im Vergleich zu $\underline{5}$ auch eine höhere Affinität zu dem Argininderivat 123^+ in Methanol- d_4 . Interessanterweise konnte ich in diesem Fall sogar Anzeichen für eine enantioselektive Erkennung feststellen.

In diesen Arbeiten habe ich somit eine neue Klasse substituerter Cyclopeptide entwickelt, die Monosaccharide, also im allgemeinen Vergleich schwer zu komplexierende Substrate, in Chloroform-Methanol-Gemischen und Argininderivate sogar in Wasser binden.

In letztem Teil der Arbeit habe ich die enantioselektive Komplexierung quaternärer Ammo-

niumionen untersucht. In unserer Arbeitsgruppe ist kürzlich gezeigt worden, daß neutrale Cyclopeptide mit Substituenten in 4-Position der aromatischen Untereinheiten das Kation 127^+ in Chloroform enantioselektiv binden.^[132] Um diese Eigenschaft in ein kompetitives Lösungsmittel zu übertragen, synthetisierte ich die beiden regioisomeren Cyclopeptide **94** und **41**, die Carboxylatgruppen in 4- bzw. in 5-Position an den aromatischen Untereinheiten tragen.



In Methanol erhielt ich Assoziationskonstanten von bis zu 19.000 M^{-1} für den Komplex $94@R-127^+$. Auch in diesem Fall besitzt der Rezeptor mit den Substituenten in 4-Position an den aromatischen Untereinheiten die größere Affinität und Selektivität zu den untersuchten Substraten, da er besser präorganisiert ist. Von beiden Rezeptoren werden die beiden Enantiomere von 127^+ unterschiedlich stark gebunden. Die Komplexierung ist also enantioselektiv. Der Diastereomerenüberschuß beträgt 10% für Rezeptor **41** und 12% für Rezeptor **94**, wobei beide Rezeptoren in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die neutralen Cyclopeptide das R-Enantiomer des Substrats bevorzugen. Die beiden Tricarboxylate sind damit die ersten künstlichen Rezeptoren, die ein chirales, quaternäres Ammoniumion in einem kompetitiven Lösungsmittel enantioselektiv komplexieren.

In Zukunft sollen die von mir entwickelten Rezeptoren strukturell verändert und dadurch ihre Eigenschaften verbessert werden. So werden momentan Rezeptoren synthetisiert, die Boronsäuren anstelle der Carboxylatgruppen enthalten, wodurch sie Monosaccharide auch in wäßrigen Medien binden sollen. Eine Affinitäts- und idealerweise Selektivitätssteigerung bei der Substratbindung könnte durch eine weitere Verminderung der Flexibilität der Rezeptoren, möglicherweise durch kovalente Verbrückungen, erreicht werden. Hier muß jedoch abgewogen werden, ob der abzusehende erhebliche Syntheseaufwand in einem sinnvollen Verhältnis zu den erwarteten Verbesserungen der Rezeptoreigenschaften steht.

In letzter Zeit wird immer häufiger Gebrauch von dynamischen-kombinatorischen Bibliotheken zur Optimierung von Rezeptorstrukturen gemacht. Hier wäre es denkbar, aus einem zentralen Baustein und geeigneten Seitengruppen eine dynamische Rezeptorbibliothek zu erzeugen. Ähnlich den Untersuchungen von Sanders,^[13] die auf den Rezeptoreigenschaften von Kubiks Cyclopeptiden aufbauten, könnte hierzu z.B. die Bildung von Hydrazonen aus einem cyclischen Trialdehyd (anstelle der Tricarbonsäure **4**) und substituierten Hydraziden (anstelle der Seitenaminosäuren) genutzt werden. In Anwesenheit eines Substrats sollte sich das Gleichgewicht der Rezeptorbibliotheken auf die Seite des besten Rezeptors verschieben. So könnte man natürlich auch zu leistungsfähigeren Kohlenhydrat- oder Argininrezeptoren kommen und das in dieser Arbeit gefundene Potential substituierter Cyclopeptide bei der Bindung solcher Substrate weiter nutzen.

4. Experimenteller Teil

4.1 Apparatives

¹ H-NMR-Spektroskopie	Bruker Avance DRX 200 (200 MHz) Varian VXR 300 (300 MHz) Bruker Avance DRX 500 (500 MHz)
¹³ C-NMR-Spektroskopie	Bruker Avance DRX 500 (125 MHz) Varian VXR 300 (75 MHz)
³¹ P-NMR-Spektroskopie	Bruker Avance DRX 200 (81 MHz)
IR-Spektroskopie	Bruker Vektor 22 FT-IR Nicolet FT-IR-5SXB
CD-Spektroskopie	JASCO J-600 Spektralpolarimeter
Fluoreszenzspektroskopie	JASCO FP-6200 Spektrofluorometer
C,H,N-Elementaranalyse	Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Massenspektrometrie	CI (NH ₃): Finnigan INCOS 50 FAB: Varian MAT 8200 ESI: Bruker Esquire 3000
Polarimeter	Perkin Elmer 241 MC digital, d = 10 cm
Schmelzpunktbestimmung	Büchi 510, Büchi Melting Point B-545
Säulenchromatographie	Kieselgel 60 (230-400 Mesh ASTM) von Merck
Dünnschichtchromatographie	Kieselgel 60 F ₂₅₄ auf Aluminiumfolie (Merck) RP-18 F ₂₅₄ auf Glasträger (Merck)
Dosierung	Hamilton, gasdichte Spritzen Infors AG, Perfusor Precidor HAT
Turbomolekularpumpe	Leybold PT50

4.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Acros:	Benzylalkohol Palladium auf Aktivkohle (10%) Palladium(II)-chlorid
Aldrich:	Allylbromid DIEA 4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)phenyldiphenylphosphin Kaliumhexafluorophosphat Methanol-d ₄ , 99,95 atom% D Octyl- β -D-glucoopyranosid Tetrabutylammoniumhydroxidlösung 1M in Methanol Triphosgen
Bachem:	D-BAPA L-BAPA TBTU
Cerestar:	Octyl- α -D-glucoopyranosid
Euriso-top:	Chloroform-d ₁ , 99,8 atom-% D D ₂ O, 99,9 atom-% D DMSO-d ₆ , 99,9 atom-% D Methanol-d ₄ , 99,8 atom-% D
Fluka:	Aminoterephthalsäure, z.S. Celite® FilterCel DCC Isopropanol, p.A. Kaliumhydrogensulfat Methyl- α -D-glucoopyranosid Methyl- β -D-glucoopyranosid Methyl- α -D-mannopyranosid 4-Methylmorpholin Salzsäure, rauchend (37%), p.A. Trifluoressigsäure Trimethylphosphit

Lancaster	Isobutylchlorformiat 2-Mercaptopyridin-N-oxid Methyl- α -D-galactopyranosid
Merck:	5-Aminoisophthalsäure, z.S. Benzylbromid Boc ₂ O Bromtrichlormethan Cäsiumcarbonat DMF, p.A. Natriumcarbonat, wasserfrei p.A. Natriumhydrogencarbonat, wasserfrei Pyrrolidin
Messer-Griesheim	Argon 5.0 Stickstoff 5.0 Wasserstoff 5.0
Novabiochem:	alle zur Synthese verwendeten α -Aminosäuren
Riedel-de-Haën:	Phosphoroxidchlorid
Sigma:	Methylguanidinhydrochlorid Methyl- β -D-ribofuranosid Octyl- β -D-galactopyranosid

Das Kupplungsreagenz PyCloP wurde nach einer Vorschrift von Coste, Frérot und Jovin hergestellt.^[48,49]

Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch durch Destillation gereinigt, bei Bedarf nach den literaturbekannten Standardmethoden getrocknet und durch einstündiges Einleiten von Argon 5.0 entgast.

Für Allylesterspaltungen wurde der Katalysator p-DMDPd verwendet, den ich bereits während meiner Diplomarbeit entwickelt habe.^[45]

4.3 Wirt-Gast-Experimente

4.3.1 NMR-Spektroskopie

Alle Komplexierungsversuche wurden am Bruker DRX 500 (500 MHz) NMR-Spektrometer durchgeführt und die Proben jeweils mit 265 Pulsen bei 298 K vermessen.

Untersuchung der Wechselwirkungen

Um grundsätzlich festzustellen, ob eine Wechselwirkung zwischen Wirt und potentiellm Gast stattfindet, wurden jeweils drei Lösungen angesetzt: die erste enthielt reinen Wirt, die zweite Wirt und Gast im Stoffmengenverhältnis 1:1 und die dritte reinen Gast. Die Konzentrationen waren jeweils in allen drei Lösungen gleich und betragen je nach verfügbaren Substanzmengen 0,5 oder 1 mM. Die Proben wurden jeweils NMR-spektrometrisch vermessen und die Spektren auf Hinweise für eine Komplexierung analysiert.

Wirt-Gast-Titrations^[67,70]

Zwei Stammlösungen wurden für jede NMR-Titration angesetzt: Eine mit dem jeweiligen Gast (0,1 $\mu\text{mol/ml}$), die andere mit dem zugehörigen Wirt. Insgesamt wurden 11 NMR-Proben vorbereitet, indem eine größer werdende Menge Wirtlösung (0-800 μl in Schritten von 80 μl) zu jeweils 100 μl Gastlösung gegeben wurde. Alle Proben wurden auf ein Volumen von 1 ml mit reinem Lösungsmittel aufgefüllt. Die Konzentrationen der Wirtstammlösungen wurden so gewählt, daß immer bis zu der gewünschten maximalen Anzahl von Wirtäquivalenten titriert werden konnte. Diese Konzentrationen sind hier nach Gästen sortiert aufgeführt:

Gäste	Lösungsmittel	Wirtkonzentration (Stammlösung)	Äquivalente Wirt	
Monosaccharide	CDCl_3 / 4% MeOD	2 $\mu\text{mol}/800 \mu\text{l}$	0-20	
Guanidiniumionen	alle	DMSO- d_6	0,5 $\mu\text{mol}/800 \mu\text{l}$	0-5
	MeGHCl	CD_3OD	1 $\mu\text{mol}/800 \mu\text{l}$	0-10
	L/D-BAPA	CD_3OD	0,75 $\mu\text{mol}/800 \mu\text{l}$	0-7,5
	alle	D_2O -Puffer (pD = 7,2)	1,5 $\mu\text{mol}/800 \mu\text{l}$	0-15
<u>R/S/rac-127⁺ I⁻</u>	CD_3OD	0,5 $\mu\text{mol}/800 \mu\text{l}$	0-5	

Bei den Titrationsen, bei denen Monosaccharide untersucht wurden, löste man zunächst Wirt und Gast in der berechneten Menge CD_3OD im Ultraschallbad. Dann wurde so mit CDCl_3 aufgefüllt, daß die fertigen Stammlösungen 4% CD_3OD enthielten.

Zur Auswertung wurden stets möglichst scharfe und über den ganzen Bereich der Titration verfolgbare NMR-Signale der Gäste herangezogen. Die Bestimmung der Stabilitätskonstanten aus den $\Delta\delta_{\text{max}}$ -Werten erfolgte durch nicht-lineare Regression der erhaltenen Titrationskurven mit dem PC-Programm Sigma-Plot 3.0.

Job-Plots^[66-68]

Es wurden äquimolare Lösungen von Wirt und Gast ($1 \mu\text{mol/ml}$) im entsprechenden Lösungsmittel angesetzt. Damit wurden 10 Proben vorbereitet, in dem kleiner werdende Volumina der Gastlösung (1 bis 0,1 ml) mit der Wirtlösung auf jeweils 1 ml aufgefüllt wurden. Die Gesamtkonzentration von Wirt und Gast war somit konstant, nur der Molenbruch des Gastes variierte bei Aufnahme der NMR-Spektren von $X = 1$ bis $X = 0,1$ (Methode der kontinuierlichen Variation).

4.3.2 CD-Spektroskopie

Alle CD-Spektren wurden mit dem JASCO J-600 Spektralpolarimeter aufgenommen und mit MS Excel und SigmaPlot ausgewertet.

Wirt-Gast-Titrationsen

Bei den CD-Titrationsen wurden Veränderungen in den Spektren des Cyclopeptids verfolgt. Dessen Konzentration wurde konstant gehalten und die des Monosaccharides (von 0 bis 60 Äquivalenten bezogen auf den Wirt) variiert. 11 Proben wurden aus $100 \mu\text{l}$ der Stammlösung des Cyclopeptids ($0,05 \mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$) und ansteigenden Mengen ($0-900 \mu\text{l}$) der Stammlösung des Monosaccharids ($3 \mu\text{mol}/900 \mu\text{l}$) angesetzt und gegebenenfalls mit reinem Lösungsmittel auf 1 ml aufgefüllt. Nach Kalibrierung des Spektrometers mit einer Kampfersulfonsäurelösung wurde das CD-Spektrum des verwendeten reinen Lösungsmittels aufgenommen und zur Normierung aller weiteren Spektren numerisch von diesen abgezogen. Alle Messungen fanden unter folgenden Bedingungen statt: Meßzellenlänge $0,05 \text{ cm}$; Startwellenlänge 290 nm ; Zielwellenlänge 255 nm ; Auflösung $0,1 \text{ nm}$; Empfindlichkeit 20 mdeg ; Response 16 s ; Band Width $1,0 \text{ nm}$; Accumulation 1.

4.3.3 ESI-Massenspektrometrie

Um die Komplexbildung der Argininderivate mit Hilfe der ESI-Massenspektrometrie zu untersuchen, wurden äquimolare Lösungen der Konzentration 0,1 mM von Rezeptor 5 und den Substraten L- bzw. D-BAPA in Methanol angesetzt und im negativen Modus vermessen.

4.4 Allgemeine Arbeitsweisen

Abspalten der Boc-Schutzgruppe

Trifluoressigsäure. Methode I:

Das Boc-geschützte Peptid oder die Aminosäure wurde in 10 ml trockenem CH_2Cl_2 gelöst und mit einem Eisbad abgekühlt. Dann wurden 10 ml TFA langsam zugetropft und man ließ noch 1,5 h in der Kälte rühren. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und zweimal mit Na_2CO_3 -Lösung (10%) sowie dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet, mit 1,1 Äquivalenten konz. HCl versetzt und im Vakuum zur Trockene eingengt. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

HCl in Dioxan. Methode II:

Das Boc-geschützte Peptid oder die Aminosäure wurde in 1,4-Dioxan (20 ml/mmol) gelöst oder suspendiert. Die Lösung wurde unter kräftigem Rühren mit einem Magnetrührer im Eisbad abgekühlt und tropfenweise mit einer 6N Lösung von HCl in 1,4-Dioxan (40 ml/mmol) versetzt. Nach 2 h Rühren in der Kälte wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Diethylether gerührt und das so von Dioxanresten befreite Produkt abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Abspalten der Allylschutzgruppe

Methode III:

Der Ester wurde in einen Schlenkkolben eingewogen, dreimal sekuriert und danach in getrocknetem und entgastem THF gelöst (20 ml/mmol). Der Katalysator p-DMDPd (10 mg) und Morpholin (2 Äquivalente) wurden im Schutzgasgegenstrom zu der Lösung gegeben. Nach 30 min Rühren wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigsäureethylester gelöst und die organische Phase dreimal mit 4N HCl und dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung mit MgSO_4 konnte das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet werden.

Abspalten der Benzylschutzgruppe

Methode IV:

Der Ester wurde in CH₂Cl₂ / Methanol 1:1 (300 ml/mmol) gelöst. Nach Zugabe von 100 mg Pd/C (10%) wurde die Mischung unter Normaldruck für 2 h in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach DC-Kontrolle des Umsatzes wurde der Katalysator zuerst über eine Glasfritte (Pore 4) und dann mit Hilfe eines Membranfilters abfiltriert. Das Filtrat wurde zur Trockene eingengt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Synthese von Tetra-*n*-butylammoniumcarboxylaten

Methode V:

Die Carbonsäure wurde in trockenem Methanol (300 ml/mmol) gelöst. Es wurden pro Carbonsäuregruppe 1,0 Äquivalente einer Lösung von Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid in Methanol (1,0 M) zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt im Vakuum einer Turbomolekularpumpe getrocknet.

4.5 Synthesen von Peptiden mit 5-Aminoisophthalsäure

4.5.1 Synthese des Cyclopeptids *cyclo*-[Pro-5-AIS(OBn)]₃ (**22**)

Darstellung von Boc-5-AIS(OH)-OH (**10**)

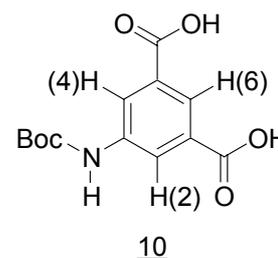
18,12 g (0,10 mol) 5-Aminoisophthalsäure wurden in 200 ml 1N Natronlauge gelöst und im Eisbad abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde eine Mischung aus 24,0 g (0,11 mol) Boc₂O und 200 ml Dioxan innerhalb von 2 h zugetropft. Man ließ noch 3 h in der Kälte und danach über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionsmischung wurde dann im Vakuum auf ca. 160 ml eingengt, im Eisbad abgekühlt und mit einer Lösung von 27,2 g (0,20 mol) KHSO₄ in 100 ml Wasser angesäuert. Der ausfallende Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum über P₄O₁₀ bei 50°C getrocknet.

Ausbeute: 27,55 g (98%)

Smp: >250°C

MS (CI): [M + NH₄⁺] bei m/z = 299, Intensität = 100%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,50 (s, 9H tBu), 8,09 (t, 1H, ⁴J_H = 1,3 Hz, 5-AIS-H(6)), 8,32 (s, 2H, 5-AIS-H(2) + 5-AIS-H(4)), 9,78 (s, 1H, NH), 13,19 (s, b, 2H, 2*COOH)



IR (in KBr): [cm⁻¹] 3345(m), 2994(m), 2937(m), 2645(m), 2574(m), 1699(ss), 1607(m), 1530(s), 1439(m), 1409(m), 1396(m), 1370(m), 1276(ss), 1240(s), 1164(s), 950(w), 908(w), 867(w), 756(w), 695(w)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 54,64%	H: 5,47%	N: 4,90%	C ₁₃ H ₁₅ NO ₆ *0,25 H ₂ O
	gef.:	C: 54,49%	H: 5,47%	N: 4,76%	M = 285,77 g/mol

Darstellung von Boc-5-AIS(OH)-OAlI (**11**)

2,80 g (10,0 mmol) **10** wurden in 50 ml DMF p.A. gelöst. Es wurden 0,84 g (10,0 mmol) NaHCO₃ in der Lösung suspendiert und über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 2,5 ml (30,0 mmol) Allylbromid ließ man erneut über Nacht rühren. Die Reaktionslösung wurde in 250 ml einer Lösung von 2,12 g (20,0 mmol) Na₂CO₃ gegossen und dreimal mit Et₂O extrahiert. Die organischen Phasen wurden verworfen. Die wässrige wurde mit 5,44 g (40,0 mmol) KHSO₄

angesäuert und danach das Produkt durch dreimaliges Waschen mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingengt. Der ölige Rückstand wurde in 200 ml Toluol zum Sieden erhitzt und heiß über Celite[®] filtriert. Nach Vollendung der Kristallisation in der Kälte wurde das Produkt abfiltriert, mit wenig kaltem Toluol gewaschen und im Ölpumpenvakuum bei 50° C getrocknet.

Meist wurde diese Synthesestufe viermal parallel angesetzt und dann gemeinsam aufgearbeitet, da eine Ansatzvergrößerung mit einer Verringerung der Ausbeute einherging.

