

Eine Molekulare Fliegenfalle zur Erkennung von biologisch relevanten (poly)-anionischen Substraten

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

Vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Michael Schwegmann
aus
Georgsmarienhütte

Würzburg
2005

Eingereicht am: _____
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____
der Dissertation

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____
des öffentlichen Promotionskolloquiums.

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Carsten Schmuck von April 2002 bis Dezember 2005 am Institut für Organische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit sind an folgenden Stellen veröffentlicht worden oder zur Veröffentlichung eingereicht:

"A molecular flytrap for the selective binding of citrate and other tris-carboxylates in water. " C. Schmuck, M. Schwegmann *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3373-3379.

"Recognition of anionic carbohydrates by an artificial receptor in water." C. Schmuck, M. Schwegmann, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3517-3520.

"A naked Eye-sensing ensemble for the selective detection of citrate - but not malate and ttrate - in aqueous solvents with a tris-cationic receptor. C. Schmuck, M. Schwegmann, *Org. & Biomol. Chem.*, accepted for publication.

Poster und Kurzvortrag auf der ORCHEM 2004 in Bad Nauheim zu dem Thema:
"Multivalente Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren zur Bindung von (poly)-anionischen Substraten."

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2002 bis Dezember 2005 an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Carsten Schmuck angefertigt.

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Carsten Schmuck für die interessante Aufgabenstellung im Bereich der Bioorganischen Chemie herzlich danken. Sein stetes Interesse sowie seine fachliche Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Laborkollegen Martin Heil, Lars Geiger und den vielen anderen Mitgliedern des Arbeitskreises, die für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit gesorgt haben.

Für die Durchführung der analytischen Messungen und die Hilfe bei der Auswertung danke ich Dr. Matthias Grüne, Elfriede Ruckdeschel (NMR) und Dr. Michael Büchner (MS). Außerdem danke ich Dr. Mathias Schäfer für die Aufnahme von Massenspektren an der Universität zu Köln.