Ausbeute: 1,1 g (34%)
Smp: Zersetzung bei 163°C
MS (CI): [M + NH₄⁺] bei m/z = 339, Intensität = 100%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,50 (s, 9H, *t*Bu), 4,83 (ddd, 2H, ³J_H = 5,1 Hz, CH₂CH=CH₂), 5,30 (ddt, 1H, ³J_H = 10,8 Hz, ²J_H = 1,6 Hz, CH₂CH=CH₂, *cis*), 5,42 (ddt, 1H, ³J_H = 17,0 Hz, ²J_H = 1,6 Hz, CH₂CH=CH₂, *trans*), 6,01 - 6,10 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 8,10 (s, 1H, 5-AIS-H(6)), 8,36 (s, 2H, 5-AIS-H(2) + 5-AIS-H(4)), 9,83 (s, 1H, NH), 13,28 (s, b, 1H, COOH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3356(m), 3088(m), 2981(m), 2935(m), 2639(m), 1705(ss), 1606(m), 1545(s), 1456(m), 1428(m), 1369(m), 1338(m), 1311(m), 1270(s), 1232(s), 1159(s), 985(m), 931(m), 907(m), 758(m), 702(w), 672(w), 583 (w), 451(w)

C,H,N: ber.: C: 59,81% H: 5,96% N: 4,36% C₁₆H₁₉NO₆
 gef.: C: 60,00% H: 5,77% N: 4,33% M = 321,33 g/mol

Darstellung von Boc-5-AIS(OBn)-OAll (12)

In 50 ml DMF p.A. wurden 1,29 g (4,0 mmol) **11**, 1,01 g (12,0 mmol) NaHCO₃ und 1,5 ml (12,0 mmol) Benzylbromid für 48 h gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung in 120 ml Essigester aufgenommen, zweimal mit 10% NaHCO₃-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Um Reste von Benzylbromid zu entfernen, wurde das Rohprodukt in wenig kaltem *n*-Hexan suspendiert, in der Kälte 5 min gerührt, abfiltriert und zweimal mit wenig kaltem *n*-Hexan gewaschen. Anschließend wurde das Produkt im Ölpumpenvakuum bei 50° C getrocknet.

Ausbeute: 1,33 g (81%)
Smp: 125-127°C
MS (CI): [M + NH₄⁺] bei m/z = 429, Intensität = 100%

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃, TMS) δ [ppm] 1,52 (s, 9H, *t*Bu), 4,83 (ddd, 2H, ³J_H= 5,7 Hz, CH₂CH=CH₂), 5,29 (ddt, 1H, ³J_H= 10,4 Hz, ²J_H= 1,3 Hz, CH₂CH=CH₂, *cis* H), 5,38 (s, 2H, Bn-CH₂), 5,40 (ddt, 1H, ³J_H= 17,0 Hz, ²J_H= 1,3 Hz, CH₂CH=CH₂, *trans* H), 5,98 - 6,07 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 6,73 (s, b, 1H, NH), 7,32-7,46 (m, 5H, Bn-H), 8,24 + 8,30 (2*s, b, 2H, 5-AIS-H(2) + 5-AIS-H(4)), 8,40 (t, 1H, ⁴J_H= 1,6 Hz, 5-AIS-H(6))

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3355(s), 3083(s), 2978(s), 2932(s), 2853(s), 2118(m), 1732(s), 1705(ss), 1628(s), 1607(s), 1544(s), 1454(s), 1427(m), 1389(m), 1367(m), 1342(m), 1317(m), 1271(s), 1234(ss), 1160(s), 999(m), 986(m), 754(m), 733(m), 698(w), 671(w), 652(w), 553(w), 462(w)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 67,14%	H: 6,12%	N: 3,40%	C ₂₃ H ₂₅ NO ₆
	gef.:	C: 66,89%	H: 6,26%	N: 3,18%	M = 411,45 g/mol

Darstellung des Dipeptids Boc-Pro-5-AIS(OBn)-OAlI (14)

Entschützung: Vor der Peptidkupplung wurden 5,04 g (12,2 mmol) 12 nach Methode I (Ausbeute 3,81 g (100%)) Boc-entschützt, jedoch nicht mit HCl behandelt, sondern als freies Amin isoliert.

Peptidkupplung: 3,81 g (12,2 mmol) 13, 3,93 g (18,4 mmol) Boc-Prolin und 7,67 g (18,4 mmol) PyCloP wurden in 260 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 6,35 ml (36,7 mmol) DIEA zugegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Laufmittel: *n*-Hexan/Essigsäureethylester 1:1) gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden zur Trockene eingengt. Das Produkt fiel zunächst als Öl an, erstarrte jedoch im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 6,15 g (99%)
Smp: 118-119°C
[α]_D²⁵: -82,0° (c=1, CHCl₃)

MS (CI): [M + NH₄⁺] bei m/z = 526, Intensität = 100%
[M + H⁺] bei m/z = 509, Intensität = 4%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100°C) δ [ppm] 1,34 (s, 9H, tBu), 1,75 - 1,90 (m, 1H, Pro-H(β)), 1,90 - 2,00 (m, 2H, Pro-H(γ)), 2,13 - 2,31 (m, 1H 3 Pro-H(β)), 3,33 - 3,51 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,24 (dd, 1H, ³J_{H ac} = 4,1 Hz, ³J_{H aa} = 8,3 Hz, Pro-H(α)), 4,83 (ddd, 2H, ³J_H = 5,6 Hz, CH₂CH=CH₂), 5,28 (ddt, 1H, ³J_H = 10,5 Hz, ²J_H = 1,5 Hz, CH₂CH=CH₂, *cis* H), 5,39 (s, 2H, Bn-CH₂), 5,40 (dd, 1H, ³J_H = 17,2 Hz, ²J_H = 1,5 Hz, CH₂CH=CH₂, *trans* H), 6,00 - 6,12 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 7,31 - 7,49 (m, 5H, Bn-H), 8,22 (t, 1H, ⁴J_H = 1,6 Hz, 5-AIS-H(6)), 8,49 + 8,53 (2*t, 2H, 2* ⁴J_H = 1,6 Hz, 5-AIS-H(2) + 5-AIS-H(4)), 10,12 (s, 1H, NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3320(m), 3295(s), 3257(m), 3224(m), 3171(m), 3121(m), 3063(m), 3034(m), 2976(m), 2883(m), 1732(ss), 1699(s), 1665(ss), 1602(m), 1569(s), 1478(s), 1456(s), 1424(ss), 1382(m), 1367(m), 1335(m), 1234(ss), 1163(s), 1139(m), 1110(m), 1091(m), 998(m), 984(m), 922(m), 904(m), 757(s), 733(m), 733(m), 695(m), 621(w), 539(w), 779(w) 462(w) 416(w)

C,H,N: ber.: C: 66,13% H: 6,34% N: 5,51% C₂₈H₃₂N₂O₇
gef.: C: 66,18% H: 6,33% N: 5,51% M = 508,57 g/mol

Darstellung des Tetrapeptids Boc-[Pro-5-AIS(OBn)]₂-OAll (17)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden je 5,09 g (10,0 mmol) 14 an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 4,44 g (100%)) und an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III (Ausbeute 4,68 g (100%)) entschützt.

Peptidkupplung: 4,68 g (10,0 mmol) 16, 4,44 g (10,0 mmol) 15 und 6,33 g (15,0 mmol) PyCloP wurden in 250 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 6,94 ml (40,0 mmol) DIEA wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das zurückbleibende Öl säulenchromatographisch (Laufmittel: Essigsäureethylester) gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden zur Trockene eingengt. Das zunächst als Öl anfallende Produkt erstarrte beim Trocknen im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 8,28 g (96%)

MS (CI): [M + NH₄⁺] bei m/z = 876, Intensität = 100%

Darstellung des Hexapeptids Boc-[Pro-5-AIS(OBn)]₃-OAlI (19)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden 2,20 g (2,6 mmol) 17 an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 2,02 g (98%)) und 1,43 g (2,8 mmol) 14 an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III (Ausbeute 1,31 g (100%)) entschützt.

Peptidkupplung: 1,31 g (2,8 mmol) 16, 2,02 g (2,5 mmol) 18 und 1,34 g (3,2 mmol) PyCloP wurden in 70 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 1,54 ml (8,9 mmol) DIEA ließ man über Nacht rühren. Das Lösungsmittel wurde vollständig im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Aceton 2:1). Die sauberen Fraktionen wurden vom Lösungsmittel befreit und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,88 g (94%)

MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 1209, Intensität = 3%

Darstellung des Cyclopeptids *cyclo*-[Pro-5-AIS(OBn)]₃ (22)

Entschützungen: Vor der Cyclisierung wurden 3,65 g (3,0 mmol) 19 zunächst an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III entschützt. Der nach dem Einengen der Reaktionslösung verbliebene Rückstand war jedoch nicht vollständig in reinem Essigsäureethylester löslich. Daher wurde der Rückstand erst in Chloroform gelöst und diese Lösung dann mit Essigsäureethylester so verdünnt, daß eine klare Lösung erhalten wurde. Diese wurde dann nach der allgemeinen Vorschrift weiter aufgearbeitet. Das Produkt wurde dann an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode II (Ausbeute über beide Stufen: 3,30 g (99%)) entschützt.

Cyclisierung: 3,30 g (3,0 mmol) vollständig entschütztes Hexapeptid 21 wurden in einen Reaktionskolben eingewogen und dreimal sekuriert. Es wurden 330 ml entgastes DMF p.A. und 1,67 ml DIEA (9,6 mmol) im Schutzgasgegenstrom zugegeben. Die Lösung wurde mit einem bereits vorgeheizten Ölbad auf 90°C erwärmt. Dann wurde bei konstanter Temperatur durch ein Septum eine Lösung von 1,06 g (3,3 mmol) TBTU in 10 ml DMF p.A. mit einem Perfusor über 2 h zugetropft. Die Reaktionslösung wurde noch 3 h bei 90°C. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum bei 40°C abkondensiert. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: 1. Dichlormethan/Isopropanol 10:1, 2. Chloroform/Aceton 2:1). Nach Umkristallisieren aus

Methanol wurde ein weißer Feststoff enthalten, der im Turbomolekularpumpenvakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 1,56 g (50%)

Smp: Erweichen ab 164°C, geschmolzen > 250°C

$[\alpha]_D^{25}$: +7,8° (c=1, CHCl₃)

MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 1051, Intensität = 7,0%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,81 - 2,09 (m, 9H, Pro-H(β)+ Pro-H(γ)), 2,25 - 2,38 (m, 3H, Pro-H(β)), 3,22 - 3,51 (m, 6H, Pro-H(γ)), 4,65 (dd, 3H, ³J_{H ac} = 4,1 Hz, ³J_{H aa} = 8,4 Hz, Pro-H(α)), 5,37 (s, 6H, Bn-CH₂), 7,35-7,54 (m, 15H, Bn-H), 7,67 (t, 3H, ⁴J_H = 1,7 Hz, 5-AIS-H(6)), 7,91 (t, 3H, ⁴J_H = 1,7 Hz, 5-AIS-H(4)), 8,66 (t, 3H, ⁴J_H = 1,7 Hz, 5-AIS-H(2)), 10,61 (s, 3H, NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3449(m,b), 3089(w), 3034(w), 2975(w), 2882(w), 1721(ss), 1625(ss), 1598(ss), 1560(s), 1442(s), 1418(s), 1377(m), 1322(s), 1301(ss), 1263(m), 1214(s), 1194(s), 1115(m), 1002(w), 976(w), 901(w), 754(m), 698(m), 642(m), 602(w), 490(w)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 66,29%	H: 5,38%	N: 7,73%	C ₆₀ H ₅₄ N ₆ O ₁₂ *2 H ₂ O
	gef.:	C: 66,25%	H: 5,17%	N: 7,52%	M = 1087,15 g/mol

4.5.2 Synthese von *cyclo*-[Pro-5-AIS(O⁻)]₃ (NBu₄⁺)₃ (**39**)

Entschützung: Es wurden 0,46 g (0,44 mmol) **22** an den benzylveresterten Carboxylgruppen nach Methode IV entschützt. Als Lösungsmittel wurde jedoch eine Mischung aus 200 ml Methanol und 80 ml Methylenchlorid verwendet, um zu verhindern, daß die entstehende Tricarbonsäure **4** ausfällt.

Ausbeute: 0,34 g (100%)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 56,11%	H: 5,07%	N: 10,07%	C ₃₉ H ₃₆ N ₆ O ₁₂ *3 H ₂ O
	gef.:	C: 55,98%	H: 5,16%	N: 9,99%	M = 834,79 g/mol

Deprotonierung: 55,65 mg (66,66 µmol) **4** wurden nach Methode V zum Tetra-*n*-butylammoniumsalz umgesetzt.

<u>Ausbeute:</u>	0,10 g (100%)
<u>Smp:</u>	134°C
$[\alpha]_D^{25}$:	-35,4° (c=1, CHCl ₃)
<u>MS (ESI):</u>	[M - 2NBu ₄ ⁺ + Na ⁺] bei m/z = 1042, Intensität = 100% [M - NBu ₄ ⁺] bei m/z = 1261, Intensität = 53%
<u>¹H-NMR:</u>	(500 MHz, DMSO-d ₆ , TMS) δ [ppm] 0,93 (t, 36H, ³ J _H = 7,3 Hz, <i>n</i> Bu-CH ₃), 1,26 - 1,36 (m, 24H, <i>n</i> Bu-γCH ₂), 1,52 - 1,61 (m, 24H, <i>n</i> Bu-βCH ₂), 1,78 - 2,04 (m, 9H, Pro-H(β)+ Pro-H(γ)), 2,22 - 2,33 (m, 3H, Pro-H(β)), 3,11 - 3,20 (m, 24H, <i>n</i> Bu-αCH ₂), 3,42 - 3,49 (m, 6H, Pro-H(δ)), 4,66 (dd, 3H, ³ J _{H ae} = 3,2 Hz, ³ J _{H aa} = 8,2 Hz, Pro-H(α)), 7,52 (s, 3H, 5-AIS-H(6)), 7,70 (s, 3H, 5-AIS-H(4)), 8,22 (s, 3H, 5-AIS-H(2)), 10,15 (s, 3H, NH)
<u>¹³C-NMR</u>	(125 MHz, DMSO-d ₆ , TMS) δ [ppm] 13,5 (<i>n</i> Bu-CH ₃), 19,2 (<i>n</i> Bu-γCH ₂), 23,1 (<i>n</i> Bu-βCH ₂), 24,6 (Pro-C(γ)), 29,5 (Pro-C(β)), 49,4 (Pro-C(δ)), 57,5 (<i>n</i> Bu-αCH ₂), 59,7 (Pro-C(α)), 118,4 (ATS-C(2)), 120,8 (ATS-C(4)), 121,2 (ATS-C(6)), 136,8 (ATS-C(1)), 137,9 (ATS-C(3)), 142,6 (ATS-C(5)), 167,2 (ATS-C(1)CO), 169,4 (Pro-CO), 170,3 (ATS-C(4)CO)
<u>IR (in KBr):</u>	[cm ⁻¹] 3399(m,b), 3254(m), 2962(s), 1685(s), 1630(s), 1579(s), 1450(s), 1412(s), 1363(s), 1276(m), 1242(m), 1096(w), 882(m), 838(w), 799(m), 760(m), 688(w), 531(w), 497(w)
<u>C,H,N:</u>	ber.: C: 67,58% H: 9,25% N: 8,20% C ₈₇ H ₁₄₁ N ₉ O ₂₁ *0,5 H ₂ O*1 MeOH gef.: C: 67,59% H: 9,10% N: 8,44% M = 1537,17 g/mol

4.5.3 Synthese von *cyclo*-{Pro-5-AIS[Glu(O*i*Pr)-O⁻]}₃ (NBu₄⁺)₃ (34)

Darstellung von Boc-Glu(O*i*Pr)-OBn (24)

5,79 g (20,0 mmol) Boc-Glu(O*i*Pr)-OH^[139] und 5,04 g (60,0 mmol) NaHCO₃ wurden in 90 ml DMF p.A. suspendiert. Nach der Zugabe von 7,50 ml (60,0 mmol) Benzylbromid und 48 h Rühren bei Raumtemperatur wurden 220 ml Essigsäureethylester zugegeben. Die Mischung wurde zweimal mit 10% NaHCO₃-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Das Produkt kristallisierte im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 6,22 g (82%)
Smp: 74°C
 $[\alpha]_D^{25}$: -2,0° (c=1, CHCl₃)
MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 380, Intensität = 6%
[M + Na⁺] bei m/z = 402, Intensität = 15%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100°C) δ [ppm] 1,24 (d, 6H, ³J_H= 6,2 Hz, CH(CH₃)₂), 1,36 (s, 9H, tBu), 1,78 - 2,05 (m, 2H, Glu-H(β)), 2,27 - 2,35 (m, 2H, Glu-H(γ)), 4,13 - 4,03 (m, 1H, Glu-H(α)), 4,89 (sept, 1H, ³J_H= 6,2 Hz, CH(CH₃)₂), 5,10 + 5,15 (2*d, 2*1H, ²J_H= 12,6 Hz, Bn-CH₂), 6,82 (s, b, 1H, NH), 7,26 - 7,37 (m, 5H, Bn-H)

IR (Diamant): [cm⁻¹] 3360(m), 2975(m), 2930(w), 1750(s), 1722(ss), 1684(ss), 1516(s), 1448(m), 1418(w), 1385(m), 1367(m), 1356(w), 1282(m), 1254(s), 1215(s), 1196(ss), 1167(ss), 1148(ss), 1107(S), 1053(s), 1029(m), 994(m), 956(m), 920(w), 914(w), 863(w), 825(w), 787(w), 757(m), 698(m), 671(w)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 63,31%	H: 7,70%	N: 3,69%	C ₂₀ H ₂₉ NO ₆
	gef.:	C: 63,45%	H: 7,96%	N: 3,69%	M = 379,45 g/mol

Darstellung von *cyclo*-{Pro-5-AIS[Glu(O*i*Pr)-OBn]}₃ (32)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden 0,46 g (0,44 mmol) 22 an den benzylveresterten Carboxylgruppen nach Methode IV (Ausbeute 0,34 g (100%)) entschützt. Es wurde jedoch eine Mischung aus 200 ml Methanol und 80 ml Methylenchlorid als Lösungsmittel verwendet, um die entstehende Tricarbonsäure 4 in Lösung zu halten. 5,70 g (15,0 mmol) 24 wurden an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 4,36 g (92%)) entschützt.

Peptidkupplung: 0,34 g (0,44 mmol) 4 wurden in 60 ml trockenem Dichlormethan suspendiert und 0,63 g 25 (1,98 mmol) sowie 0,84 g (1,98 mmol) PyCloP in dieser Suspension gelöst. Nach Zugabe von 1,10 ml (5,94 mmol) DIEA wurde die Lösung innerhalb von 6 h klar. Nach 48 h Rühren wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Laufmittel: Essigsäureethylester/Methanol 10:1) gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und das saubere Produkt zwei Tage im Ölpumpenvakuum bei 50°C getrocknet.

Ausbeute: 0,58 g (84%)
Smp: Erweichen ab 160°C, geschmolzen bei 168°C
 $[\alpha]_D^{25}$: -19,7° (c=1, CHCl₃)
MS (FAB): [M + Na⁺] bei m/z = 1587, Intensität = 100%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,16 + 1,17 (2*d, 2*9H, ³J_H= 6,5 Hz, CH(CH₃)₂), 1,83 - 2,19 (m, 18H, Pro-H(β) + Pro-H(γ) + Glu-H(β)), 2,39 - 2,46 (m, 6H, Glu-H(γ)), 3,37 - 3,53 (m, 6H, Pro-H(δ)), 4,50 - 4,57 (m, 3H, Glu-H(α)), 4,70 (dd, 3H, ³J_{H ac}= 3,9 Hz, ³J_{H aa}= 8,0 Hz, Pro-H(α)), 4,88 (sept, 3H, ³J_H= 6,2 Hz, CH(CH₃)₂), 5,17 (s, 6H, Bn-CH₂), 7,30 - 7,38 (m, 15H, Bn-H), 7,66 (t, 3H, ⁴J_H= 1,4 Hz, 5-AIS-H(6)), 7,75 (t, 3H, ⁴J_H= 1,4 Hz, 5-AIS-H(4)), 8,57 (t, 3H, ⁴J_H= 1,4 Hz, 5-AIS-H(2)), 8,94 (d, 3H, ³J_H= 7,4 Hz, Glu-NH), 10,53 (s, 3H, 5-AIS-NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3500(m,b), 3290(m,b), 3091(m), 2980(m), 2880(w), 1731(s), 1647(s), 1597(s), 1543(s), 1450(s), 1414(s), 1384(s), 1347(s), 1264(s), 1196(s), 1107(s), 967(w), 895(m), 751(m), 698(m), 648(m), 596(m), 506(w)

C,H,N: ber.: C: 63,75% H: 6,05% N: 7,96% C₈₄H₉₃N₉O₂₁*1 H₂O
 gef.: C: 63,90% H: 5,86% N: 7,68% M = 1582,73 g/mol

Darstellung von *cyclo*-{Pro-5-AIS[Glu(OiPr)-O]}₃ (NBu₄⁺)₃ (34)

Entschützung: 0,50 g (0,32 mmol) 32 wurden nach Methode IV an den benzylveresterten Carboxylgruppen entschützt.