Für die kritische Durchsicht dieser Arbeit möchte ich mich bei Jürgen Dudaczek, Christian Urban, Uwe Machon, Thomas Rehm und Volker Bickert bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei allen Personen bedanken, die mich beim Studium der Chemie und beim Anfertigen dieser Arbeit finanziell und persönlich unterstützt haben. Besonders hervorzuheben sind hierbei meine Eltern, ohne deren Unterstützung dies nicht möglich gewesen wäre. Außerdem möchte ich mich noch bei meinem Studienkollegen Holger Danielec bedanken, der mich lange auf meinem Studienweg begleitet und mir persönlich und fachlich immer zur Seite gestanden hat.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Zielsetzung und Konzeption | 3 |
| 2.1 | Entwurf eines multivalenten Rezeptors zur Komplexierung von Citrat..... | 3 |
| 2.2 | Entwicklung von multivalenten Rezeptoren zur Komplexierung von Kohlenhydraten..... | 7 |
| 2.3 | Entwurf eines cyclischen Acylguanidin-Bindungsmotives zur stereoselektiven Komplexierung von Carboxylaten | 10 |
| 3 | Grundlagen und Methoden | 13 |
| 3.1 | Carboxylat-Rezeptoren | 13 |
| 3.1.1 | Einfache Guanidine als Bindungsmotive für Carboxylate | 13 |
| 3.1.2 | Guanidiniocarbonylpyrrole als Bindungsmotiv für Carboxylate | 15 |
| 3.1.3 | Enantioselektive Erkennung von Aminosäuren..... | 18 |
| 3.2 | Citrat und Polycarboxylat-Rezeptoren..... | 21 |
| 3.3 | Kohlenhydraterkennung..... | 26 |
| 3.4 | Methoden zur Bestimmung von Bindungskonstanten | 30 |
| 3.4.1 | NMR-spektroskopische Methoden..... | 30 |
| 3.4.2 | UV- und Fluoreszenz-spektroskopische Methoden..... | 36 |
| 4 | Durchführung und Diskussion | 43 |
| 4.1 | Synthese des Rezeptors 8 | 43 |
| 4.1.1 | Synthese des Triamin-Templats 6 | 45 |
| 4.1.2 | Synthese der Carboxylat-Bindungsstelle | 51 |
| 4.1.3 | Modulare Synthese des Rezeptors 8 | 53 |
| 4.2 | Bindungsstudien von Rezeptor 8 mit Citrat und anderen Polycarboxylaten..... | 60 |
| 4.2.1 | Spektroskopische Untersuchungen | 60 |
| 4.2.2 | Komplexstruktur und Selektivität..... | 78 |
| 4.2.3 | "naked eye detection" | 88 |
| 4.3 | Bindungsstudien von Rezeptor 8 mit anionischen Zuckern..... | 92 |
| 4.3.1 | Uronsäuren | 93 |
| 4.3.2 | Glucophosphate..... | 98 |
| 4.4 | Synthese der Rezeptoren 17 und 18 | 108 |
| 4.4.1 | Synthese der Rezeptoren 17 und 18 (<i>Route 1</i>) | 109 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.4.2 | Synthese der Rezeptoren 17 und 18 (<i>Route 2</i>)..... | 114 |
| 4.5 | Bindungsstudien mit den multivalenten Guanidiniocarbonylpyrrol- Rezeptoren 17 und 18 | 120 |
| 4.6 | Synthese des cyclischen Acylguanidins 21 | 124 |
| 4.7 | Bindungsstudien mit dem cyclischen Rezeptor 124 | 135 |
| 5 | Zusammenfassung | 142 |
| 6 | Ausblick | 147 |
| 7 | Experimenteller Teil | 152 |
| 7.1 | Allgemeiner experimenteller Teil | 152 |
| 7.2 | Synthese des Rezeptors 8 | 156 |
| 7.2.1 | Synthese des Triamin-Templats 6 | 156 |
| 7.2.2 | Modulare Synthese des Rezeptors 8 | 163 |
| 7.3 | Synthese des Rezeptors 17 | 169 |
| 7.3.1 | Synthese der Edukte | 169 |
| 7.3.2 | Synthese von Rezeptor 17 | 172 |
| 7.4 | Synthese des Rezeptors 18 | 176 |
| 7.4.1 | Synthese der Edukte | 176 |
| 7.4.2 | Synthese von Rezeptor 18 | 181 |
| 7.5 | Synthese von Rezeptor 124 | 185 |
| 8 | Summary | 192 |
| 9 | Anhang | 197 |
| 9.1 | Literatur | 197 |
| 9.2 | Abkürzungverzeichnis | 203 |
| 9.3 | Messdaten..... | 206 |
| 9.3.1 | Rezeptor 8 gegen Polycarboxylate | 207 |
| 9.3.2 | Rezeptor 8 gegen anionische Zucker..... | 212 |
| 9.3.3 | Rezeptor 18 gegen (anionische) Zucker | 216 |
| 9.3.4 | Rezeptor 124 gegen Aminosäuren..... | 217 |
| 9.4 | Lebenslauf und Erklärung | 219 |

1 Einleitung

Während bisher in der Organischen Chemie der Schwerpunkt der Forschung auf der Synthese *einzelner* Moleküle und der Entwicklung neuer, hoch effizienter Synthesemethoden lag, so tritt in den letzten Jahren insbesondere die Wechselwirkung zwischen *mehreren* Molekülen untereinander verstärkt in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses.^[1] Diese über ein einzelnes Molekül hinausgehende Supramolekulare Chemie beschäftigt sich im Gegensatz zur kovalenten Synthesechemie mit der Erforschung von schwachen, nicht-kovalenten Wechselwirkungen wie z. B. Wasserstoff-Brücken, ionischen oder hydrophoben Interaktionen.^[2,3] Nicht-kovalente Wechselwirkungen spielen ebenfalls eine äußerst wichtige Rolle in vielen biologisch relevanten Prozessen wie bei der Immunabwehr, der Proteinfaltung oder der DNA-Basenpaarung.^[1]

Um derartige molekulare Erkennungsprozesse beeinflussen oder nachahmen zu können, ist es sinnvoll, erst die grundlegende Thermodynamik dieser Vorgänge zu studieren. Da die spezifischen Wechselwirkungen von biologischen Systemen wegen ihrer komplexen Strukturen nur schwer untersucht werden können, bieten sich hier Modellsysteme an, mit deren Hilfe einzelne Wechselwirkungen gezielt nachgeahmt und studiert werden können.^[2,3] Das Design solcher künstlichen Rezeptoren ist eine herausfordernde Aufgabe, da die Wirkungsweise einiger nicht-kovalenter Wechselwirkungen noch immer nicht genau aufgeklärt ist.^[4-8] Außerdem sind diese stark umgebungsabhängig, d.h. je polarer das Lösemittel wird, desto schwächer werden z.B. Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen, weil die Bindungsstellen kompetitiv durch das Solvens besetzt werden.^[9,10] In polaren Lösemitteln können Supramolekulare Komplexe sogar endotherm gebildet werden und verlaufen daher Entropie kontrolliert aufgrund der Reorganisation der Lösemittel-Moleküle bei der Komplexierung. Aus diesen Gründen zeigen die meisten, insbesondere die auf Wasserstoffbrücken basierenden, bisher publizierten Modellsysteme nur effektive Komplexierung von Biomolekülen in organischen Lösemitteln mit geringer Polarität.

Deswegen werden neue Bindungsmotive benötigt, mit denen Biomoleküle wie Aminosäuren, Peptide, Zucker oder Polycarboxylate wie Citrat unter physiologischen Bedingungen effektiv erkannt werden können. Die Detektion eines bestimmten Analyten erfordert aber nicht nur eine effektive und selektive

Erkennung, sondern auch eine Methode, um die Ergebnisse auslesen zu können. In den meisten Fällen werden hier Reporter (z.B. ein Chromophor) verwendet, die mit dem Rezeptor kovalent verknüpft sind, und bei der Komplexbildung eines Analyten z.B. eine optische Änderung vorweisen.^[11] So kann man mit spektroskopischen Methoden oder sogar mit dem bloßen Auge (*naked eye*) erkennen, ob ein Analyt präsent ist. Allerdings können auch Indikatoren als Reporter verwendet werden, die nicht kovalent mit dem Rezeptor verknüpft sind. Bei dieser Methode, die auch als *indicator displacement assay (IDA)* bezeichnet wird, wird der Indikator durch den Rezeptor komplexiert, wobei eine Veränderung der optischen Eigenschaften des Indikators auftritt.^[11,12] Bei der Komplexbildung des Zielsubstrats wird der Indikator wieder aus dem Komplex mit dem Rezeptor verdrängt, wodurch die optischen Eigenschaften des Indikators wieder hergestellt werden.

Interessant sind z.B. Sensoren zur Komplexbildung von Citrat. Dieses spielt eine wichtige Rolle im Citronensäure-Zyklus^[13] und ist damit beteiligt an der Energiegewinnung im menschlichen Körper. Außerdem wird Citrat als Zusatzstoff in der Nahrungsmittelindustrie und pharmazeutischen Industrie verwendet.^[14] Chemosensoren, die selektiv Citrat in Gegenwart von anderen anionischen Biomolekülen detektieren, könnten also zur Bestimmung der Citrat-Konzentration z.B. in Nahrungsmitteln eingesetzt werden.

Aber auch Kohlenhydrate sind interessante Targets für synthetische Sensoren. Neben der allgemein bekannten Funktion als Energiespeicher erfüllen sie nämlich auch wichtige Aufgaben als Bestandteil von Zellwänden, Geweben und der extrazellulären Matrix.^[15] Hier spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion, der Zell-Zell-Kommunikation sowie der zellulären Erkennung. Sensoren zur selektiven Detektion von Kohlenhydraten könnten dann z.B. Rückschlüsse über die Anlagerung von Pathogenen liefern, die über Wechselwirkungen mit Kohlenhydraten verlaufen, und Therapieansätze für neue Medikamente liefern.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung von multivalenten Rezeptoren zur Komplexbildung von kleinen Biomolekülen wie Citrat und auch Kohlenhydraten unter physiologischen Bedingungen. Außerdem sollen Sensoren bzw. Sensorsysteme entwickelt werden, mit denen eine optische Erkennung eines gegebenen Analyten ermöglicht wird.