Ausbeute: 0,43 g (100%)
MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 1294, Intensität = 100%

C,H,N: ber.: C: 57,66% H: 5,91% N: 9,61% C₆₃H₇₅N₉O₂₁*1 H₂O
 gef.: C: 57,69% H: 5,94% N: 9,49% M = 1312,35 g/mol

Deprotonierung: 393,71 mg (300 μ mol) 33 wurden nach Methode V zum Tetra-*n*-butylammoniumsalz umgesetzt.

Ausbeute: 0,59 g (100%)

<u>Smp:</u>	Erweichen ab 183°C, Zersetzung bei 196°C				
$[\alpha]_D^{25}$:	-26,6° (c=1, MeOH)				
<u>MS (ESI):</u>	[M - 3NBu ₄ ⁺ + 2H ⁺] bei m/z = 1292, Intensität =100% [M - 2NBu ₄ ⁺ + H ⁺] bei m/z = 1534, Intensität =46%				
<u>¹H-NMR:</u>	(500 MHz, DMSO-d ₆ , TMS) δ [ppm] 0,93 (t, 36H, ³ J _H = 7,4 Hz, <i>n</i> Bu-CH ₃), 1,14 (d, 18H, ³ J _H = 6,2 Hz, <i>i</i> Pr-CH ₃), 1,30 - 1,41 (m, 24H, <i>n</i> Bu-γCH ₂), 1,57 - 1,67 (m, 24H, <i>n</i> Bu-βCH ₂), 1,87 - 2,27 (m, 18H, Pro-H(β) + Pro-H(γ) + Glu-H(β)), 2,29 - 2,41 (m, 6H, Glu-H(γ)), 3,11 - 3,20 (m, 24H, <i>n</i> Bu-αCH ₂), 3,42 - 3,57 (m, 6H, Pro-H(δ)), 3,87 - 3,96 (m, 3H, Glu-H(α)), 4,70 (dd, 3H, ³ J _{H ac} = 3,6 Hz, ³ J _{H aa} = 7,9 Hz, Pro-H(α)), 4,88 (sept, 3H, ³ J _H = 6,2 Hz, <i>i</i> Pr-CH), 7,48 (s, 3H, 5-AIS-H(6)), 7,68 (s, 3H, 5-AIS-H(4)), 7,98 (s, b, 3H, Glu-NH), 8,54 (s, 3H, 5-AIS-H(2)), 10,54 (s, b, 3H, 5-AIS-NH)				
<u>¹³C-NMR</u>	(125 MHz, DMSO-d ₆ , TMS) δ 13,8 (<i>n</i> Bu-CH ₃), 19,5 (<i>n</i> Bu-γCH ₂), 21,9 (<i>i</i> Pr-CH ₃), 23,4 (<i>n</i> Bu-βCH ₂), 54,2 (Glu-C(α)), 57,2 (<i>n</i> Bu-αCH ₂), 67,1 (<i>i</i> Pr-CH) (Da sich trotz verlängerter Meßzeit alle anderen ¹³ C - Signale kaum vom Untergrund abhoben, konnten sie nicht exakt ausgewertet werden)				
<u>IR (in KBr):</u>	[cm ⁻¹] 3376(m,b), 2964 (s), 2876(m), 1724(s), 1686(s), 1609(ss), 1561(s), 1490(s), 1449(s), 1385(s), 1327(m), 1266(m), 1181(m), 1108(s), 1065(w), 1034(w), 970(w), 889(m), 758(m), 699(m), 650(m), 503(w)				
<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 64,88%	H: 9,03%	N: 8,18%	C ₁₁₁ H ₁₈₀ N ₁₂ O ₂₁ *2 H ₂ O
	gef.:	C: 64,88%	H: 9,12%	N: 8,18%	M = 2054,75 g/mol

4.5.4 Synthese von *cyclo*-{Pro-5-AIS[Asp(O⁻)-O*i*Pr]}₃ (NBu₄⁺)₃ (5)

Darstellung von Boc-Asp(OBn)-O*i*Pr (27)

2,70 g (7,4 mmol) Boc-Asp(OBn)-OH, 0,54 g (8,9 mmol) Isopropanol p.A. und 76 mg (0,6 mmol) DMAP wurden in 25 ml trockenem THF gelöst und mit einem Eisbad abgekühlt. In der Kälte wurde eine Lösung von 1,85 g (8,88 mmol) DCC in 15 ml THF langsam hinzugegeben. Man ließ noch 2 h in der Kälte und über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Am nächsten Tag wurde vom ausgefallenen DCU abfiltriert, das THF im Vakuum entfernt und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Die organische Phase wurde nacheinander dreimal mit 10% NaHCO₃-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat

getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: *n*-Hexan/Essigester 1:1, die DC - Platten wurden mit Schwefelsäure/Methanol behandelt und dann erwärmt, um auch eventuell vorhandenen DCU sichtbar zu machen). Die sauberen Fraktionen wurden vereint und im Vakuum zur Trockene eingeengt. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum bei 50°C getrocknet. Es kristallisierte langsam nach dem Abkühlen.

Ausbeute: 1,98 g (73%)

Smp: 60°C

$[\alpha]_D^{25}$: +21,7° (c=1, CHCl₃)

MS (CI): [M + NH₄⁺] bei m/z = 383, Intensität = 100%
[M + H⁺] bei m/z = 366, Intensität = 52%

¹H-NMR: (200 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,15 + 1,16 (2*d, 2*3H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 1,40 (s, 9H, tBu), 2,78 (m, 2H, ²J_H= 16,2 Hz, Asp-H(β)), 4,25 - 4,41 (m, 1H, Asp-H(α)), 4,90 (sept, 1H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 5,13 (s, 2H, Bn-CH₂), 7,28-7,46 (m, 6H, Bn-H + NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3406(ss), 3091(m), 3041(m), 3013(m), 2977(m), 2934(m), 2905(m), 1740(s), 1727(ss), 1717(ss), 1514(s), 1514(s), 1453(m), 1414(m), 1395(m), 1366(m), 1339(m), 1329(m), 1295(m), 1224(s), 1174(s), 1110(m), 1067(m), 1038(m), 1023(m), 996(w), 969(w), 942(m), 916(w), 892(w), 854(w), 808(w), 778(w), 753(m), 698(m), 646(w), 609(w), 544(w), 477(m), 424(w)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 62,45%	H: 7,45%	N: 3,83%	C ₁₉ H ₂₇ NO ₆
	gef.:	C: 62,69%	H: 7,73%	N: 4,10%	M = 365,43 g/mol

Darstellung von *cyclo*-{Pro-5-AIS[Asp(OBn)-O_iPr]}₃ (35)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden 0,46 g (0,44 mmol) 22 an den benzylveresterten Carboxylgruppen nach Methode IV (Ausbeute 0,34 g (100%)) entschützt. Als Lösungsmittel wurde jedoch eine Mischung aus 200 ml Methanol und 80 ml Methylenchlorid verwendet, um die entstehende Tricarbonsäure 4 in Lösung zu halten. 3,53 g (9,66 mmol) 27 wurden an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 2,85 g (98%)) entschützt.

Peptidkupplung: 0,34 g (0,44 mmol) 4 wurden in 60 ml trockenem Dichlormethan suspendiert und 0,60 g 28 (1,98 mmol) sowie 0,84 g (1,98 mmol) PyCloP in dieser Suspension gelöst. Nach Zugabe von 1,10 ml (5,94 mmol) DIEA wurde die Lösung innerhalb von 6 h klar. Nach 48 h Rühren wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Laufmittel: Essigsäureethylester/Methanol 10:1) gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden im Vakuum eingeengt und das saubere Produkt zwei Tage im Ölpumpenvakuum bei 50°C getrocknet.

Ausbeute: 0,55 g (82%)

Smp: Erweichen ab 150°C, geschmolzen bei 161°C

$[\alpha]_D^{25}$: -27,3° (c=1, CHCl₃)

MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 1522, Intensität = 73%
[M + Na⁺] bei m/z = 1544, Intensität = 100%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,16 + 1,17 (2*d, 2*9H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 1,81 - 2,08 (m, 9H, Pro-H(β)+ Pro-H(γ)), 2,27 - 2,35 (m, 3H, Pro-H(β)), 2,95 (m, 6H, ²J_H= 16,4 Hz, Asp-H(β)), 3,37 - 3,53 (m, 6H, Pro-H(δ)), 4,70 (dd, 3H, ³J_{H ac}= 4,4 Hz, ³J_{H aa}= 8,8 Hz, Pro-H(α)), 4,79-4,85 (m, 3H, Asp-H(α)), 4,92 (sept, 3H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 5,13 (s, 6H, Bn-CH₂), 7,28-7,40 (m, 15H, Bn-H), 7,58 (s, 3H, 5-AIS-H(6)), 7,73 (s, 3H, 5-AIS-H(4)), 8,58 (s, 3H, 5-AIS-H(2)), 9,05 (d, 3H, ³J_H= 7,6 Hz, Asp-NH), 10,55 (s, b, 3H, 5-AIS-NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3395(s,b), 3093(m), 3034(m), 2965(s), 2882(m), 1742(ss), 1698(s), 1681(s), 1670(s), 1647(s), 1636(s), 1624(s), 1598(s), 1559(s), 1541(s), 1523(s), 1456(s), 1417(s), 1387(m), 1375(m), 1362(m), 1339(m), 1262(ss), 1214(s), 1145(m), 1103(ss), 1023(s), 842(ss), 804(s), 748(m), 698(m), 644(w), 581(w), 557(m), 472(w), 419(w)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 62,45%	H: 5,85%	N: 8,13%	C ₈₁ H ₈₇ N ₉ O ₂₁ *1,5 H ₂ O
	gef.:	C: 62,84%	H: 6,05%	N: 8,14%	M = 1549,65 g/mol

Darstellung von *cyclo*-{Pro-5-AIS[Asp(O⁻)-O*i*Pr]}₃(NBu₄⁺)₃ (5)

Entschützung: 0,55 g (0,36 mmol) 35 wurden nach Methode IV an den benzylveresterten Carboxylgruppen entschützt.

Ausbeute: 0,46 g (98%)

MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 1252, Intensität = 100%

C,H,N: ber.: C: 55,17% H: 5,79% N: 9,65% C₆₀H₆₉N₉O₂₁*3 H₂O
gef.: C: 55,28% H: 5,88% N: 9,55% M = 1306,30 g/mol

Deprotonierung: 378,40 mg (280,6 μmol) 36 wurden nach Methode V zum Tetra-*n*-butylammoniumsalz umgesetzt.

Ausbeute: 0,55 g (99%)

Smp: Zersetzung bei 159°C

[α]_D²⁵: -28,7° (c=1, CHCl₃)

MS (ESI): [M - 3NBu₄⁺ + 2H⁺] bei m/z = 1251, Intensität = 14%
[M - NBu₄⁺] bei m/z = 1733, Intensität = 100%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 0,93 (t, 36H, ³J_H = 7,3 Hz, *n*Bu-CH₃), 1,15 + 1,19 (2*d, 2*18H, ³J_H = 6,2 Hz, *i*Pr-CH₃), 1,26 - 1,36 (m, 24H, *n*Bu-γCH₂), 1,50 - 1,62 (m, 24H, *n*Bu-βCH₂), 1,83 - 2,08 (m, 9H, Pro-H(β) + Pro-H(γ)), 2,21 - 2,43 (m, 9H, Pro-H(β) + Asp-H(β)), 3,09 - 3,21 (m, 24H, *n*Bu-αCH₂), 3,37 - 3,52 (m, 6H, Pro-H(δ)), 4,40 - 4,46 (m, 3H, Asp-H(α)), 4,70 (dd, 3H, ³J_{H ac} = 3,9 Hz, ³J_{H aa} = 8,5 Hz, Pro-H(α)), 4,87 (sept, 3H, ³J_H = 6,3 Hz, *i*Pr-CH), 7,48 (s, 3H, 5-AIS-H(6)), 7,70 (s, 3H, 5-AIS-H(4)), 8,57 (s, 3H, 5-AIS-H(2)), 10,14 (s, 3H, Asp-NH), 10,59 (s, 3H, 5-AIS-NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 13,5 (*n*Bu-C_H3), 19,2 (*n*Bu-γC_H2), 21,5 + 21,6 (*i*Pr-CH₃), 23,0 (*n*Bu-βC_H2), 24,6 (Pro-C(γ)), 29,5 (Pro-C(β)), 38,2 (Asp-C(β)), 49,5 (Pro-C(δ)), 50,1 (Asp-C(α)), 57,5 (*n*Bu-αC_H2), 60,0 (Pro-C(α)), 67,3 (*i*Pr-CH), 118,4 + 118,7 (5-AIS-C(4) + 5-AIS-C(6)), 120,5 (5-AIS-C(2)), 134,9 (5-AIS-C(1)), 138,3 (5-AIS-C(5)), 139,4 (5-AIS-C(3)), 164,8 (5-AIS-C(1)C=O), 168,2 + 168,3 (Pro-C=O + 5-AIS-C(5)C=O), 170,6 (Asp-C(α)C=O), 171,6 (Asp-C(β)C=O)

IR (Diamant): [cm⁻¹] 3251 (b,w), 2964(s), 2938 (s), 2875(m), 1730(m), 1632(s), 1593(ss), 1450(s), 1410(ss), 1382(ss), 1327(s), 1200(s), 1106(s), 1037(m), 889(b,m), 753(m), 706(b,m)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 63,32%	H: 8,95%	N: 8,20%	$C_{108}H_{174}N_{12}O_{21} \cdot 4 H_2O$
	gef.:	C: 63,51%	H: 8,83%	N: 8,21%	$M = 2048,70 \text{ g/mol}$

4.5.5 Synthese von *cyclo*-{Pro-5-AIS[Glu(O⁻)-O*t*Pr]}₃ (NBu₄⁺)₃ (6)

Darstellung von Boc-Glu(OBn)-O*t*Pr (30)

5,07 g (15,0 mmol) Boc-Glu(OBn)-OH, 1,13 g (18,6 mmol) Isopropanol p.A. und 0,16 g (1,3 mmol) DMAP wurden in 100 ml trockenem THF gelöst. Nach Abkühlen mit einem Eisbad wurde eine Lösung von 3,87 g (18,6 mmol) DCC in 30 ml trockenem THF langsam zu der Reaktionsmischung getropft. Nach zwei Stunden in der Kälte ließ man über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Der ausgefallene DCU wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: *n*-Hexan/Essigsäureethylester 2:1, wobei die DC - Platten mit Schwefelsäure/Methanol behandelt und dann erwärmt wurden, um auch eventuell vorhandenen DCU sichtbar zu machen). Die sauberen Fraktionen wurden vereint und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das als farbloses Öl zurückgebliebene Produkt wurde bei 50°C im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es kristallisierte langsam nach dem Abkühlen.

Ausbeute: 4,60 g (81%)

Smp: 65°C

$[\alpha]_D^{25}$: +12,3° (c=1, CHCl₃)

MS (CI): [M + NH₄⁺] bei m/z = 397, Intensität = 100%
[M + H⁺] bei m/z = 380, Intensität = 48%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100°C) δ [ppm] 1,18 + 1,19 (2*d, 2*3H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 1,38 (s, 9H, *t*Bu), 1,80 - 2,04 (m, 2H, Glu-H(β)), 2,40 - 2,47 (m, 2H, Glu-H(γ)), 3,92 - 4,00 (m, 1H, Glu-H(α)), 4,91 (sept, 1H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 5,10 (s, 2H, Bn-CH₂), 6,70 (d, 1H, ³J_H= 7,0 Hz NH), 7,25 - 7,36 (m, 5H, Bn-H)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3372(s), 3093(w), 3070(w), 3034(w), 2979(m), 2936(w), 1754(s), 1724(ss), 1692(ss), 1571(s), 1464(w), 1436(w), 1418(w), 1390(w), 1368(m), 1345(w), 1305(w), 1289(w), 1222(m), 1201(s), 1176(s), 1158(m), 1104(m), 1033(w), 972(w), 961(w), 917(w), 905(w), 875(w), 825(w), 786(w), 752(m), 699(m), 579(w), 556(w), 527(w), 466(w), 423(w)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 63,31%	H: 7,70%	N: 3,69%	$C_{20}H_{29}NO_6$
	gef.:	C: 63,50%	H: 7,89%	N: 3,82%	$M = 379,45 \text{ g/mol}$

Darstellung von *cyclo*-{Pro-5-AIS[Glu(OBn)-O*i*Pr]}₃ (37)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden 0,40 g (0,38 mmol) 22 an den benzylveresterten Carboxylgruppen nach Methode IV (Ausbeute 0,30 g (100%)) entschützt. Als Lösungsmittel wurde dabei eine Mischung aus 175 ml Methanol und 70 ml Methylenchlorid verwendet, um die entstehende Tricarbonsäure 4 in Lösung zu halten. 1,67 g (4,4 mmol) 30 wurden an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 1,40 g (99%)) entschützt.

Peptidkupplung: 0,30 g (0,38 mmol) 4 wurden in 50 ml trockenem Dichlormethan suspendiert und 0,54 g (1,71 mmol) 31 sowie 0,72 g (1,71 mmol) PyCloP in dieser Suspension gelöst. Nach Zugabe von 0,91 ml (5,13 mmol) DIEA wurde die Lösung innerhalb von 6 h klar. Nach 48 h Rühren wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Laufmittel: Essigsäureethylester/Methanol 10:1) gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden im Vakuum eingeeengt und das saubere Produkt zwei Tage im Ölpumpenvakuum bei 50°C getrocknet.

Ausbeute: 0,54 g (91%)

Smp: Erweichen ab 131°C, geschmolzen bei 162°C

$[\alpha]_D^{25}$: -16,6° (c=1, CHCl₃)

MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 1564, Intensität = 100%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100° C) δ [ppm] 1,20 + 1,21 (2*d, 2*9H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 1,85 - 2,40 (m, 18H, Pro-H(β) + Pro-H(γ) + Glu-H(β)), 2,41 - 2,57 (m, 6H, Glu-H(γ)), 3,38 - 3,60 (m, 6H, Pro-H(δ)), 4,43 - 4,50 (m, 3H, Glu-H(α)), 4,73 (dd, 3H, ³J_{H ac}= 4,0 Hz, ³J_{H aa}= 8,6 Hz, Pro-H(α)), 4,94 (sept, 3H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 5,10 (s, 6H, Bn-CH₂), 7,27 - 7,40 (m, 15H, Bn-H), 7,61 (t, 3H, ⁴J_H= 1,5 Hz, 5-AIS-H(6)), 7,78 (t, 3H, ⁴J_H= 1,5 Hz, 5-AIS-H(4)), 8,47 (bs, 3H, 5-AIS-H(2)), 8,51 (d, 3H, ³J_H= 7,7 Hz, Glu-NH), 10,16 (s, b, 3H, 5-AIS-NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3384(s,b), 3093(s), 2964(s), 1739(m), 1729(m), 1713(m), 1660(m), 1651(m), 1643(m), 1632(m), 1566(m), 1555(m), 1537(m), 1462(m), 1452(m), 1414(m), 1377(m), 1345(m), 1331(m), 1262(ss), 1099(ss,b), 1023(s,b), 801(s), 753(w), 697(w), 597(w), 578(w), 498(w), 428(w)

C,H,N: ber.: C: 62,33% H: 6,16% N: 7,79% C₈₄H₉₃N₉O₂₁*3 H₂O
gef.: C: 62,42% H: 6,24% N: 7,61% M = 1618,76 g/mol

Darstellung von *cyclo*-{Pro-5-AIS[Glu(O⁻)-O*i*Pr]}₃(NBu₄⁺)₃ (6)

Entschützung: 0,50 g (0,32 mmol) 37 wurden nach Methode IV an den benzylveresterten Carboxylgruppen entschützt.

Ausbeute: 0,39 g (94%)

MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 1294, Intensität = 100%
[M + Na⁺] bei m/z = 1316, Intensität = 27%

C,H,N: ber.: C: 55,38% H: 6,12% N: 9,23% C₆₃H₇₅N₉O₂₁*4 H₂O
gef.: C: 55,35% H: 6,32% N: 8,99% M = 1366,40 g/mol

Deprotonierung: 136,64 mg (100,0 μmol) 38 wurden nach Methode V zum Tetra-*n*-butylammoniumsalz umgesetzt.

Ausbeute: 0,207 g (100%)

Smp: Erweichen ab 174°C, Zersetzung bei 187-188°C

[α]_D²⁵: -50,4° (c=1, CHCl₃)

MS (ESI): [M - 3NBu₄⁺ + 2H⁺] bei m/z = 1292, Intensität = 100%
[M - NBu₄⁺] bei m/z = 1776, Intensität = 46%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 60°C) δ 0,93 (t, 36H, ³J_H = 7,2 Hz, *n*Bu-CH₃), 1,16 + 1,21 (2*d, 2*18H, ³J_H = 6,2 Hz, *i*Pr-CH₃), 1,24 - 1,38 (m, 24H, *n*Bu-γCH₂), 1,51 - 1,63 (m, 24H, *n*Bu-βCH₂), 1,84 - 2,40 (m, 24H, Pro-H(β) + Pro-H(γ) + Glu-H(β) + Glu-H(γ)), 3,11 - 3,19 (m, 24H, *n*Bu-αCH₂), 3,47 - 3,60 (m, 6H, Pro-H(δ)), 4,10 - 4,16 (m, 3H, Glu-H(α)), 4,73 (dd, 3H, ³J_H _{ae} = 3,4 Hz, ³J_H _{aa} = 7,4 Hz, Pro-H(α)), 4,92 (sept, 3H, ³J_H = 6,4 Hz, *i*Pr-CH), 7,73 (s, 3H, 5-AIS-H(6)), 7,81 (s, 3H, 5-AIS-H(4)), 8,49 (s, 3H, 5-AIS-H(2)), 10,50 (s, 3H, 5-AIS-NH), 11,85 (s, 3H, Glu-NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ 13,4 (*n*Bu-CH₃), 19,1 (*n*Bu-γCH₂), 21,4 + 21,5 (*i*Pr-CH₃), 22,9 (*n*Bu-βCH₂), 24,4 (Pro-C(γ)), 26,4 + 29,5 (Pro-C(β) + Glu-H(β)), 35,0 (Glu-C(γ)), 49,2 (Pro-C(δ)), 54,8 (Glu-C(α)), 57,4 (*n*Bu-αCH₂), 59,7 (Pro-C(α)), 67,1 (*i*Pr-CH), 118,8 + 118,9 (5-AIS-C(4) + 5-AIS-C(6)), 120,6 (5-AIS-C(2)), 134,5 (5-AIS-C(1)), 138,2 (5-AIS-C(5)), 139,1 (5-AIS-C(3)), 164,6 (5-AIS-C(1)CO), 168,1 (Pro-CO), 170,4 (5-AIS-C(5)CO), 171,6 (Glu-C(α)CO), 175,1 (Glu-C(β)CO)

IR (Diamant): [cm⁻¹] 2963(s), 2938 (s), 2875(m), 1721(s), 1680(m), 1607(ss), 1550(s), 1485(s), 1446(ss), 1380(ss), 1262(m), 1176(s), 1106(s), 888(m), 756(m), 706(b,w)

C,H,N: ber.: C: 64,34% H: 9,05% N: 8,02% C₁₁₁H₁₈₀N₁₂O₂₁*3 H₂O
gef.: C: 64,32% H: 9,04% N: 8,11% M = 2072,76 g/mol

4.5.6 Synthese von Boc-{Pro-5-AIS[Glu(O⁻-O*i*Pr)]₃-O*n*Pr (NBu₄⁺)₃ (52) und Boc-{Pro-5-AIS[Glu(O⁻-O*i*Pr)] -O*n*Pr (NBu₄⁺) (54)

Darstellung von Boc-5-AIS[Glu(OBn)-O*i*Pr]-OAll (44)

Entschützung: 1,67 g (4,4 mmol) Boc-Glu(OBn)-O*i*Pr 30 wurden an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 1,40 g (99%)) entschützt.

Peptidkupplung: 1,40 g (4,4 mmol) 31, 2,14 g (6,7 mmol) Boc-5-AIS(OH)-OAll 11 und 2,80 g (6,7 mmol) PyCloP wurden in 90 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 3,10 ml (17,7 mmol) DIEA zugetropft und die Lösung über Nacht gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Laufmittel: Chloroform/Aceton 10:1) gereinigt. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,43 g (94%)

Smp: 66 - 67°C

[α]_D²⁵ +8,1° (c = 1, CHCl₃)

MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 583, Intensität = 24%
[M + Na⁺] bei m/z = 605, Intensität = 21%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100°C) δ 1,12 + 1,24 (2*d, 2*3H, ³J_H = 5,1 Hz, *i*Pr-CH₃), 1,52 (s, 9H, *t*Bu), 2,02 - 2,28 (m, 2H, Glu-H(β)), 2,52 - 2,57 (m, 2H, Glu-H(γ)), 4,44 - 4,54 (m, 1H, Glu-H(α)), 4,85 (ddd, 2H, ³J_H = 5,3 Hz, CH₂CH=CH₂), 4,97 (sept, 1H, ³J_H = 6,2 Hz, *i*Pr-CH), 5,12 (s, 2H, Bn-CH₂), 5,30 (ddt, 1H, ³J_H = 10,6 Hz, ²J_H = 1,7 Hz, CH₂CH=CH₂, *cis*), 5,43 (ddt, 1H, ³J_H = 17,2 Hz, ²J_H = 1,7 Hz, CH₂CH=CH₂, *trans*), 6,00 - 6,14 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 7,28 - 7,38 (m, 5H, Bn-H), 8,04 (t, 1H, ⁴J_H = 1,5 Hz, 5-AIS-H(6)), 8,16 (t, 1H, ⁴J_H = 1,5 Hz, 5-AIS-H(4)), 8,27 (t, 1H, ⁴J_H = 1,5 Hz, 5-AIS-H(2)), 8,58 (d, b, 1H, ³J_H = 7,3 Hz, Glu-NH), 9,40 (s, 1H, 5-AIS-NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3302 (m,b), 3082(w), 2982(m), 2938(w), 1727(ss), 1650(s), 1603(m), 1552(s), 1454(s), 1425(m), 1369(s), 1274(s), 1226(ss), 1160(ss), 1106(s), 1067(m), 987(m), 934(w), 903(w), 868(w), 811(w), 756(m), 697(m), 546(w), 459(w)

C,H,N: ber.: C: 63,90% H: 6,57% N: 4,81% C₃₁H₃₈N₂O₉
gef.: C: 63,67% H: 6,54% N: 4,71% M = 582,66 g/mol

Darstellung des Dipeptids Boc-Pro-5-AIS[Glu(OBn)-O*i*Pr]-OAll (46)

Entschützung: Vor der Peptidkupplung wurden 2,33 g (4,0 mmol) 44 nach Methode I (Ausbeute 1,90 g (98%)) Boc-entschützt, jedoch nicht mit HCl behandelt, sondern als freies Amin isoliert.

Peptidkupplung: 1,90 g (4,0 mmol) 45, 1,28 g (6,0 mmol) Boc-Prolin und 2,53 g (6,0 mmol) PyCloP wurden in 80 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 2,78 ml (2,8 mmol) DIEA zugetropft und die Lösung über Nacht gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Laufmittel: Chloroform/Aceton 5:1) gereinigt. Das Produkt erstarrte beim Trocknen im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 2,46 g (91%)

Smp: Erweichen ab 52°C, geschmolzen bei 69°C

[α]_D²⁵ -51,5° (c = 1, CHCl₃)

MS (FAB): [M + Na⁺] bei m/z = 702, Intensität = 22%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100°C) δ 1,19 + 1,21 (2*d, 2*3H, ³J_H = 4,8 Hz, *i*Pr-CH₃), 1,34 (s, 9H, *i*Bu), 1,76 - 2,28 (m, 6H, Pro-H(β) + Pro-H(γ) + Glu-H(β)), 2,49 - 2,52 (m, 2H, Glu-H(γ)), 3,33 - 3,51 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,26 (dd, 1H, ³J_{H ac} = 4,2 Hz, ³J_{H aa} = 8,8 Hz, Pro-H(α)), 4,42 - 4,52 (m, 1H, Glu-H(α)), 4,84 (ddd, 2H, ³J_H = 5,5 Hz, CH₂CH=CH₂), 4,94 (sept, 1H, ³J_H = 6,2 Hz, *i*Pr-CH), 5,10 (s, 2H, Bn-CH₂), 5,28 (ddt, 1H, ³J_H = 10,1 Hz, ²J_H = 1,5 Hz, CH₂CH=CH₂, *cis*), 5,40 (ddt, 1H, ³J_H = 17,2 Hz, ²J_H = 1,5 Hz, CH₂CH=CH₂, *trans*), 5,98 - 6,12 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 7,23 - 7,35 (m, 5H, Bn-H), 8,11 (t, 1H, ⁴J_H = 1,5 Hz, 5-AIS-H(6)), 8,26 (t, 1H, ⁴J_H = 1,5 Hz, 5-AIS-H(4)), 8,42 (t, 1H, ⁴J_H = 1,5 Hz, 5-AIS-H(2)), 8,61 (d, 1H, ³J_H = 7,7 Hz, Glu-NH), 10,00 (s, 1H, 5-AIS-NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3315 (m,b), 2937(m), 2882(w), 1729(s), 1660(ss), 1620(m), 1572(s), 1536(m), 1454(s), 1424(s), 1368(s), 1336(m), 1235(s), 1166(s), 1108(s), 990(m), 927(w), 756(s), 698(m), 621(w), 540(w), 468(m)

C,H,N: ber.: C: 63,61% H: 6,67% N: 6,18% C₃₆H₄₅N₃O₁₀
gef.: C: 63,44% H: 6,88% N: 6,16% M = 679,77 g/mol

Darstellung des Tetrapeptids Boc-{Pro-5-AIS[Glu(OBn)-O_iPr]}₂-OAll (49)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden je 0,82 g (1,2 mmol) 46 an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 0,71 g (97%)) und an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III (Ausbeute 0,75 g (98%)) entschützt.

Peptidkupplung: 0,71 g (1,15 mmol) 47, 0,75 g (1,17 mmol) 48 und 0,58 g (1,38 mmol) PyCloP wurden in 30 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 0,68 ml (3,91 mmol) DIEA wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das zurückbleibende Öl säulenchromatographisch (Laufmittel: Aceton/Chloroform) gereinigt. Das Produkt kristallisierte beim Trocknen im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 1,32 g (94%)

MS (FAB): [M + Na⁺] bei m/z = 1223, Intensität = 47%

Darstellung des Hexapeptids Boc-{Pro-5-AIS[Glu(OBn)-O_iPr]}₃-OAll (51)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden 1,14 g (0,95 mmol) 49 an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode II (Ausbeute 1,07 g (99%)) und 0,75 g (1,1 mmol) 46 an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III (Ausbeute 0,69 g (98%)) entschützt.

Peptidkupplung: 0,69 g (1,08 mmol) 48, 1,07 g (0,94 mmol) 50 und 0,50 g (1,19 mmol) PyCloP wurden in 25 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 0,58 ml (3,32 mmol) DIEA ließ man bei Raumtemperatur über Nacht rühren. Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockene eingengt und das Produkt säulenchromatographisch (Laufmittel: 1. Chloroform/Aceton/Methanol 20:10:1, 2. Chloroform/Methanol 20:1) gereinigt. Das Produkt kristallisierte beim Trocknen im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 1,05 g (65%)

Smp: 122°C

$[\alpha]_D^{25}$ -54,7° (c = 1, CHCl₃)

MS (FAB): [M + Na⁺] bei m/z = 1745, Intensität = 100%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100°C) δ 1,20 - 1,24 (m, 18H, 3**i*Pr-CH₃), 1,36 (s, 9H, *t*Bu), 1,78 - 2,42 (m, 18H, Pro(1 + 3 + 5)-H(β) + Pro(1 + 3 + 5)-H(γ) + Glu(2' + 4' + 6')-H(β)), 2,50 - 2,58 (m, 6H, Glu(2' + 4' + 6')-H(γ)), 3,34 - 3,72 (m, 6H, Pro(1 + 3 + 5)-H(δ)), 4,27 (dd, 1H, ³J_{H ac} = 4,0 Hz, ³J_{H aa} = 8,2 Hz, Pro(1)-H(α)), 4,44 - 4,55 (m, 3H, Glu(2' + 4' + 6')-H(α)), 4,44 - 4,55 (m, 3H, Pro(3 + 5)-H(α)), 4,86 (ddd, 2H, ³J_H = 5,5 Hz, CH₂CH=CH₂), 4,91 - 5,02 (m, 3H, 3**i*Pr-CH), 5,11+5,12 (2*s, 6H, 3*Bn-CH₂), 5,30 (ddt, 1H, ³J_H = 10,4 Hz, ²J_H = 1,5 Hz, CH₂CH=CH₂, *cis*), 5,43 (ddt, 1H, ³J_H = 17,2 Hz, ²J_H = 1,5 Hz, CH₂CH=CH₂, *trans*), 6,00 - 6,15 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 7,26 - 7,37 (m, 15H, 3*Bn-H), 7,72 + 7,99 (2*s, b, 2*2H, 5-AIS(2 + 4)-H(2) + 5-AIS(2 + 4)-H(4)), 8,11 - 8,17 (m, 3H, 5-AIS(2 + 4 + 6)-H(6)), 8,30 (s, b, 1H, 5-AIS(6)-H(4)), 8,47 (s, b, 1H, 5-AIS(6)-H(2)), 8,49 - 8,58 (m, 2H, Glu(2' + 4')-NH), 8,65 (d, b, 1H, ³J_H = 7,1 Hz, Glu(6')-NH), 9,92 + 10,11 + 10,21 (3*s, b, 3H, 5-AIS(2 + 4 + 6)-NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3322 (m,b), 3090(w), 2980(m), 2880(w), 1735(ss), 1665(s), 1593(s), 1561 (s), 1451(s), 1414(s), 1375(s), 1262(s), 1212(s), 1168(s), 1106(s), 986(m), 897(m), 754(m), 698(m), 649(w), 538(w)

C,H,N: ber.: C: 64,14% H: 6,26% N: 7,32% C₉₂H₁₀₇N₉O₂₄
gef.: C: 63,87% H: 6,46% N: 7,29% M = 1722,92 g/mol

Lineares Hexapeptid Boc-{Pro-5-AIS[Glu(O)-O*i*Pr]}₃-OnPr (NBu₄⁺)₃ (52)

Entschützung: 0,40 g (0,23 mmol) 51 wurden nach Methode IV an den benzylveresterten Carboxylgruppen entschützt. Gleichzeitig wird die Allesterschutzgruppe zu einer *n*-Propylester hydriert.

Ausbeute: 0,34 g (100%)

C,H,N: ber.: C: 57,56% H: 6,39% N: 8,51% C₇₁H₉₁N₉O₂₄*1,5 H₂O
gef.: C: 57,51% H: 6,43% N: 8,63% M = 1481,57 g/mol

Deprotonierung: 237,06 mg (160 μmol) 43 wurden nach Methode V zum Tetra-*n*-

butylammoniumsalz umgesetzt.

<u>Ausbeute:</u>	365 mg (100%)
<u>Smp:</u>	Erweichen ab 95°C, Zersetzung bei 145°C
$[\alpha]_D^{25}$	-58,4° (c = 1, CHCl ₃)
<u>MS (ESI):</u>	[M - NBu ₄ ⁺] bei m/z = 1935, Intensität = 100%
<u>¹H-NMR:</u>	(300 MHz, DMSO-d ₆ , TMS, 100°C) δ 0,80 - 1,02 (m, 39H, <i>n</i> Bu-CH ₃ + <i>n</i> Pr-CH ₃), 1,10 - 1,24 (m, 16H, <i>i</i> Pr-CH ₃), 1,24 - 1,42 (m, 33H, <i>n</i> Bu-γCH ₂ + <i>t</i> Bu), 1,54 - 1,67 (m, 24H, <i>n</i> Bu-βCH ₂), 1,68 - 2,28 (m, 26H, Pro(1 + 3 + 5)-H(β) + Pro(1 + 3 + 5)-H(γ) + Glu(2' + 4' + 6')-H(β) + Glu(2' + 4' + 6')-H(γ) + <i>n</i> Pr-βCH ₂), 3,13 - 3,23 (m, 24H, <i>n</i> Bu-αCH ₂), 3,30 - 4,35 (m, 14H, Glu(2' + 4' + 6')-H(α) + Pro(1 + 3 + 5)-H(α) + Pro(1 + 3 + 5)-H(δ) + <i>n</i> Pr-αCH ₂), 4,84 - 4,99 (m, 3H, <i>i</i> Pr-CH), 7,40 - 8,75 (m, b, 9H, 5-AIS(2 + 4 + 6)-H(2) + 5-AIS(2 + 4 + 6)-H(4) + 5-AIS(2 + 4 + 6)-H(6)), 9,90 - 12,00 (m, b, 6H, 5-AIS-NH + Glu-NH)
<u>¹³C-NMR</u>	(75 MHz, DMSO-d ₆ , TMS, 100°C) δ 9,5 (<i>n</i> Pr-CH ₃), 12,6 (<i>n</i> Bu-CH ₃), 18,6 (<i>n</i> Bu-γCH ₂), 20,8 - 21,2 (m, <i>i</i> Pr-CH), 22,7 (<i>n</i> Bu-βCH ₂), 27,6 (<i>t</i> Bu-CH ₃) (Da sich trotz verlängerter Messzeit alle anderen ¹³ C - Signale kaum vom Untergrund abhoben, konnten sie nicht exakt ausgewertet werden)
<u>IR (in KBr):</u>	[cm ⁻¹] 3247 (m,b), 2964(s), 2876(s), 1736(s), 1700(s), 1665(s), 1579(ss), 1451(s), 1385(s), 1278(s), 1240(s), 1197(s), 1108(s), 1069(w), 1026(w), 992(w), 893(m), 844(m), 753(m), 598(m), 558(w), 537(w)
<u>C,H,N:</u>	ber.: C: 62,50% H: 9,17% N: 7,35% C ₁₁₉ H ₁₉₆ N ₁₂ O ₂₄ gef.: C: 62,46% H: 9,28% N: 7,64% M = 2287,02 g/mol

Lineares Dipeptid Boc-{Pro-5-AIS[Glu(O⁻)-O*i*Pr]}-O*n*Pr (NBu₄⁺) (54)

Entschützung: 0,86 g (1,26 mmol) 46 wurden nach Methode IV hydriert, wobei als Lösungsmittel ein Gemisch aus 90 ml 1,4-Dioxan und 10 ml Wasser verwendet wurde.

<u>Ausbeute:</u>	0,75 g (100%)
<u>C,H,N:</u>	ber.: C: 58,87% H: 6,98% N: 7,10% C ₂₉ H ₄₁ N ₃ O ₁₀

gef.: C: 58,62% H: 7,13% N: 7,06% M = 591,66 g/mol

Deprotonierung: 295,80 mg (0,50 mmol) 53 wurden nach Methode V zum Tetra-*n*-butylammoniumsalz umgesetzt.