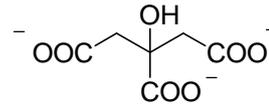
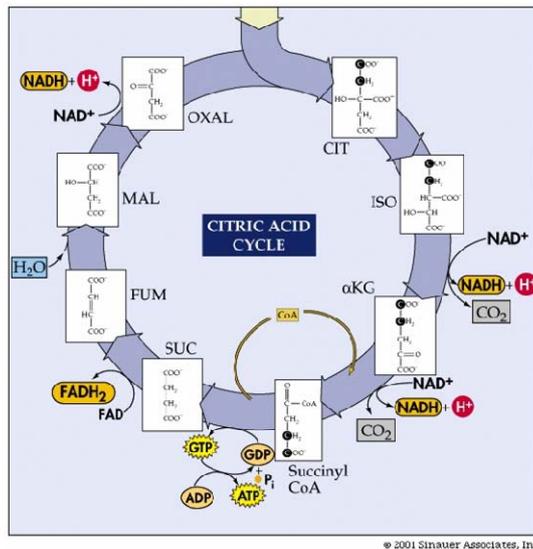
2 Zielsetzung und Konzeption

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von multivalenten Rezeptoren auf Basis von Guanidiniocarbonylpyrrolen zur selektiven Komplexierung von biologisch relevanten, polyanionischen Substraten wie z.B. Citrat in wässrigen Medien bzw. reinem Wasser. Darüber hinaus sollen die so entwickelten multivalenten Rezeptoren auch noch auf ihre Bindungseigenschaften für Kohlenhydrate getestet werden. In einem weiteren Projekt soll ein neuartiges cyclisches Acylguanidin Bindungsmotiv zur Komplexierung von Carboxylaten in wässrigen Medien entwickelt werden, mit dem im Gegensatz zum Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv (siehe S. 5) eine stereoselektive Erkennung von z.B. C-terminalen Peptiden ermöglicht werden soll.

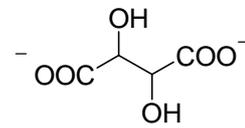
Diese drei verschiedenen Projekte werden in den nächsten Kapiteln ausführlich beschrieben.

2.1 Entwurf eines multivalenten Rezeptors zur Komplexierung von Citrat

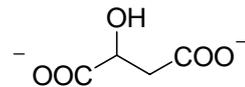
Die Citronensäure **1** spielt eine zentrale Rolle im Citronensäure-Zyklus, d.h. bei der Energiegewinnung im menschlichen Körper, zum Beispiel bei der Bildung von ATP aus ADP.^[13] Außerdem kann Citrat Chelatkomplexe ausbilden und ist an der Eliminierung von Schwermetallionen beteiligt.^[16] Des Weiteren wird Citrat als Zusatzstoff in der Nahrungsmittel- und pharmazeutischen Industrie eingesetzt.^[14] Rezeptoren, die selektiv Citrat in Gegenwart von anderen Polycarboxylaten wie z.B. Tartrat **2** oder Malat **3**, die ebenfalls am Citronensäure-Zyklus beteiligt sind, erkennen können, wären nützliche Reporter für die Bestimmung von Citrat-Konzentrationen wie z.B. im Urin bei der Diagnose von Krankheiten.^[17]



Citrat 1



Tartrat 2



Malat 3

Abb. 2.1: Citronensäure-Zyklus und wichtige Polycarboxylate, die in diesem involviert sind.

Da es sich bei Citrat 1 um ein Tricarboxylat handelt, sollte ein Rezeptor zur Komplexierung drei Bindungsstellen für Carboxylate aufweisen, um eine bestmögliche Erkennung gewährleisten zu können. Diese sollten möglichst an einem Templat angebracht werden, dass die drei Rezeptorarme auf einer Seite des Templats fixiert, um mögliche enthalpische Verluste durch die Reorganisation des Rezeptors bei der Komplexierung des Substrats zu minimieren.

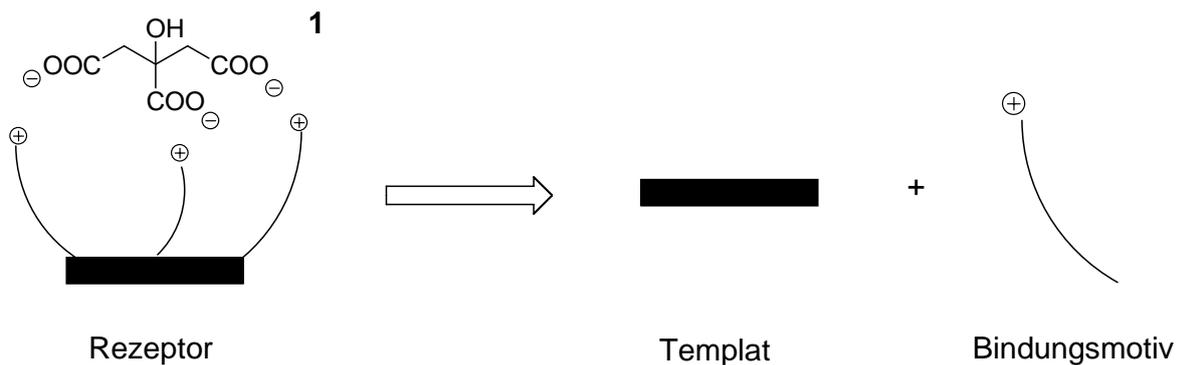


Abb. 2.2: "Retrosynthese" eines multivalenten Rezeptors zur Erkennung von Citrat bestehend aus einem Templat und drei positiv geladenen Bindungsmotiven.

Der Rezeptor soll also aus zwei Komponenten, einem Bindungsmotiv für Carboxylate und einem Templat, das diese präorganisieren soll, aufgebaut werden:

1. Ein Bindungsmotiv für Carboxylate:

In der Natur werden zur Komplexierung von Carboxylaten Guanidinium-Kationen in Form der Aminosäure Arginin verwendet.^[18,19] Angelehnt an diese "natürliche" Carboxylat-Erkennung wurden in den letzten Jahren viele Rezeptoren auf Guanidinium-Basis entwickelt, mit denen es möglich ist, negativ geladene Oxoanionen wie z.B. Phosphate oder Carboxylate mit guten Bindungskonstanten, allerdings nur in unpolaren Medien wie Chloroform, zu komplexieren.^[20-23] Diese Guanidinium-Bindungsmotive, die in ihrer Komplexierung größtenteils auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhen, wurden von *Schmuck* in den letzten Jahren weiterentwickelt. Er verwendete Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren wie **4**, die neben den Wechselwirkungen zwischen Guanidin und Carboxylat noch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Pyrrol- bzw. Amid-NH und dem Carboxylat ausbilden können und so eine Komplexierung in wässrigen Medien ermöglichen.^[24,25] Die Vorteile der Guanidiniocarbonylpyrrole gegenüber einfachen Guanidinium-Rezeptoren bei der Komplexierung von Carboxylaten werden später noch ausführlicher in Kapitel 3 beschrieben. Die Verknüpfung drei dieser Bindungsmotive an ein geeignetes Templat könnte so eine Erkennung von Tricarboxylaten wie Citrat in reinem Wasser erlauben.

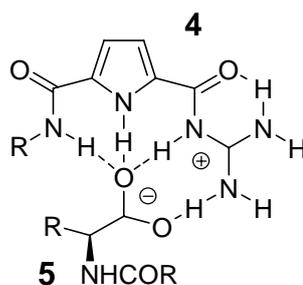


Abb. 2.3: Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **4** nach *Schmuck* zur Erkennung von Carboxylaten wie **5** in wässrigen Medien.

2. Ein Templat zur Fixierung der Rezeptorarme:

Das Templat sollte so aufgebaut sein, dass durch eine einfache Reaktion wie eine Amid-Kupplung die drei Rezeptorarme angebracht werden können. Deswegen wurde nach einem geeigneten Triamin-Templat gesucht, das starr sein

sollte, so dass die drei Rezeptorarme auf einer Seite des Templats fixiert sind, um enthalpische Verluste durch Reorganisation des Rezeptors bei der Komplexierung zu minimieren. Als Templat wurde deswegen das Triamin **6** gewählt, das bereits von *Anslyn* für seine Citrat-Rezeptoren erfolgreich verwendet wurde.^[12,26,27] Durch die alternierende Substituierung des Aromaten durch die Ethyl- und Aminomethylgruppen kommt es zu sterischen Abstoßungen, die sowohl die Ethylgruppen als auch die Aminofunktionen auf jeweils einer Seite des Benzolrings präorganisieren.^[28,29] Die Vorteile dieser Anordnung der Aminofunktionen des Templats auf einer Seite des Benzolrings werden in Kapitel 3 anhand eines Beispiels näher beschrieben.