Ausbeute: 420 mg (100%)
Smp: Erweichen ab 79°C, geschmolzen bei 96°C
 $[\alpha]_D^{25}$ -34,3° (c = 1, CHCl₃)
MS (ESI): [M - NBu₄⁺] bei m/z = 590, Intensität = 100%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100°C) δ 0,94 (t, 12H, ³J_H = 7,3 Hz, *n*Bu-CH₃), 0,99 (t, 3H, ³J_H = 7,3 Hz, *n*Pr-CH₃), 1,16 + 1,21 (2*d, 2*3H, ³J_H = 6,2 Hz, *i*Pr-CH₃), 1,26 - 1,42 (m, 8H, *n*Bu-γCH₂), 1,34 (s, 9H, *t*Bu), 1,54 - 1,68 (m, 8H, *n*Bu-βCH₂), 1,68 - 2,28 (m, 10H, Pro-H(β) + Pro-H(γ) + Glu-H(β) + Glu-H(γ) + *n*Pr-βCH₂), 3,13 - 3,22 (m, 8H, *n*Bu-αCH₂), 3,32 - 3,50 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,12 - 4,21 (m, 1H, Glu-H(α)), 4,22 - 4,28 (m, 2H, *n*Pr-αCH₂), 4,30 (dd, 1H, ³J_{H ac} = 3,3 Hz, ³J_{H aa} = 8,2 Hz, Pro-H(α)), 4,91 (sept, 1H, ³J_H = 6,2 Hz, *i*Pr-CH), 8,18 (s, b, 1H, 5-AIS-H(6)), 8,34 - 8,38 (m, 1H, 5-AIS-H(4)), 8,52 - 8,55 (m, 1H, 5-AIS-H(2)), 10,41 (s, b, 1H, 5-AIS-NH), 11,49 (s, b, 1H, Glu-NH)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100°C) δ 10,2 (*n*Pr-CH₃), 13,2 (*n*Bu-CH₃), 19,2 (*n*Bu-γCH₂), 21,5 + 21,6 (*i*Pr-CH), 10,2 (*n*Pr-βCH₂), 23,4 (*n*Bu-βCH₂), 23,5 (Pro-C(γ)), 27,0 (Glu-C(γ)), 28,2 (*t*Bu-CH₃), 30,6 (Pro-C(β)), 35,2 (Glu-C(β)), 46,7 (Pro-C(δ)), 55,0 (Glu-C(α)), 58,4 (*n*Bu-αCH₂), 60,5 (Pro-C(α)), 66,3 (*n*Pr-αCH₂), 67,2 (*i*Pr-CH), 78,7 (*t*Bu-C(CH₃)₃), 122,3 (5-AIS-C(2)), 123,0 (5-AIS-C(6)), 123,2 (5-AIS-C(4)), 130,8 (5-AIS-C(1)), 136,0 (5-AIS-C(5)), 139,5 (5-AIS-C(3)), 153,6 (BOC-CO), 165,4 (5-AIS-C(1)CO), 165,6 (Pro-CO), 171,7 (5-AIS-C(5)CO), 171,8 (Glu-C(α)CO), 174,8 (Glu-C(β)CO)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3247 (m,b), 2967(ss), 2877(s), 1713(s), 1665(s), 1579(ss), 1456(s), 1391(ss), 1283(s), 1240(s), 1195(s), 1110(s), 905(w), 757(w), 619(w), 536(w)

C,H,N: ber.: C: 64,18% H: 9,22% N: 6,65% C₄₅H₇₆N₄O₁₀*0,5 H₂O
 gef.: C: 63,97% H: 9,12% N: 6,63% M = 842,13 g/mol

4.5.7 Synthese der Peptide mit Tryptophan als Seitengruppe

Darstellung von Boc-5-AIS(Trp-OMe)-OAlI (57)

1,28 g (4,0 mmol) **11**, 1,24 g (4,8 mmol) H-Trp-OMe·HCl und 2,04 g (4,8 mmol) PyCloP wurden in 100 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 2,52 ml (14,4 mmol) DIEA zugetropft und die Lösung über Nacht gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Laufmittel: Essigsäureethylester/*n*-Hexan 1:1) gereinigt. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,79 g (86%)

Smp: 129°C

$[\alpha]_D^{25}$ 51,8° (c=1, CHCl₃)

MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 522, Intensität = 27%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ 1,49 (s, 9H, *t*Bu), 3,21 - 3,31 (m, 2H, Trp-H(β)), 3,63 (s, 3H, COOCH₃), 4,65 - 4,71 (m, 1H, Trp-H(α)), 4,84 (ddd, 2H, ³J_H = 5,2 Hz, CH₂CH=CH₂), 5,31 (ddt, 1H, ³J_H = 10,7 Hz, ²J_H = 1,6 Hz, CH₂CH=CH₂, *cis*), 5,44 (ddt, 1H, ³J_H = 17,0 Hz, ²J_H = 1,6 Hz, CH₂CH=CH₂, *trans*), 6,02 - 6,11 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 6,99 + 7,06 (2*ddd, 2H, Inden-H(5) + Inden-H(6)), 7,19 (d, 1H, ³J_H = 1,9 Hz, Inden-H(2)), 7,33 + 7,57 (2*d, 2H, Inden-H(4) + Inden-H(7)), 8,05 (t, 1H, ⁴J_H = 1,4 Hz, 5-AIS-H(6)), 8,13 (s, b, 1H, 5-AIS-H(4)), 8,29 (s, b, 1H, 5-AIS-H(2)), 9,07 (d, 1H, ³J_H = 7,6 Hz, Trp-C(α)NH), 9,78 (s, 1H, 5-AIS-NH), 10,84 (d, 1H, ³J_H = 1,9 Hz, Inden-NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3344 (m,b), 3084(w), 2980(w), 2951(w), 1724(ss), 1652(s), 1602(m), 1546(s), 1456(s), 1425(m), 1368(s), 1276(s), 1231(ss), 1159(s), 1118(m), 1071(m), 984(m), 935(m), 900(w), 871(w), 811(w), 735(m), 677(m), 541(w), 460(w), 426(w)

C,H,N: ber.: C: 64,48% H: 5,99% N: 8,06% C₂₈H₃₁N₃O₇
gef.: C: 64,37% H: 5,91% N: 7,84% M = 521,58 g/mol

Darstellung von Boc-Pro-5-AIS(Trp-OMe)-OAlI (61)

Entschützung: Es wurden 1,69 g (3,3 mmol) 14 an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III (Ausbeute 1,55 g (100%)) entschützt.

Peptidkupplung: 1,55 g (3,3 mmol) 60, 1,01 g (4,0 mmol) H-Trp-OMe·HCl und 1,68 g (4,0 mmol) PyCloP wurden in 85 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 2,08 ml (11,9 mmol) DIEA zugetropft und die Lösung über Nacht gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Laufmittel: Essigsäureethylester) gereinigt. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,14 g (97%)

Smp: Zersetzung bei 115°C

$[\alpha]_D^{25}$ -24,0° (c=1, CHCl₃)

MS (FAB): [M⁺] bei m/z = 668, Intensität = 16%
[M + Na⁺] bei m/z = 691, Intensität = 22%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100°C) δ 1,34 (s, 9H, tBu), 1,73 - 1,99 (m, 3H, Pro-H(β) + Pro-H(γ)), 2,12 - 2,28 (m, 1H 3 Pro-H(β)), 3,21 - 3,50 (m, 4H, Pro-H(δ) + Trp-H(β)), 3,63 (s, 3H, COOCH₃), 4,25 (dd, 1H, ³J_{H ae} = 4,6 Hz, ³J_{H aa} = 8,2 Hz, Pro-H(α)), 4,73 - 4,83 (m, 1H, Trp-H(α)), 5,40 (s, 2H, Bn-CH₂), 6,95 + 7,04 (2*ddd, 2H, ³J_H = 7,9 Hz, Inden-H(5) + Inden-H(6)), 7,13 (d, 1H, ³J_H = 1,7 Hz, Inden-H(2)), 7,32 + 7,54 (2*d, 2H, Inden-H(4) + Inden-H(7)), 7,34 - 7,48 (m, 5H, Bn-H), 8,10 (s, b, 1H, 5-AIS-H(6)), 8,24 (s, b, 1H, 5-AIS-H(4)), 8,40 (s, b, 1H, 5-AIS-H(2)), 8,64 (s, b, 1H, Trp-C(α)NH), 9,98 (s, 1H, 5-AIS-NH), 10,53 (s, b, 1H, ³J_H = 1,7 Hz, Inden-NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3320 (m,b), 3062(w), 2977(w), 2883(w), 1725(s), 1702(s), 1664(ss), 1601(m), 1561(m), 1536(m), 1453(s), 1422(s), 1367(m), 1231(s), 1165(s), 1126(m), 978(w), 900(w), 743(m), 697(w), 605(w), 539(w), 427(w)

C,H,N: ber.: C: 65,57% H: 6,10% N: 8,27% C₃₇H₄₀N₄O₈*0,5 H₂O
gef.: C: 65,63% H: 6,11% N: 7,99% M = 677,75 g/mol

Hexapeptid Boc-[Pro-5-AIS(Trp-OMe)]-[Pro-5-AIS(OBn)]₂-OAlI (56)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden 2,94 g (3,4 mmol) 17 an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode II (Ausbeute 2,55 g (94%)) und 2,14 g (3,2 mmol) 61 an der benzylveresterten Carboxylgruppe nach Methode IV (Ausbeute 1,81 g (100%)) entschützt. Als Lösungsmittel wurden jedoch 100 ml 1,4-Dioxan/Wasser 9:1 verwendet

Peptidkupplung: 2,55 g (3,2 mmol) 18, 1,81 g (3,2 mmol) 55 und 1,13 g (3,5 mmol) TBTU wurden in 100 ml trockenem DMF, p.a. gelöst. Nach Zugabe von 1,78 ml (10,2 mmol) DIEA ließ man über Nacht rühren. Die Reaktionslösung wurde in 500 ml Wasser gegossen. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über P₄O₁₀ im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 3,86 g (91%)

MS (FAB): [M + Na⁺] bei m/z = 1341, Intensität = 7%

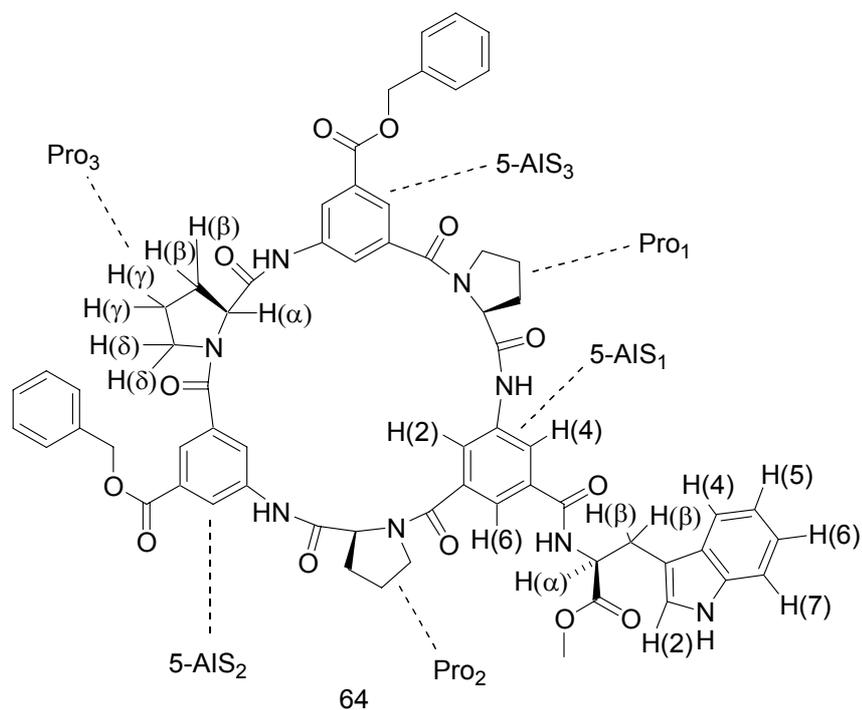
Darstellung des Cyclopeptids *cyclo*-{[Pro-5-AIS(Trp-OMe)]-[Pro-5-AIS(OBn)]₂} (64)

Entschützungen: Vor der Cyclisierung wurden 3,65 g 56 (2,8 mmol) zunächst an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III entschützt. Der nach dem Einengen der Reaktionslösung verbliebene Rückstand war jedoch nicht vollständig in reinem Essigsäureethylester löslich. Daher wurde der Rückstand erst in Chloroform gelöst und diese Lösung dann mit Essigsäureethylester so verdünnt, daß eine klare Lösung erhalten wurde. Diese Lösung wurde dann entsprechend der allgemeinen Vorschrift weiter aufgearbeitet. Das Produkt wurde anschließend an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode II (Ausbeute über beide Stufen: 3,04 g (90%)) entschützt.

Cyclisierung: 3,04 g (2,5 mmol) vollständig entschütztes Hexapeptid 63 wurden in einen Reaktionskolben eingewogen und dreimal sekuriert. Es wurden 250 ml entgastes DMF p.A. und 1,83 ml DIEA (10,5 mmol) im Schutzgasgegenstrom zugegeben. Die Lösung wurde mit einem bereits vorgeheizten Ölbad auf 90°C erwärmt. Dann wurde bei konstanter Temperatur durch ein Septum eine Lösung von 0,88 g (2,8 mmol) TBTU in 10 ml DMF p.A. mit einem Perfusor über 2 h zugetropft. Die Reaktionslösung wurde noch 3 h bei 90°C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum bei 40°C abkondensiert. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: 1. Dichlormethan/Isopropanol 10:1, 2. Chloroform/Aceton 2:1). Nach Umkristallisieren aus Methanol wurde ein weißer Feststoff erhalten, der im Turbomolekularpumpenvakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 0,63 g (22%)
Smp: 215°C
 $[\alpha]_D^{25}$: -30,7°, c=1, Chloroform
MS (FAB): $[M + Na^+]$ bei m/z = 1183, Intensität = 17%

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, DMSO- d_6 , TMS) δ [ppm] 1,80 - 2,09 (m, 9H, Pro $_{1+2+3}$ -H(β)+ Pro $_{1+2+3}$ -H(γ)), 2,26 - 2,35 (m, 3H, Pro $_{1+2+3}$ -H(β)), 3,19 - 3,50 (m, 8H, Pro $_{1+2+3}$ -H(δ) + Trp-H(β)), 3,65 (s, 3H, COOCH $_3$), 4,62 - 4,68 (m, 3H, Pro $_{1+2+3}$ -H(α)), 4,68 - 4,74 (m, 1H, Trp-H(α)), 5,34 - 5,41 (m, 4H, Bn-CH $_2$), 6,98 + 7,06 (2*ddd, 2H, Inden-H(5) + Inden-H(6)), 7,20 (d, 1H, $^3J_{\text{H}} = 2,1$ Hz, Inden-H(2)), 7,33 + 7,58 (2*d, 2H, $^3J_{\text{H}} = 7,9$ Hz, Inden-H(4) + Inden-H(7)), 7,35 - 7,53 (m, 10H, Bn-H), 7,60 (s, b, 1H, 5-AIS $_1$ -H(6)), 7,66 - 7,69 (m, 2H, 5-AIS $_{2+3}$ -H(6)), 7,70 (s, b, 1H, 5-AIS $_1$ -H(4)), 7,90 + 7,91 (2*t, 2H, $^3J_{\text{H}} = 1,7$ Hz, 5-AIS $_{2+3}$ -H(4)), 8,49 (s, b, 1H, 5-AIS $_1$ -H(2)), 8,66 + 8,67 (2*t, 2H, $^3J_{\text{H}} = 1,7$ Hz, 5-AIS $_{2+3}$ -H(2)), 8,98 (d, 1H, $^3J_{\text{H}} = 7,7$ Hz, Trp-C(α)NH), 10,49 (s, 1H, 5-AIS $_1$ -NH), 10,59 + 10,60 (2*s, 2H, 5-AIS $_{2+3}$ -NH), 10,85 (s, b, 1H, $^3J_{\text{H}} = 2,1$ Hz, Inden-NH)



IR (in KBr): $[\text{cm}^{-1}]$ 3285(s,b), 3066(m), 2953(m), 2880(m), 1724(ss), 1625(ss), 1597(ss), 1558(s), 1440(ss), 1416(s), 1376(s), 1322(s), 1301(ss), 1262(s), 1212(s), 1112(s), 1002(w), 973(m), 901(w), 898(m), 747(s), 698(s), 643(m), 601(m), 489(m), 426(m)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 64,24%	H: 5,47%	N: 9,22%	$C_{65}H_{60}N_8O_{13} \cdot 3 H_2O$
	gef.:	C: 64,00%	H: 5,38%	N: 9,06%	M = 1215,28 g/mol

Darstellung des Cyclopeptids *cyclo*-{[Pro-5-AIS(Trp-OMe)]-[Pro-5-AIS(Asp(OBn)-O_iPr)]₂} (66)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden 0,20 g (0,17 mmol) 64 an den benzylveresterten Carboxylgruppen nach Methode IV (Ausbeute 0,17 g (100%)) entschützt. Es wurde ein rötliches Produkt erhalten. Als Lösungsmittel wurde dabei eine Mischung aus 75 ml Methanol und 30 ml Methylenchlorid verwendet, um die entstehende Dicarbonsäure 65 in Lösung zu halten. 1,67 g (4,4 mmol) 30 wurden an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 1,40 g (99%)) entschützt.

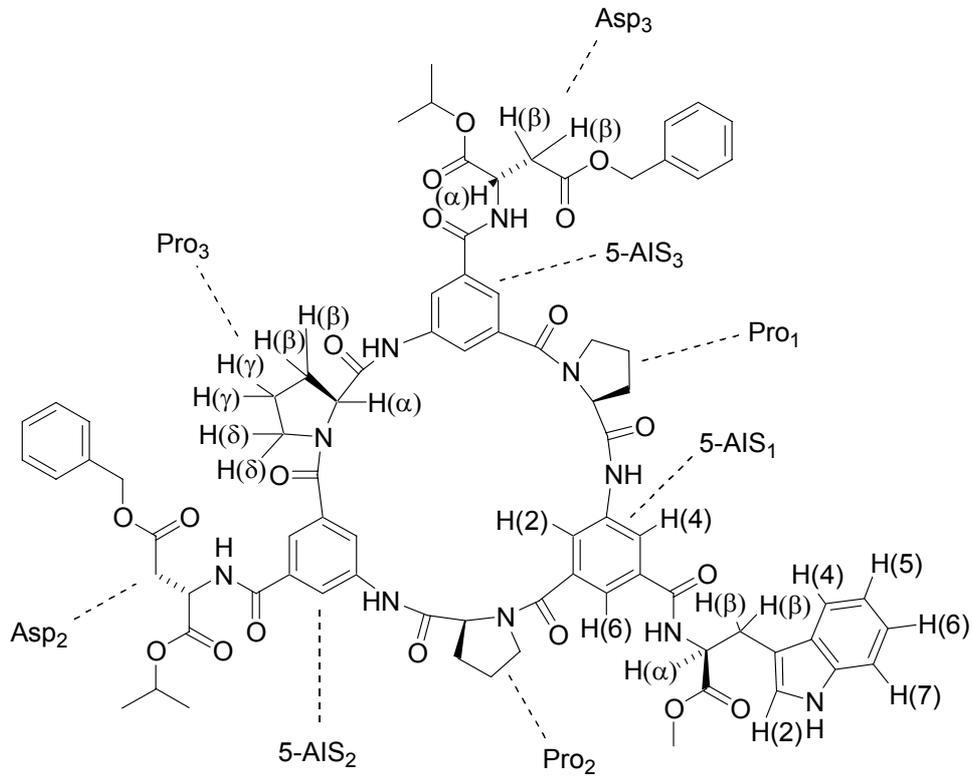
Peptidkupplung: 0,17 g (0,17 mmol) 65 wurden in 25 ml trockenem Dichlormethan suspendiert und 0,15 g 28 (0,51 mmol) sowie 0,22 g (0,51 mmol) PyCloP in dieser Suspension gelöst. Nach Zugabe von 0,27 ml (1,53 mmol) DIEA wurde die Lösung innerhalb von 6 h klar. Nach 48 h Rühren wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal säulenchromatographisch gereinigt (1. Laufmittel: Chloroform/Aceton 1:2, 2. Laufmittel: Methylenchlorid/Isopropanol 10:1). Die sauberen Fraktionen wurden im Vakuum eingeeengt und das Produkt zwei Tage im Ölpumpenvakuum bei 50°C getrocknet. Es konnte allerdings kein analysenreines Produkt erhalten werden.