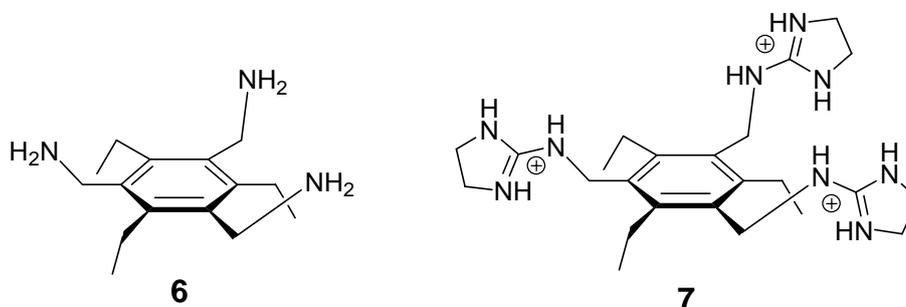


Abb. 2.4: Triamin Templat **6** und Citrat Rezeptor **7** nach *Anslyn*.

Beruhend auf dem Templat **6** wurden von *Anslyn* bereits verschiedene Citrat-Rezeptoren (siehe Kapitel 3.2 für ausführliche Informationen) dargestellt, von denen exemplarisch der Rezeptor **7** in Abb. 2.4 aufgeführt ist.^[26] Da die Interaktionen zwischen **7** und Citrat aber nur auf Wechselwirkungen zwischen einfachen Guanidinen und Carboxylaten beruhen, konnten in Wasser nur Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} = 6.9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ bestimmt werden. In gepufferten wässrigen Medien fiel die Bindungskonstante sogar auf $K_{\text{Ass}} \sim 10^2 \text{ M}^{-1}$.

Durch den Einsatz von Guanidiniocarbonylpyrrolen, die im Vergleich (s.o.) höhere Bindungskonstanten für Carboxylate aufweisen als einfache Guanidine, könnte so die Bindungskonstante für Citrat verbessert werden, so dass auch eine effiziente Komplexierung in gepufferten wässrigen Medien möglich sein könnte.

Die Retrosynthese des Rezeptors **8** ist in Abb. 2.5 gezeigt. Dieser soll, wie schon oben beschrieben, aus dem Templat **6** nach *Anslyn* und dem Bindungsmotiv **9** nach *Schmuck* synthetisiert werden.

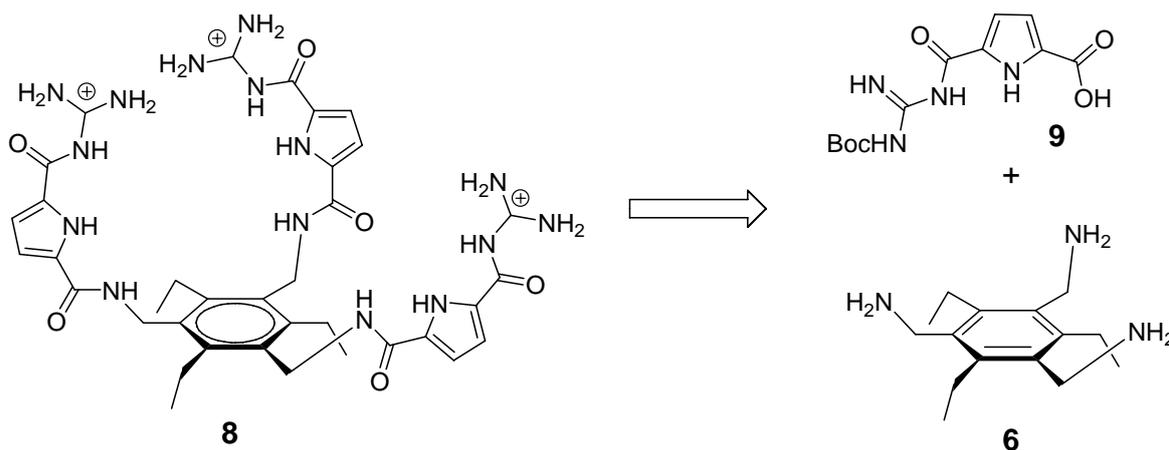


Abb. 2.5: Retrosynthese des multivalenten Guanidiniocarbonylrezeptors **8**.

Mit dem so hergestellten Rezeptor können dann Bindungsstudien durchgeführt werden. Neben biologisch relevanten Polycarboxylaten wie Citrat, Ttrat und Malat sollen auch noch verschiedene aromatische Polycarboxylate auf ihre Bindungseigenschaften untersucht werden, da hier unpolare Wechselwirkungen, die gerade in wässrigen Medien an Stärke gewinnen, einen hohen Einfluss auf die Bindungskonstanten haben könnten.^[3] Zusätzlich sollen Molecular Modeling Rechnungen durchgeführt werden, um Informationen über die Komplexstrukturen erhalten zu können. Mit den Ergebnissen der Bindungsstudien und den Molecular Modeling Rechnungen könnte der Rezeptor so weiter optimiert werden.

2.2 Entwicklung von multivalenten Rezeptoren zur Komplexierung von Kohlenhydraten

Neben den Polycarboxylaten soll aber noch eine andere Substanzklasse, die Kohlenhydrate, auf ihre Bindungseigenschaften für Rezeptor **8** und ähnliche multivalente Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren geprüft werden. Die Kohlenhydrate spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Energiegewinnung, sondern sind auch beteiligt an der Regulation biologischer Prozesse wie z.B. der Zell-Zell Erkennung.^[30] Ein Beispiel für eine derartige Wechselwirkung ist in Abb. 2.6 gezeigt. Die Rekrutierung von weißen Blutkörperchen für entzündete Stellen

erfolgt über die Erkennung von Oligosacchariden, in diesem Fall von dem so genannten Sialyl-Lewis^x, das auf der Oberfläche von weißen Blutkörperchen exprimiert wird.^[31] Diese werden durch die zuckerbindenden Moleküle, die Lectine und Selectine, aus dem Blutstrom abgebremst und können so in die Zelle wandern, wo sie ihre Aufgaben erfüllen können.

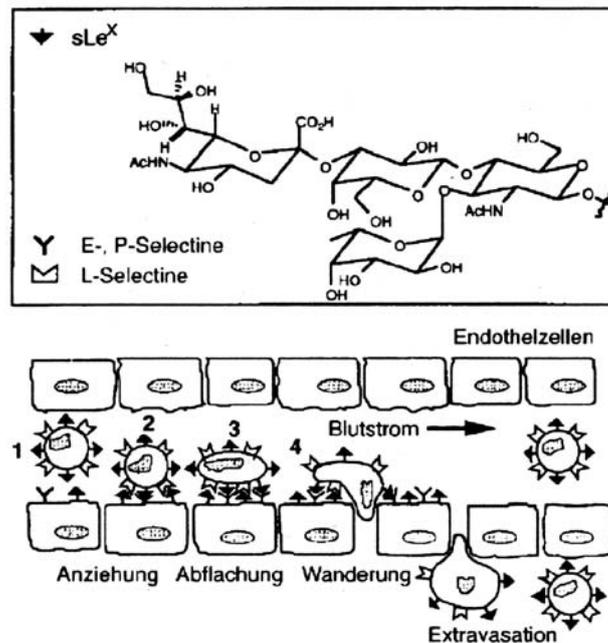


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Rekrutierung von Leukozyten.