Ausbeute: 0,17 g (67%)

MS (FAB): [M + Na⁺] bei m/z = 1498, Intensität = 16%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,16 + 1,17 (2*d, 2*6H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 1,80 - 2,10 (m, 9H, Pro₁₊₂₊₃-H(β) + Pro₁₊₂₊₃-H(γ)), 2,25 - 2,35 (m, 3H, Pro₁₊₂₊₃-H(β)), 2,949 + 2,946 (2*m, 2*2H, 2*²J_H= 16,3 Hz, Asp₂₊₃-H(β)), 3,20 - 3,52 (m, 8H, Pro₁₊₂₊₃-H(δ) + Trp-H(β)), 3,65 (s, 3H, COOCH₃), 4,65 - 4,75 (m, 4H, Pro₁₊₂₊₃-H(α) + Trp-H(α)), 4,80 - 4,87 (m, 2H, Asp₂₊₃-H(α)), 4,88-4,97 (m, 2*1H, ³J_H= 6,2 Hz, CH(CH₃)₂), 5,16 (s, 4H, Bn-CH₂), 6,98 + 7,06 (2*ddd, 2H, Inden-H(5) + Inden-H(6)), 7,21 (d, 1H, ³J_H= 2,4 Hz, Inden-H(2)), 7,26 - 7,38 (m, 11H, Bn-H + Inden-H(7)), 7,55 - 7,64 (m, 4H, 5-AIS₁₊₂₊₃-H(6) + Inden-H(4)), 7,70 - 7,76 (m, 3H, 5-AIS₁₊₂₊₃-H(4)), 8,52 (s, b, 1H, 5-AIS₁-H(2)), 8,57 + 8,59 (2*s, b, 2H, 5-AIS₂₊₃-H(2)), 8,98 (d, 1H, ³J_H= 7,7 Hz, Trp-C(α)NH), 9,041 + 9,047 (2*d, 2*1H, 2*³J_H= 8,1 Hz, Asp₂₊₃-NH), 10,50 (s, 1H, 5-AIS₁-NH), 10,54 (s,

2H, 5-AIS₂₊₃-NH), 10,85 (s, b, 1H, ³J_H = 1,9 Hz, Inden-NH)



66

4.5.8 Synthese von phosphorhaltigen Peptiden und Aminosäuren

Darstellung von 4-Brom-((S)-2-(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino)-buttersäureisopropylester (71)

Entschützung: 1,90 g (5,0 mmol) 30 wurden an der benzylveresterten Carboxylgruppe nach Methode IV (Ausbeute 1,44 g (100%)) entschützt. Als Lösungsmittel wurden dabei 125 ml einer 9:1 Mischung aus 1,4-Dioxan und Wasser verwendet.

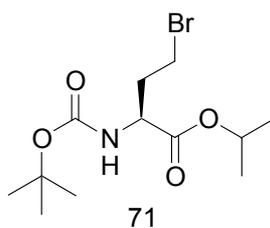
Oxidative Decarboxylierung:^[55,56] 1,45 g (5,0 mmol) 70 wurden in 25 ml getrocknetem und entgastem THF gelöst und auf -15°C abgekühlt. Es wurden nacheinander 0,56 ml (5,0 mmol) *N*-Methylmorpholin und 0,65 ml (5,0 mmol) Chlorameisensäureisobutylester zugegeben. Nach 10 Minuten Rühren wurde eine Lösung von 0,76 g (6,0 mmol) *N*-Hydroxypyridin-2-thion und 0,83 ml (6,0 mmol) Triethylamin in 20 ml getrocknetem und entgastem THF so zugetropft, daß die Innentemperatur -15°C nicht überstieg. Nach 30 Minuten Rühren filtrierte man die Lösung vom Niederschlag ab, entfernte das Lösungsmittel im Vakuum bei T<35°C und nahm den Rückstand in 75 ml entgastem Bromtrichlormethan auf. Die Lösung wurde für 25 Minuten mit einer 100 W-UV-Lampe bei T<20° bestrahlt, dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Laufmittel *n*-Hexan / Essigsäureethylester 1:1) gereinigt. Das zurückbleibende gelbliche Öl wurde aus *n*-Hexan bei -26°C umkristallisiert. Da der erhaltene farblose Feststoff gemäß der Elementaranalyse noch nicht sauber war, sublimierte ich ihn im Hochvakuum bei 60°C um. Das Ergebnis der Elementaranalyse wich jedoch immer noch erheblich von den theoretischen Werten ab.

Ausbeute: 0,37 g (23%)

MS (CI): [M + NH₄⁺] bei m/z = 341 (⁷⁹Br), Intensität = 95%

[M + NH₄⁺] bei m/z = 343 (⁸¹Br), Intensität = 100%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ 1,17 + 1,19 (2*d, 2*3H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 1,39 (s, 9H, *t*Bu), 2,05 - 2,17 (m, 2H, Glu-H(β)), 3,46 - 3,60 (m, 2H, Glu-H(γ)), 4,00 - 4,07 (m, 1H, Glu-H(α)), 4,90 (sept, 1H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 7,30 (d, 1H, ³J_H= 7,9 Hz NH)



Darstellung von *cyclo*-[Pro-5-AIS(Val-PO₃Et₂)]₃ (74)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden 0,28 g (0,27 mmol) 22 an den benzylveresterten Carboxylgruppen nach Methode IV (Ausbeute 0,21 g (100%)) entschützt. Als Lösungsmittel wurde dabei eine Mischung aus 110 ml Methanol und 45 ml Methylenchlorid verwendet, um die entstehende Tricarbonsäure 4 in Lösung zu halten.

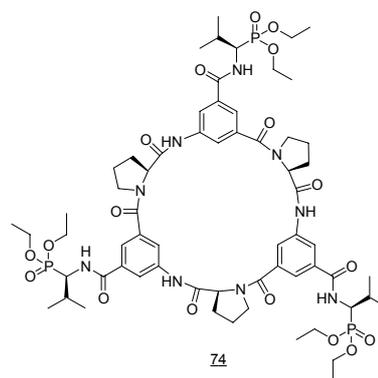
Peptidkupplung: 0,21 g (0,27 mmol) 4 wurden in 40 ml trockenem Dichlormethan suspendiert und 0,25 g (1,2 mmol) 73 sowie 0,51 g (1,2 mmol) PyCloP in dieser Suspension gelöst. Nach Zugabe von 0,42 ml (2,4 mmol) DIEA wurde die Lösung innerhalb von 6 h klar. Nach 48 h Rühren wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel: Methylenchlorid/Methanol 10:1) gereinigt. Die DC-Platten wurden dabei nicht nur unter der UV-Lampe betrachtet, sondern auch mit Molybdätophosphorsäure angefärbt. Die sauberen Fraktionen wurden im Vakuum eingeeengt und das saubere Produkt im Turbomolekularpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,30 g (83%)

Smp: >250°C

MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 1354, Intensität = 100%
[M + Na⁺] bei m/z = 1376, Intensität = 32%

¹H-NMR: (200 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,04 + 0,99 (2*d, 18H, ³J_H = 6,7 Hz, *i*Pr-CH₃), 1,17 + 1,24 (2*t, 18H, ³J_H = 7,0 Hz, 2*CH₂CH₃), 1,79 - 2,37 (m, 18H, Pro-H(β) + Pro-H(γ) + *i*Pr-CH), 3,39 - 3,58 (m, 6H, Pro-H(δ)), 3,91 - 4,14 (m, 12H, 2*CH₂CH₃), 4,30 (ddd, 3H, ³J_H(CH) = 8,0 Hz, ³J_H(NH) = 9,5 Hz, ²J_{PH} = 17,0 Hz, Val-H(α)) 4,69 (dd, 3H, ³J_{H ac} = 3,3 Hz, ³J_{H aa} = 8,3 Hz, Pro-H(α)), 7,70 (s, 3H, 5-AIS-H(6)), 7,72 (s, 3H, 5-AIS-H(4)), 8,56 (s, 3H, 5-AIS-H(2)), 8,51 (d, 3H, ³J_H = 9,5 Hz, Val-NH), 10,52 (s, 3H, 5-AIS-NH)



³¹P{¹H}-NMR: (81 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] 25,87 (s, PO(OEt)₂)

IR (Diamant): [cm⁻¹] 3290(m,b), 2973(s), 2932(m), 2912(m), 2880(w), 1623(s), 1595(s), 1534(s), 1441(s), 1412(s), 1369(w), 1327(m), 1308(m), 1214(s), 1162(s), 1095(w), 1010(ss), 964(s,b), 895(w), 842(s), 682(m)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 50,50%	H: 7,13%	N: 8,41%	$C_{63}H_{90}N_9O_{18}P_3 \cdot 8 H_2O$
	gef.:	C: 50,77%	H: 6,88%	N: 8,03%	M = 1498,50 g/mol

Darstellung von (77) [140]

2,00 g (7,43 mmol) Phthalimidomethylphosphonsäuredimethylester und 0,38 ml (7,80 mmol) Hydrazinhydrat wurden in 12 ml Methanol gelöst, für 80 h gerührt und danach filtriert. Der Rückstand wurde in 10 ml Wasser aufgenommen und mit 7,7 ml 1N HCL-Lösung (7,7 mmol) versetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei Raumtemperatur entfernt und das Produkt im Turbomolekularpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,10 g (85%)

Das 1H -NMR-Spektrum des Produkts entspricht dem Literaturspektrum.

4.6 Synthesen von Peptiden mit Aminoterephthalsäure

4.6.1 Synthese des Cyclopeptids *cyclo*-[Pro-ATS(OBn)]₃ (**93**)

Darstellung von N-Carboxyamino-terephthalsäureanhydrid(**80**)^[141]

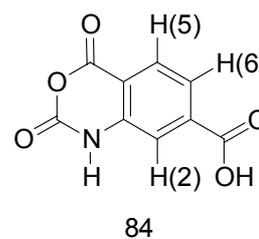
6,00 g (33,1 mmol) Aminoterephthalsäure und 3,28 g (11,1 mmol) Triphosgen wurden in einen Kolben eingewogen und dreimal sekuriert. 160 ml trockenes THF wurde im Schutzgasgegenstrom zugegeben und man ließ für 2,5 h bei 50°C rühren. Die etwas trübe Lösung wurde filtriert und das Filtrat in 200 ml *n*-Hexan gegossen. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert, mit *n*-Hexan gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 6,33 g (92%) (Lit.: 97%)

MS (CI): [M + NH₄⁺] bei m/z = 225, Intensität = 70%

[M + NH₃ + NH₄⁺] bei m/z = 242, Intensität = 100%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 7,69 (d, 1H, ⁴J_H = 1,3 Hz, ATS-H(2)), 7,72 (dd, 1H, ⁴J_H = 1,3 Hz, ³J_H = 8,2 Hz, ATS-H(6)), 8,02 (d, 1H, ³J_H = 8,2 Hz, ATS-H(5)), 11,87 (s, 1H, NH), 13,63 (s, b, 1H, COOH)



Darstellung von H-ATS(OBn)-OH (**83**)^[142]

3,32 g (16,0 mmol) **80** wurden in einen Kolben eingewogen und dreimal sekuriert. Im Schutzgasgegenstrom wurden 120 ml entgaster Benzylalkohol und 2,74 ml (16,0 mmol) DIEA zugegeben und die Lösung auf 70°C erwärmt. Nachdem der gesamte Feststoff in Lösung gegangen war, wurden 0,34 g (2,6 mmol) DMAP im Schutzgasgegenstrom zugegeben, worauf eine lebhafte CO₂-Entwicklung einsetzte. Man ließ noch 2 h bei 70°C rühren. Die abgekühlte Lösung wurde in 300 ml 10% Na₂CO₃-Lösung gegossen. Nach Zugabe von 300 ml *n*-Hexan bildeten sich drei Phasen. Daher wurden die organischen Phasen mit soviel Diethylether verdünnt, bis nur noch zwei Phasen zu beobachten waren. Die organische Phase wurde nun dreimal mit 10% Na₂CO₃-Lösung extrahiert. Durch Zugabe von KHSO₄ wurde die wäßrige Phase auf pH 7,5 abgestumpft und dann viermal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Da das Produkt noch Reste Benzylalkohol enthielt, wurde es mit kaltem *n*-Hexan gewaschen und dann im Ölpumpenvakuum bei 50°C getrocknet.

<u>Ausbeute:</u>	4,00 g (92%)
<u>Smp:</u>	199°C
<u>MS (CI):</u>	[M + H ⁺] bei m/z = 272, Intensität = 92% [M + NH ₄ ⁺] bei m/z = 289, Intensität = 100% [M + NH ₃ + NH ₄ ⁺] bei m/z = 306, Intensität = 27%
<u>¹H-NMR:</u>	(500 MHz, DMSO-d ₆ , TMS) δ [ppm] 5,31 (s, 2H, Bn-CH ₂), 6,84 (s, 2H, NH ₂), 7,03 (dd, 1H, ⁴ J _H = 1,7 Hz, ³ J _H = 8,4 Hz, ATS-H(6)), 7,33-7,48 (m, 5H, Bn-H), 7,42 (d, 1H, ⁴ J _H = 1,7 Hz, ATS-H(2)), 7,81 (d, 1H, ³ J _H = 8,4 Hz, ATS-H(5))
<u>IR (in KBr):</u>	[cm ⁻¹] 3495(s), 3383(s), 3089(w), 3036(w), 2954(w), 2881(w), 2881(w), 2710(w), 2662(w), 2539(w), 1691(ss), 1622(m), 1580(s), 1499(m), 1442(m), 1380(w), 1322(m), 1301(s), 1241(ss), 1112(m), 1030(w), 945(w), 896(w), 772(m), 751(s), 728(m), 692(m), 580(w), 511(w), 425(w),
<u>C,H,N:</u>	ber.: C: 66,42% H: 4,83% N: 5,16% C ₁₅ H ₁₃ NO ₄ gef.: C: 66,23% H: 4,90% N: 4,96% M = 271,27 g/mol

Darstellung von H-ATS(OBn)-OAll (84)

In 200 ml DMF, p.A. ließ man 3,75 g (13,8 mmol) **83**, 3,53 ml (41,4 mmol) Allylbromid und 3,48 g (41,4 mmol) NaHCO₃ über Nacht rühren. Dann wurde die Reaktionslösung in 420 ml Essigsäureethylester gegossen und zweimal mit 10% Na₂CO₃-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde aus Toluol/*n*-Hexan umkristallisiert. Das Produkt kristallisierte als gelber Feststoff.

<u>Ausbeute:</u>	3,58 g (83%)
<u>Smp:</u>	71°C
<u>MS (CI):</u>	[M + H ⁺] bei m/z = 312, Intensität = 100% [M + NH ₄ ⁺] bei m/z = 329, Intensität = 52% [M + NH ₃ + NH ₄ ⁺] bei m/z = 346, Intensität = 9%
<u>¹H-NMR:</u>	(500 MHz, DMSO-d ₆ , TMS) δ [ppm] 4,79 (ddd, 2H, ³ J _H = 5,4 Hz, CH ₂ CH=CH ₂), 5,29 (ddt, 1H, ³ J _H = 10,5 Hz, ² J _H = 1,5 Hz, CH ₂ CH=CH ₂ , <i>cis</i> H), 5,32 (s, 2H, Bn-CH ₂), 5,40 (ddt, 1H, ³ J _H = 17,2 Hz, ² J _H = 1,5 Hz,

CH₂CH=CH₂, *trans* H), 5,99 - 6,08 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 6,91 (s, 2H, NH₂), 7,01 (dd, 1H, ⁴J_H = 1,7 Hz, ³J_H = 8,4 Hz, ATS-H(6)), 7,33-7,48 (m, 5H, Bn-H), 7,49 (d, 1H, ⁴J_H = 1,7 Hz, ATS-H(2)), 7,85 (d, 1H, ³J_H = 8,4 Hz, ATS-H(5))

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3471(s), 3362(s), 3080(m), 2996(m), 2931(m), 2876(m), 1719(s), 1687(s), 1650(m), 1621(m), 1589(m), 1560(m), 1497(m), 1453(m), 1438(m), 1378(w), 1303(s), 1265(s), 1235(s), 1119(s), 992(m), 947(m), 904(w), 749(m), 730(m), 691(m), 567(w), 546(w)

<u>C,H,N</u> :	ber.:	C: 69,44%	H: 5,50%	N: 4,50%	C ₁₈ H ₁₇ NO ₄
	gef.:	C: 69,68%	H: 5,55%	N: 4,23%	M = 311,34 g/mol

Darstellung des Dipeptids Boc-Pro-ATS(OBn)-OAll (85)

Peptidkupplung: 3,55 g (11,4 mmol) 84, 3,65 g (17,1 mmol) Boc-Prolin und 7,14 g (17,1 mmol) PyCloP wurden in 270 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 5,93 ml (34,2 mmol) DIEA zugetropft und die Lösung für 1 Woche gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Laufmittel: Toluol/Essigsäureethylester 4:1) gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden zur Trockene eingengt und das Produkt im Ölpumpenvakuum kristallisiert. Bei einer Reaktionszeit von 4 Wochen erhöhte sich die Ausbeute auf 99%.

Ausbeute: 4,46 g (77%) nach 1 Woche Reaktionszeit
5,76 g (99%) nach 4 Wochen Reaktionszeit

Smp: 94°C

[α]_D²⁵: -82,0°(c=1, CHCl₃)

MS (CI): [M + H⁺ - Boc] bei m/z = 409, Intensität = 10%
[M + H⁺] bei m/z = 509, Intensität = 66%
[M + NH₄⁺] bei m/z = 526, Intensität = 100%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100°C) δ [ppm] 1,34 (s, 9H, *t*Bu), 1,80 - 1,86 (m, 1H, Pro-H(β)), 1,86 - 2,04 (m, 2H, Pro-H(γ)), 2,16 - 2,31 (m, 1H 3 Pro-H(β)), 3,38 - 3,54 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,23 (dd, 1H, ³J_{H ac} = 4,2 Hz, ³J_{H aa} = 8,4 Hz, Pro-H(α)), 4,83 (ddd, 2H, ³J_H = 5,4 Hz, CH₂CH=CH₂), 5,28 (ddt, 1H, ³J_H = 10,4 Hz, ²J_H = 1,5 Hz, CH₂CH=CH₂, *cis* H), 5,40 (s, 2H,

Bn-CH₂), 5,40 (ddt, 1H, ³J_H= 17,4 Hz, ²J_H= 1,5 Hz, CH₂CH=CH₂, *trans* H), 5,97 - 6,11 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 7,31-7,50 (m, 5H, Bn-H), 7,73 (dd, 1H, ⁴J_H= 1,7 Hz, ³J_H= 8,2 Hz, ATS-H(6)), 8,10 (d, 1H, ³J_H= 8,2 Hz, ATS-H(5)), 9,06 (s,b 1H, ATS-H(2)), 10,88 (s, 1H, NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3218(w), 2973(m), 2932(w), 2932(w), 2894(w), 1729(s), 1698(ss), 1579(s), 1525(s), 1459(m), 1421(m), 1379(s), 1302(s), 1254(s), 1207(m), 1164(m), 1118(s), 1088(m), 1030(w), 975(w), 956(w), 932(w), 920(w), 887(w), 799(w), 756(m), 740(m), 695(w), 559(w), 479(w)

<u>C,H,N</u> :	ber.:	C: 66,13%	H: 6,34%	N: 5,51%	C ₂₈ H ₃₂ N ₂ O ₇
	gef.:	C: 66,33%	H: 6,52%	N: 5,48%	M = 508,57 g/mol

Darstellung des Tetrapeptids Boc-[Pro-ATS(OBn)]₂-OAll (88)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden je 4,10 g (8,1 mmol) 85 an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 3,60 g (100%)) und an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III (Ausbeute 3,76 g (99%)) entschützt.

Peptidkupplung: 3,76 g (8,1 mmol) 87, 3,60 g (8,1 mmol) 86 und 5,12 g (12,2 mmol) PyCloP wurden in 200 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 5,62 ml (32,4 mmol) DIEA wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das zurückbleibende Öl säulenchromatographisch (Laufmittel: Toluol/Essigsäureethylester 1:1) gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden zur Trockene eingengt. Das Produkt kristallisierte beim Trocknen im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 6,87 g (99%)

MS (CI): [M + NH₄⁺] bei m/z = 876, Intensität = 100%

Darstellung des Hexapeptids Boc-[Pro-ATS(OBn)]₃-OAll (90)

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden 6,30 g (7,3 mmol) 88 an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 5,83 g (100%)) und 4,47 g (8,8 mmol) 85 an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III (Ausbeute 4,08 g (99%)) entschützt.

Peptidkupplung: 4,08 g (8,7 mmol) 87, 5,83 g (7,3 mmol) 89 und 5,51 g (13,1 mmol) PyCloP wurden in 200 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 7,03 ml (33,5 mmol) DIEA ließ man über Nacht rühren. Das Lösungsmittel wurde vollständig im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Toluol/Essigsäureethylester 1:2). Die sauberen Fraktionen wurden vom Lösungsmittel befreit und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 6,18 g (70%)

MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 1209, Intensität = 2%

[M - Boc + H⁺] bei m/z = 1109, Intensität = 100%

Darstellung des Cyclopeptids *cyclo*-[Pro-ATS(OBn)]₃ (93)

Entschützungen: Vor der Cyclisierung wurden 3,03 g 90 (2,5 mmol) zunächst an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III entschützt. Das Produkt wurde dann an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode II (Ausbeute über beide Stufen: 2,76 g (100%)) entschützt.

Cyclisierung: 2,76 g (2,5 mmol) 92 wurden in einen Reaktionskolben eingewogen und dreimal sekuriert. Es wurden 250 ml entgastes DMF p.A. und 1,39 ml (8,0 mmol) DIEA im Schutzgasgegenstrom zugegeben. Die Lösung wurde mit einem bereits vorgeheizten Ölbad auf 90°C erwärmt. Dann wurde bei konstanter Temperatur durch ein Septum eine Lösung von 0,88 g (2,75 mmol) TBTU in 10 ml DMF p.A. mit einem Perfusor über 2 h zugetropft. Die Reaktionslösung wurde noch 3 h bei 90°C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum bei 40°C abkondensiert. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: 1. Dichlormethan/Isopropanol 10:1, 2. Chloroform/Aceton 2:1). Nach Umkristallisieren aus *i*-Propanol wurde ein weißer Feststoff erhalten, der im Turbomolekularpumpenvakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 1,44 g (55%)

Smp: 179°C

[α]_D²⁵: -123,6° (c=1, CHCl₃)

MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 1051, Intensität = 100%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,79 - 2,03 (m, 9H, Pro-H(β) + Pro-H(γ)), 2,14 - 2,25 (m, 3H, Pro-H(β)), 3,34 - 3,48 (m, 6H, Pro-H(γ)), 4,69

(dd, 3H, $^3J_{\text{H ac}} = 3,2$ Hz, $^3J_{\text{H aa}} = 8,8$ Hz, Pro-H(α)), 5,40 (s, 6H, Bn-CH₂), 7,32 (dd, 3H, $^4J_{\text{H}} = 1,3$ Hz, $^3J_{\text{H}} = 8,2$ Hz, ATS-H(6)), 7,33 - 7,56 (m, 15H, Bn-H), 8,03 (d, 3H, $^3J_{\text{H}} = 8,2$ Hz, ATS-H(5)), 8,54 (d, 3H, $^4J_{\text{H}} = 1,3$ Hz, ATS-H(2)), 10,64 (s, 3H, NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3296(m,b), 3063(w), 3033(w), 2955(m), 2880(w), 1697(ss), 1638(ss), 1575(ss), 1525(s), 1423(ss), 1313(s), 1249(ss), 1179(s), 1139(s), 1077(s), 1030(w), 982(w), 910(m), 790(m), 750(s), 698(s), 602(w), 539(w), 467(w)

C,H,N: ber.: C: 67,41% H: 5,28% N: 7,86% C₆₀H₅₄N₆O₁₂*1 H₂O
gef.: C: 67,60% H: 5,22% N: 7,85% M = 1069,14 g/mol

4.6.2 Synthese von *cyclo*-[Pro-ATS(O⁻)]₃ (NBu₄⁺)₃ (94)

Entschützung: 0,23 g (0,22 mmol) 93 wurden nach Methode IV an den benzylveresterten Carboxylgruppen entschützt. Als Lösungsmittel wurden jedoch 60 ml 1,4-Dioxan/Wasser 9:1 verwendet. Da die freie Carbonsäure unter diesen Bedingungen aus der Reaktionslösung ausfiel, mußte das Lösungsmittel zunächst im Vakuum entfernt und gegen 200 ml Methylenchlorid/*i*-Propanol 5:1 ausgetauscht werden. Dann konnte die Produktlösung, in der noch der Katalysator suspendiert war, wie bei Methode IV beschrieben weiter aufgearbeitet werden.

Ausbeute: 0,19 g (98%)

C,H,N: ber.: C: 53,24% H: 5,38% N: 9,55% C₃₉H₃₆N₆O₁₂*5,5 H₂O
gef.: C: 53,58% H: 5,27% N: 9,15% M = 879,83 g/mol

Deprotonierung: 58,65 mg (66,69 μ mol) 78 wurden nach Methode V zum Tetra-*n*-butylammoniumsalz umgesetzt.

Ausbeute: 0,10 g (100%)

Smp: 100°C

$[\alpha]_D^{25}$: -12,9° (c=1, MeOH)

MS (ESI): [M - 2NBu₄⁺ + Na⁺] bei m/z = 1042, Intensität = 100%
[M - NBu₄⁺] bei m/z = 1261, Intensität = 51%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 0,93 (t, 36H, ³J_H= 7,4 Hz, *n*Bu-CH₃), 1,20 - 1,36 (m, 24H, *n*Bu-γCH₂), 1,48 - 1,63 (m, 24H, *n*Bu-βCH₂), 1,80 - 2,07 (m, 9H, Pro-H(β)+ Pro-H(γ)), 2,25 - 2,34 (m, 3H, Pro-H(β)), 3,07 - 3,20 (m, 24H, *n*Bu-αCH₂), 3,42 - 3,48 (m, 6H, Pro-H(δ)), 4,60 (dd, 3H, ³J_{H ae}= 3,7 Hz, ³J_{H aa}= 8,2 Hz, Pro-H(α)), 6,92 (d, 3H, ³J_H= 7,7 Hz, ATS-H(6)), 7,98 (d, 3H, ³J_H= 7,7 Hz, ATS-H(5)), 8,74 (s, b, ATS-H(2)), 14,81 (s, b, 3H, ATS-NH),

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 13,5 (*n*Bu-CH₃), 19,2 (*n*Bu-γCH₂), 23,0 (*n*Bu-βCH₂), 24,4 (Pro-C(γ)), 29,5 (Pro-C(β)), 49,0 (Pro-C(δ)), 57,5 (*n*Bu-αCH₂), 60,1 (Pro-C(α)), 116,9 (ATS-C(2)), 117,9 (ATS-C(6)), 125,9 (ATS-C(1)), 130,9 (ATS-C(5)), 139,1 (ATS-C(4)), 140,7 (ATS-C(3)), 168,6 (ATS-C(1)CO), 168,8 (Pro-CO), 169,2 (ATS-C(4)CO)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3422(m,b), 2962(s), 2875(s), 1686(s), 1632(s), 1573(s), 1511(ss), 1441(s), 1420(ss), 1350(s), 1291(s), 1265(m), 1180(m), 880(m), 805(m), 756(m), 708(w), 531(w), 473(w)

C,H,N: ber.: C: 66,89% H: 9,16% N: 8,07% C₈₇H₁₄₁N₉O₂₁*0,5 H₂O*1,5 MeOH
gef.: C: 66,94% H: 8,93% N: 8,21% M = 1553,19 g/mol

4.6.3 Synthese von *cyclo*-{Pro-ATS[OAsp(O⁻)-O*i*Pr]}₃ (NBu₄⁺)₃ (107)

Darstellung von H-ATS[Asp(OBn)-O*i*Pr]-OH (95)

1,04 g (5,0 mmol) 80 wurden in einem Kolben eingewogen und dreimal sekuriert. Im Schutzgasgegenstrom wurde eine Lösung von 1,81 g (6,0 mmol) 28 und 1,92 ml (11,0 mmol) DIEA in 15 ml DMF, p.A. zugegeben. Nachdem sich der Feststoff vollständig gelöst hatte, wurden 90 mg (0,75 mmol) DMAP zugegeben und die Lösung auf 60°C erwärmt. Man ließ noch 2 Tage bei 60°C rühren. Die abgekühlte Lösung wurde in 150 ml 10% Na₂CO₃-Lösung gegossen und dreimal mit Diethylether gewaschen. Durch Zugabe von KHSO₄ wurde die wäßrige Phase bis pH 4-5 angesäuert und dann viermal mit Essigsäureethylester extrahiert. Dies vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 5:1) und danach im Ölpumpenvakuum bei 50°C getrocknet.

Ausbeute: 1,20 g (56%)
Smp: 122°C
 $[\alpha]_D^{25}$ +33,3° (c = 1, CHCl₃)
MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 428, Intensität = 100%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,164 + 1,156 (2*d, 6H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 2,93 (m, 2H, ²J_H= 16,4 Hz, Asp-H(β)), 4,74 - 4,79 (m, 1H, Asp-H(α)), 4,91 (sept, 1H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 5,13 (s, 2H, Bn-CH₂), 6,48 (s, 2H, NH₂), 7,06 (dd, 1H, ⁴J_H= 1,3 Hz, ³J_H= 8,2 Hz, ATS-H(6)), 7,29 - 7,39 (m, 6H, Bn-H + ATS-H(2)), 7,51 (d, 1H, ³J_H= 8,2 Hz, ATS-H(5))

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3474(m), 3375(s), 3352(s), 3065(m), 2984(m), 2938(m), 1753(s), 1731(s), 1705(s), 1643(s), 1592(s), 1568(s), 1520(s), 1434(s), 1386(s), 1266(s), 1221(s), 1163(s), 1103(s), 961(s), 897(m), 875(m), 850(w), 827(m), 755(s), 700(m), 656(m), 549(m), 438(m)

<u>C,H,N:</u>	ber.:	C: 60,41%	H: 5,76%	N: 6,40%	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₇ *0,5 H ₂ O
	gef.:	C: 60,58%	H: 5,69%	N: 6,69%	M = 437,45 g/mol

Darstellung von H-ATS[Asp(OBn)-O*i*Pr]-OAlI (96)^[143]

1,00 g (2,33 mmol) 95 wurden in 15 ml DMF p.A. gelöst. Es wurden 0,76 g (2,33 mmol) Cs₂CO₃ in der Lösung suspendiert. Nach 1 h Rühren wurden 0,40 ml (4,66 mmol) Allylbromid zugegeben und man ließ für weitere 3 h rühren. Die ausgefallenen Salze wurden abfiltriert, das Filtrat in 40 ml Essigsäureethylester aufgenommen und diese Lösung einmal mit Wasser, zweimal mit 10% Na₂CO₃-Lösung und danach noch dreimal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,08 g (99%)
Smp: Öl
 $[\alpha]_D^{25}$ +35,0° (c = 1, CHCl₃)
MS (FAB): [M + H⁺] bei m/z = 469, Intensität = 51%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,162 + 1,154 (2*d, 6H, ³J_H= 6,3

Hz, CH(CH₃)₂), 2,93 (m, 2H, ²J_H= 16,4 Hz, Asp-H(β)), 4,74 - 4,78 (m, 1H, Asp-H(α)), 4,79 (ddd, 2H, ³J_H= 5,4 Hz, CH₂CH=CH₂), 4,90 (sept, 1H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 5,13 (s, 2H, Bn-CH₂), 5,29 (ddt, 1H, ³J_H= 10,7 Hz, ²J_H= 1,3 Hz, CH₂CH=CH₂, *cis*), 5,40 (ddt, 1H, ³J_H= 17,0 Hz, ²J_H= 1,3 Hz, CH₂CH=CH₂, *trans*), 6,00 - 6,19 (m, 1H, CH₂CH=CH₂), 6,58 (s, 2H, NH₂), 7,08 (dd, 1H, ⁴J_H= 1,7 Hz, ³J_H= 8,2 Hz, ATS-H(6)), 7,29 - 7,38 (m, 5H, Bn-H), 7,40 (d, 1H, ⁴J_H= 1,7 Hz, ATS-H(2)), 7,56 (d, 1H, ³J_H= 8,2 Hz, ATS-H(5)), 8,73 (d, 1H, ³J_H= 4,7 Hz, Asp-NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3449(s), 3363(s,b), 3065(m), 3035(m), 2984(m), 1713(ss), 1647(s), 1592(s), 1561(s), 1528(s), 1430(s), 1363(m), 1301(s), 1275(s), 1242(s), 1178(s), 1106(s), 986(s), 936(m), 901(m), 862(w), 828(w), 753(m), 698(m), 551(w), 508(w), 549(m), 438(m)

C,H,N: ber.: C: 64,09% H: 6,02% N: 5,98% C₂₅H₂₈N₂O₇
gef.: C: 64,15% H: 6,16% N: 5,94% M = 468,51 g/mol

Darstellung des Dipeptids Boc-{Pro-ATS[Asp(OBn)-O_iPr]}-OAlI (97)

Peptidkupplung: 1,00 g (2,1 mmol) 96, 0,68 g (3,2 mmol) Boc-Prolin und 1,35 g (3,2 mmol) PyCloP wurden in 50 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 1,11 ml (6,4 mmol) DIEA zugetropft und die Lösung 2 Wochen lang gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Laufmittel: Toluol/Essigsäureethylester 2:1) gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden zur Trockene eingengt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,23 g (87%)

Smp: Öl

[α]_D²⁵: -30,7° (c=1, CHCl₃)

MS (FAB): [M + Na⁺] bei m/z = 688, Intensität = 32%
[M - Boc + H⁺] bei m/z = 566, Intensität = 100%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS, 100°C) δ [ppm] 1,184 + 1,175 (2*d, 6H, ³J_H= 6,3 Hz, CH(CH₃)₂), 1,33 (s, 9H, *t*Bu), 1,77 - 1,88 (m, 1H, Pro-H(β)), 1,88 - 2,00 (m, 2H, Pro-H(γ)), 2,13 - 2,29 (m, 1H 3 Pro-H(β)), 2,96 (m, 2H, Asp-H(β)), 3,34 - 3,52 (m, 2H, Pro-H(δ)), 4,18 (dd, 1H, ³J_{H ac}= 3,9 Hz, ³J_{H aa}= 8,7 Hz, Pro-H(α)), 4,78 - 4,88 (m, 3H, Asp-H(α) + CH₂CH=CH₂), 4,93

(sept, 1H, $^3J_{\text{H}} = 6,3$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 5,13 (s, 2H, Bn- CH_2), 5,29 (ddt, 1H, $^3J_{\text{H}} = 10,5$ Hz, $^2J_{\text{H}} = 1,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, *cis*), 5,41 (ddt, 1H, $^3J_{\text{H}} = 17,4$ Hz, $^2J_{\text{H}} = 1,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, *trans*), 5,98 - 6,12 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 7,27 - 7,39 (m, 5H, Bn- H), 7,70 (dd, 1H, $^4J_{\text{H}} = 1,3$ Hz, $^3J_{\text{H}} = 8,2$ Hz, ATS- $\text{H}(6)$), 7,79 (d, 1H, $^3J_{\text{H}} = 8,2$ Hz, ATS- $\text{H}(5)$), 8,97 (s, b, 1H, Asp-N H), 9,03 (d, 1H, $^4J_{\text{H}} = 1,3$ Hz, ATS- $\text{H}(2)$), 11,05 (s, b, 1H, ATS-N H)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3308(w,b), 2981(s), 2937(m), 2882(w), 1730(ss), 1697(ss), 1610(m), 1578(s), 1524(ss), 1454(s), 1388(s), 1245(ss), 1107(s), 987(m), 920(m), 756(ss), 699(m), 667(w), 470(w)

<u>C,H,N</u> :	ber.:	C: 63,15%	H: 6,51%	N: 6,31%	C ₃₅ H ₄₃ N ₃ O ₁₀
	gef.:	C: 63,38%	H: 6,76%	N: 6,26%	M = 665,74 g/mol

Darstellung des Tetrapeptids Boc- $\{\text{Pro-ATS}[\text{Asp}(\text{OBn})\text{-O}i\text{Pr}\}_2\text{-OAlI (100)}$

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden je 0,80 g (1,2 mmol) 97 an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 0,72 g (100%)) und an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III (Ausbeute 0,75 g (100%)) entschützt.

Peptidkupplung: 0,72 g (1,2 mmol) 98, 0,75 g (1,2 mmol) 86 und 0,76 g (1,8 mmol) PyCloP wurden in 30 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 0,83 ml (4,8 mmol) DIEA wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das zurückbleibende Öl säulenchromatographisch (Laufmittel: Toluol/Essigsäureethylester 1:2) gereinigt. Die sauberen Fraktionen wurden zur Trockene eingengt. Das Produkt erstarrte beim Trocknen im Ölpumpenvakuum.

Ausbeute: 1,26 g (90%)

MS (FAB): [M + Na⁺] bei m/z = 1195, Intensität = 25%

Darstellung des Hexapeptids Boc- $\{\text{Pro-ATS}[\text{Asp}(\text{OBn})\text{-O}i\text{Pr}\}_3\text{-OAlI (102)}$

Entschützungen: Vor der Peptidkupplung wurden 1,18 g (1,0 mmol) 100 an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode I (Ausbeute 1,10 g (99%)) und 0,80 g (1,2 mmol) 97 an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III (Ausbeute 0,75 g (100%)) entschützt.

Peptidkupplung: 0,75 g (1,2 mmol) 99, 1,10 g (1,0 mmol) 101 und 0,76 g (1,8 mmol) PyCloP wurden in 300 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 0,83 ml (4,8 mmol) DIEA ließ man über Nacht rühren. Die Lösung wurde im Vakuum vollständig vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Essigsäureethylester). Die sauberen Fraktionen wurden im Vakuum zur Trockene eingengt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,53 g (91%)

MS (FAB): $[M + Na^+]$ bei $m/z = 1703$, Intensität = 31%

Darstellung des Cyclopeptids *cyclo*-{Pro-ATS[Asp(OBn)-O*i*Pr]}₃ (105)

Entschützungen: Vor der Cyclisierung wurden 1,40 g 102 (0,83 mmol) zunächst an der allylveresterten Carboxylgruppe nach Methode III entschützt. Das Produkt wurde dann an der Boc-geschützten Aminogruppe nach Methode II (Ausbeute über beide Stufen: 1,29 g (99%)) entschützt.

Cyclisierung: 0,92 g (2,85 mmol) TBTU wurden in einen Reaktionskolben eingewogen und dreimal sekuriert. Es wurden 120 ml entgastes DMF p.A. und 0,24 ml (1,37 mmol) DIEA im Schutzgasgegenstrom zugegeben. Die Lösung wurde mit einem bereits vorgeheizten Ölbad auf 85°C erwärmt. Dann wurde bei konstanter Temperatur durch ein Septum eine Lösung von 0,90 g (0,20 mmol) 104 und 0,30 ml (1,71 mmol) DIEA in 30 ml entgastem DMF p.A. mit einem Perfusor über 3 h zugetropft. Die Reaktionslösung wurde noch 1 h bei 85°C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum bei 40°C abkondensiert. Das Rohprodukt wurde zweimal über Kieselgelsäulen (Laufmittel: 1. Dichlormethan/Isopropanol 10:1, 2. Chloroform/Aceton 3:2) und danach einmal über eine RP-8-Säule (Laufmittel: 1,4-Dioxan/Wasser 1:5 → 1,4-Dioxan/Wasser 1:1 → 1,4-Dioxan/Wasser 2:1) gereinigt. Das saubere Produkt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels im Turbomolekularpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,69 g (80%)

Smp: 134°C

$[\alpha]_D^{25}$: -103,7° (c=1, CHCl₃)

MS (FAB): $[M + Na^+]$ bei $m/z = 1545$, Intensität = 100%

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 1,200 + 1,186 (2*d, 18H, ³J_H = 6,3

Hz, CH(CH₃)₂), 1,81 - 2,08 (m, 9H, Pro-H(β)+ Pro-H(γ)), 2,20 - 2,36 (m, 3H, Pro-H(β)), 2,99 (m, 6H, ²J_H= 16,5 Hz, Asp-H(β)), 3,36 - 3,50 (m, 6H, Pro-H(δ)), 4,67 (dd, 3H, ³J_{H ac}= 3,1 Hz, ³J_{H aa}= 8,2 Hz, Pro-H(α)), 4,84-4,92 (m, 3H, Asp-H(α)), 4,95 (sept, 3H, ³J_H= 6,2 Hz, CH(CH₃)₂), 5,14 (s, 6H, Bn-CH₂), 7,28-7,41 (m, 18H, Bn-H + ATS-H(6)), 7,74 (d, 3H, ⁴J_H= 8,3 Hz, ATS-H(5)), 8,58 (d, 3H, ³J_H= 1,5 Hz, ATS-H(2)), 9,30 (d, 3H, ³J_H= 7,3 Hz, Asp-NH), 10,99 (s, 3H, ATS-NH)

IR (in KBr): [cm⁻¹] 3309(m,b), 3066(w), 3035(w), 2981(m), 2881(w), 1737(s), 1647(s), 1573(s), 1524(s), 1454(s), 1427(s), 1270(s), 1215(s), 1180(s), 1105(s), 1042(m), 981(m), 900(m), 824(w), 789(w), 751(m), 580(m), 550(m), 470(w), 420(w)

C,H,N: ber.: C: 63,52% H: 5,79% N: 8,23% C₈₁H₈₇N₉O₂₁*0,5 H₂O
gef.: C: 63,45% H: 5,73% N: 8,14% M = 1531,64 g/mol

Darstellung von *cyclo*-{Pro-ATS[Asp(O⁻)-O*i*Pr]}₃ (NBu₄⁺)₃ (107)

Entschützung: 0,20 g (0,13 mmol) 105 wurden nach Methode IV an den benzylveresterten Carboxylgruppen entschützt. Als Lösungsmittel wurden 60 ml 1,4-Dioxan/Wasser 9:1 verwendet.

Ausbeute: 0,18 g (100%)

MS (FAB): [M + Na⁺] bei m/z = 1274, Intensität = 52%

C,H,N: ber.: C: 55,81% H: 6,03% N: 8,87% C₆₀H₆₉N₉O₂₁*2 H₂O*1,5 Dioxan
gef.: C: 55,61% H: 5,94% N: 8,63% M = 1384,42 g/mol

Deprotonierung: 151,32 mg (109,3 μmol) 106 wurden nach Methode V zum Tetra-*n*-butylammoniumsalz umgesetzt.

Ausbeute: 0,23 g (100%)

Smp: Zersetzung bei 145°C

[α]_D²⁵: -1,9° (c=1, CHCl₃)

MS (ESI): [M - 2NBu₄⁺ + Na⁺] bei m/z = 1514, Intensität = 45%
[M - NBu₄⁺] bei m/z = 1733, Intensität = 100%

¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 0,93 (t, 36H, ³J_H= 7,4 Hz, *n*Bu-CH₃), 1,21 + 1,18 (2*d, 18H, ³J_H= 6,3 Hz, *i*Pr-CH₃), 1,26 - 1,36 (m, 24H, *n*Bu-γCH₂), 1,51 - 1,62 (m, 24H, *n*Bu-βCH₂), 1,78 - 2,10 (m, 9H, Pro-H(β)+ Pro-H(γ)), 2,26 - 2,40 (m, 9H, Pro-H(β) + Asp-H(β)), 3,10 - 3,20 (m, 24H, *n*Bu-αCH₂), 3,36 - 3,44 (m, 6H, Pro-H(δ)), 4,49 - 4,54 (m, 3H, Asp-H(α)), 4,75 (dd, 3H, ³J_{H ac}= 3,7 Hz, ³J_{H aa}= 8,9 Hz, Pro-H(α)), 4,90 (sept, 3H, ³J_H= 6,2 Hz, *i*Pr-CH), 7,23 (dd, 3H, ⁴J_H= 1,4 Hz, ³J_H= 7,9 Hz, ATS-H(6)), 7,67 (d, 3H, ⁴J_H= 8,0 Hz, ATS-H(5)), 8,68 (d, 3H, ³J_H= 1,4 Hz, ATS-H(2)), 10,37 (s, b, 3H, ATS-NH), 11,46 (s, b, 3H, Asp-NH)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 13,5 (*n*Bu-CH₃), 19,2 (*n*Bu-γCH₂), 21,5 + 21,6 (*i*Pr-CH₃), 23,0 (*n*Bu-βCH₂), 24,5 (Pro-C(γ)), 29,3 (Pro-C(β)), 38,0 (Asp-C(β)), 49,2 (Pro-C(δ)), 50,8 (Asp-C(α)), 57,5 (*n*Bu-αCH₂), 60,3 (Pro-C(α)), 67,6 (*i*Pr-CH), 119,8 (ATS-C(2)), 122,5 (ATS-C(6)), 127,9 (ATS-C(5)), 137,4 (ATS-C(4)), 138,6 (ATS-C(1)), 140,6 (ATS-C(3)), 166,8 (ATS-C(4)CO), 167,7 (ATS-C(1)CO), 170,2 (Pro-CO), 171,6 (Asp-C(α)CO), 171,8 (Asp-C(β)CO)

IR (Diamant): [cm⁻¹] 3284(m,b), 2963(s), 2936(s), 2876(m), 1728(m), 1703(m), 1631(ss), 1602(ss), 1573(ss), 1523(ss), 1423(ss), 1385(ss), 1262(s), 1180(s), 1106(s), 1074(m), 1032(w), 977(w), 882(w), 747(w), 736(w), 703(w)

C,H,N:

ber.:	C: 61,17%	H: 9,03%	N: 7,93%	C ₁₀₈ H ₁₇₄ N ₁₂ O ₂₁ *8 H ₂ O
gef.:	C: 61,38%	H: 8,88%	N: 7,90%	M = 2120,76 g/mol

5. Literaturverzeichnis

- [1] Vögtle, F. *Supramolekulare Chemie*, Teubner, Stuttgart, **1992**.
- [2] Furrhop, J. *Bioorganische Chemie*, Thieme, Stuttgart, **1982**.
- [3] Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [4] Lehn, J.-M. *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1041.
- [5] Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985.
- [6] *Meyers Lexikon*, siebente Auflage, Bibliographisches Institut, Leipzig, **1925**.
- [7] Lindhorst, T. K. *Chem. unserer Zeit* **2000**, *34*, 38.
- [8] Lavinge, J. J.; Anslyn, E. V. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3212.
- [9] Pedersen, C. J. J. *Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2495 und 7017.
- [10] Diederich, F. *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 372.
- [11] Ausgabe: *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 347-510.
- [12] Eliseev, A. V. *Current Opinion Drug. Disc. Develop.* **1998**, *1*, 106.
- [13] Cousins, G. R. L.; Furlan, R. L. E.; Ng, Y-F; Redman, J. E.; Sanders, J. K. M. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 437.
- [14] Kitamura, S.; Fujimura, T.; Kohda, S. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 327.
- [15] Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743.
- [16] siehe beispielsweise: Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, 1325.
- [17] siehe beispielsweise: M. Cesario, M.; Guilhem, J.; Pascard, C.; Anklam, E.; Lehn, J.-M.; Pietraszkiwicz, M. *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1157.
- [18] Diederich, F. *Cyclophanes, Monographs in Supramolecular Chemistry No. 2*, Cambridge, UK, **1991**.
- [19] Vicens, J.; Böhmer (Hrsg.), V. *Calixarenes, A Versatile Class of Macrocyclic Compounds*, Kluwer, Dordrecht, **1991**.
- [20] Timmermann, T.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2663.
- [21] Lindsey, A. S. *J. Chem. Soc.* **1965**, 1685.
- [22] Goldup, A.; Morrison, A. B.; Smith, G. W. *J. Chem. Soc.* **1965**, 3864.
- [23] Bell, T. W.; Liu, J. *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 931.
- [24] Aoyama, Y.; Tanaka, Y.; Toi, H.; Ogoshi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 634.
- [25] Aoyama, Y.; Tanaka, Y.; Sugahara, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5397.
- [26] Kikuchi, Y.; Kato, Y.; Tanaka, Y.; Toi, H.; Aoyama, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1349.
- [27] Hayward, L. D.; Angyal, S. J. *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, 13.
- [28] Collins, P. M. (Hrsg.), *Carbohydrates*, Chapman and Hall: New York, **1987**.
- [29] Kikuchi, Y.; Tanaka, Y.; Sutaro, S.; Kobayashi, K.; Toi, H.; Aoyama, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10302.
- [30] Tanaka, Y.; Khare, C.; Yonezawa, M.; Aoyama, Y. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6193.
- [31] Kikuchi, K.; Kobayashi, K.; Aoyama, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1351.

- [32] Davis, A. P.; Wareham, R. S. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3160.
- [33] Quioco, F.A. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1293.
- [34] Weis, W. I.; Drickamer, K. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441.
- [35] Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321.
- [36] Shaanan, B.; Elgavish, S. J. *Mol. Biol.* **1998**, *277*, 917.
- [37] Simanek, E. E.; McGarvey, G. J.; Jablonowski, J. A.; Wong, C-H. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833.
- [38] Rosen, S. D.; Bertozzi, C.R. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1994**, *6*, 663.
- [39] Bradbrook, G. M.; Forshaw, J. R.; Pérez, S. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4545.
- [40] Jeffrey, G. A.; Saenger, W. *Hydrogen bonding in biological structures*, Springer, Berlin, **1994**.
- [41] Murray-Rust, P.; Glusker, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1018.
- [42] Kubik, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5846.
- [43] siehe beispielsweise: Gutsche, C. D. *Calixarenes*, RSC, London, **1998**.
- [44] Kubik, S.; Goddard, R. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9475.
- [45] Bitta, J., Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **1999**.
- [46] Kubik, S.; Goddard, R. *Chem. Commun.* **2000**, 633.
- [47] Kubik, S.; Goddard, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 311.
- [48] Yvernaud, T.; Yvernaud, G.; Bollinger, J.C. *C.R. Acad. Sci. Paris* **1978**, *287*, 519.
- [49] Coste, J.; Frérot, E.; Jovin, P. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2436.
- [50] Delarue, S.; Sergheraert, C. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5487.
- [51] Anderson, S.; Neidlein, U.; Gramlich, V.; Diederich, F. *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1722.
- [52] Neidlein, U.; Diederich, F. *Chem. Commun.* **1996**, 1493.
- [53] Coterón, J. M.; Hacket, F.; Schneider, H. J. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1429.
- [54] Hamilton, A. D.; Das, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11139.
- [55] Strazewski, P.; Tamm, C. *Synthesis* **1987**, 298.
- [56] Barton, D. H. R.; Hervé, Y.; Potier, P.; Thierry, J. *Chem. Commun.* **1984**, 1298.
- [57] Herrn Dr. M. Emgenbroich sei sehr herzlich für die Bereitstellung dieser Aminophosphonsäure gedankt.
- [58] Krawczyk, H. *Synth. Comm.* **1997**, *27*, 3151.
- [59] Hirschmann, R.; Yager, K. M.; Taylor, C. M.; Witherington, J.; Sprengeler, P. A.; Phillips, B. W.; Moore, W.; Smith, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8177.
- [60] Clark, A. S.; Deans B.; Stevens M. F. G.; Tisdale M. J.; Wheelhouse R. T.; Denny B. J.; Hartley J. A. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1493.
- [61] Die Synthese erfolgte in Anlehnung an: Venuti, M. C. *Synthesis* **1982**, 266.
- [62] Kessler, H. *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509.
- [63] Bara, Y. A.; Friedrich, A.; Kessler, H.; Molter, M. *Chem. Ber.* **1978**, *111*, 1045.
- [64] Ramek, M. *Int. J. Quantum Chem., Quantum Biol. Symp.* **1990**, *17*, 45.
- [65] Ramek, M. *Amino Acids* **1994**, *7*, 223. Siehe auch: <http://fptchal1.tu-graz.ac.at>:

- 8000/ramek/ohacendtourg.html
- [66] Job, P. *Compt. Rend.* **1925**, 180, 928.
- [67] Connors, K. A. *Binding Constants, The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley New-York, **1987**.
- [68] Blanda, M. T.; Horner, J. H.; Newcomb, M. J. *Org. Chem.* **1989**, 54, 4626.
- [69] Fielding, L. *Tetrahedron* **2000**, 56, 6151.
- [70] Macomber, R. S. *J. Chem. Education* **1992**, 69, 375.
- [71] Die Regressionen wurden mit dem Programm *SigmaPlot 3.02* durchgeführt.
- [72] T. K. Lindhorst *Chem. unserer Zeit* **2000**, 34, 38.
- [73] Varki, A. *Glycobiology* **1993**, 3, 97.
- [74] Sharon, N.; Lis, H. *Spektrum Wissensch. März* **1993**, 66.
- [75] Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683.
- [76] Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321.
- [77] Raevsky, O. A.; Grogor'ev, V. Y.; Kireev, D. B.; Zefirov, N. S. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1992**, 11, 49.
- [78] Abraham, M. H. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 22, 73.
- [79] Davis, A. P.; Wareham, R. S. *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2397.
- [80] Ryan, T. J.; Lecollinet, G.; Velasco, T.; Davis, A. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 4863.
- [81] Lecollinet, G.; Dominey, A. P.; Velasco, T.; Davis, A. P. *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4267.
- [82] Droz, A. S.; Neidlein, U.; Anderson, S.; Seiler, P.; Diederich, F. *Helv. Chim. Act.* **2001**, 84, 2243.
- [83] Rusin, O.; Král, V. *Chem. Commun.* **1999**, 2367.
- [84] Král, V.; Rusin, O.; Charvátová, J.; Anzenbacher, P. Jr.; Fogl, J. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 10147.
- [85] Král, V.; Rusin, O.; Schmidtchen, F. P. *Org. Lett.* **2001**, 3, 873.
- [86] Rusin, O.; Lang, K.; Král, V. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 665.
- [87] Niidome, T.; Murakami, H.; Kawazoe, M.; Hatakeyama, T.; Kobashigawa, Y. Matsushita, M.; Kumaki, Y.; Dmeura, M.; Nitta, K.; Aoyagi, H. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1893.
- [88] Smith, P. J.; Reddington, M. V.; Wilcox, C. S. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 6085.
- [89] Breslow, R. *Science* **1982**, 218, 532.
- [90] Bitta, J.; Kubik, S. *Org. Lett.* **2001**, 3, 2637.
- [91] Kubik, S.; Bitta, J.; Goddard, R.; Kubik, D.; Pohl, S. *Mater. Sci. Eng. C.* **2001**, 18, 125.
- [92] Ma, J. C.; Dougherty, D. A. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1303.
- [93] Lhoták, P.; Shinkai, S. *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, 10, 273.
- [94] siehe beispielsweise: Cousins, G. R. L.; Furlan, R. L. E.; Ng, Y.-F.; Redman, J. E.; Sanders, J. K. M. *Angew. Chemie* **2001**, 113, 437 und hier zitierte Literatur.

- [95] Lemieux, R.U. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 373.
- [96] Bonar-Law, R. P.; Sanders, J. K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 259.
- [97] Moberg, C. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 260.
- [98] Luecke, H.; Quioco, F. A. *Nature* **1990**, *347*, 402.
- [99] Varani, G. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 189.
- [100] Ptashne, M.; Gann, A. *Nature* **1997**, *386*, 569.
- [101] Netz, R. *Phys. J. 1* **2002**, *Nr. 9*, 51.
- [102] Arents, G.; Moudrianakis, E. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 10489.
- [103] Magnusson, S. In *The Enzymes, Hydrolysis: Peptide Bond*; Boyer, P. D., Hrsg.; Academic: New York and London, **1971**, 278.
- [104] Madan, K.; Cram, D. J. *Chem. Commun.* **1975**, 427.
- [105] Kyba, E. P.; Helgeson, R. C.; Madan, K.; Gokel, G. W.; Tarnowski, T. L.; Moore, S. S.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2564.
- [106] Lehn, J. M.; Vierling, P.; Hayward, R. C. *Chem. Commun.* **1979**, 296.
- [107] de Boer, J. A. A.; Uiterwijk, J. W. H. M.; Geever, J.; Harkema, S.; Reinhoudt, D. N. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4821.
- [108] Uiterwijk, J. W. H. M.; van Staveren, C. J.; Reinhoudt, D. N.; den Hertog, Jr.; H. J.; Kruise, L.; Harkema, S. *J. Org. Chem.* **1985**, *51*, 1575.
- [109] Kremer, F. J. B.; Chiosis, G.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1994**, 677.
- [110] Ngola, S. M.; Kearny, P. C.; Mecozzi, S.; Russell, K.; Dougherty, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1192.
- [111] Eliseev, A. V.; Nelen, M. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1147.
- [112] Schrader, T. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1537.
- [113] Schrader, T. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 517.
- [114] Bell, T. W.; Khasanov, A. B.; Drew, M. G. B.; Filikov, A.; James, T. L. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2705.
- [115] Wehner, M.; Schrader, T.; Finocchiaro, P.; Failla, S.; Consiglio, G. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 605.
- [116] Rensing, S.; Arendt, M.; Springer, A.; Grawe, T.; Schrader, T. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5814.
- [117] Maruyama, K.; Sohmiya, H.; Tsukube, H. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 805.
- [118] Famulok, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1698.
- [119] Bitta, J.; Kubik, S. *J. Supramol. Chem.* **2001**, *1*, 293.
- [120] Fan, E.; Van Arman, S. A.; Kincaid, S.; Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 369.
- [121] Quack, M. *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 588.
- [122] Kyba, E. P.; Siegel, M. G.; Sousa, L. R.; Sogah, G. D. Y.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.*

- 1973, 95, 2691.
- [123] Kyba, E. P.; Koga, K.; Sousa, L. R.; Siegel, M. G.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 2692.
- [124] Kyba, E. P.; Timko, J. M.; Kaplan, L. J.; de Jong, F.; Gokel, G. W.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4555.
- [125] Peacock, S. C.; Domeier, L. A.; Gaeta, F. C. A.; Helgeson, R. C.; Timko, J. M.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 8190.
- [126] Zhang, X. X.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 3313.
- [127] Yoon, S.S.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 832.
- [128] McDonald, D. Q.; Still, W. Clark *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2073.
- [129] Still, W. C. *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 155.
- [130] Kim, S-G; Kim, K-H; Jung, J; Shin, S. K.; Ahn, K. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 591.
- [131] Lee, K. H.; Lee, D. H.; Hwang, S.; Lee, O. S.; Chung, D. S.; Hong, J.-I. *Org. Lett.* **2003**, 5, 1413.
- [132] Heinrichs, G.; Vial, L.; Lacour, J.; Kubik, S. *Chem. Commun.* **2003**, 1252.
- [133] Ito, K.; Noike, M.; Kida, A.; Ohba, Y. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 7519.
- [134] Schneider, H.-J.; Kramer, R.; Simova, S.; Schneider, U. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6442.
- [135] Schneider, H.-J.; *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1993**, 112, 412.
- [136] Martin, M.; Raposo, C.; Almaraz, M.; Crego, M.; Caballero, C.; Grande, M.; Morán, J. R. *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2512.
- [137] Almaraz, M.; Martin, M.; Hernández, J. V.; Caballero, M. C.; Morán, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1811.
- [138] S. Kubik und G. Heinrichs sei sehr herzlich für die Bereitstellung der Substrate R-127⁺, S-127⁺ und rac-127⁺ gedankt.
- [139] Für die Bereitstellung dieser Substanz sei D. Kubik sehr herzlich gedankt.
- [140] Soroka, M.; Zygmunt, J. *Synthesis* **1988**, 370.
- [141] Clark, A. S.; Deans B.; Stevens M. F. G.; Tisdale M. J.; Wheelhouse R. T.; Denny B. J.; Hartley J. A. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1493.
- [142] Die Synthese erfolgte in Anlehnung an: Venuti, M. C. *Synthesis* **1982**, 266.
- [143] Die Synthese folgt einer ähnlichen Veresterung: Haaima, G. H.; Lohse, A.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E. *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2068.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfaßt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, diese in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht sowie Literaturzitate kenntlich gemacht habe.

Düsseldorf, den 9. Juni 2003