Da der genaue Ablauf der spezifischen molekularen Erkennung von Oligosacchariden bis heute noch nicht genau nachvollzogen werden kann, könnten mit einem Modellsystem wie Rezeptor **8** Aussagen über die Komplexierung von Kohlenhydraten gemacht werden. Dies ist vor allem deswegen interessant, da auch in der Natur Kohlenhydrate über Wechselwirkungen mit Guanidinen, d.h. über die Aminosäure Arginin, erkannt werden.^[32,33] Da allerdings die Komplexierung von Kohlenhydraten durch multivalente Rezeptoren wie **8** nur auf Wasserstoffbrückenbindungen beruhen würde, wären die Wechselwirkungen wahrscheinlich nicht ausreichend stark genug für eine effektive Komplexierung. Deswegen sollen als Modell-Substrate anionische Zucker gewählt werden, da die zusätzliche ionische Wechselwirkung mit dem Carboxylat eine Erkennung in wässrigen Medien ermöglichen könnte. In Abb. 2.7 sind verschiedene Uronsäuren **11** und **12** und Zuckerphosphate **13-15** aufgeführt, die auf ihre Affinität zum Rezeptor **8** getestet werden sollen. Außerdem soll auch noch das einfache

Phosphat **16** auf seine Bindungseigenschaften überprüft werden, um zu zeigen, welchen Einfluss die Wechselwirkungen mit dem Zuckergerüst auf die Komplexierung haben.

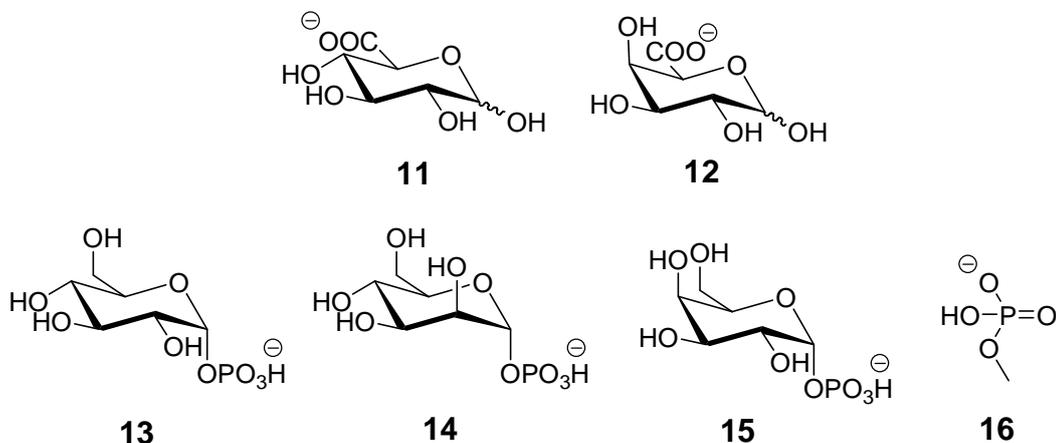


Abb. 2.7: Biologisch relevante anionische Zucker: Glucuronsäure **11**, Galacturonsäure **12**, α -Glucose-1-phosphat **13**, α -Mannose-1-phosphat **14** und α -Galactose-1-phosphat **15** und das einfache Phosphat **16**.

Da der Rezeptor **8** allerdings nur einen relativ kleinen "Hohlraum" zur Komplexierung von Gästen aufweist, sollen im Rahmen dieser Arbeit noch zwei weitere multivalente Rezeptoren **17** und **18** (siehe Abb. 2.8) auf Basis von Guanidiniocarbonylpyrrolen hergestellt werden, die größere Bindungskavitäten bilden und damit verbunden auch weitere Möglichkeiten zum Ausbau von Wasserstoffbrücken zur Verstärkung des Komplexes aufweisen sollen. Dies könnte ein weiterer Schritt in die Richtung sein, neutrale Zucker in polaren Medien zu erkennen. Als Linker wurde die beiden Aminosäuren Glycin und Serin gewählt, weil sie durch einfache Amidbindungen zwischen das Bindungsmotiv und das Templat eingefügt werden können. Dadurch sind weitere Wasserstoffbrückenbindungen über die zusätzliche Amidbindungen und die zusätzlich OH-Funktion des Serins möglich. Außerdem sollen die zusätzlichen polaren OH-Gruppen die Löslichkeit des Rezeptors **18** in Wasser erhöhen. Die Retrosynthese der Rezeptoren ist in Abb. 2.8 gezeigt. Wiederum sind für die Synthese verschiedene Syntheserouten möglich, die ausführlich in Kapitel 4 mit Vor- und Nachteilen diskutiert werden.

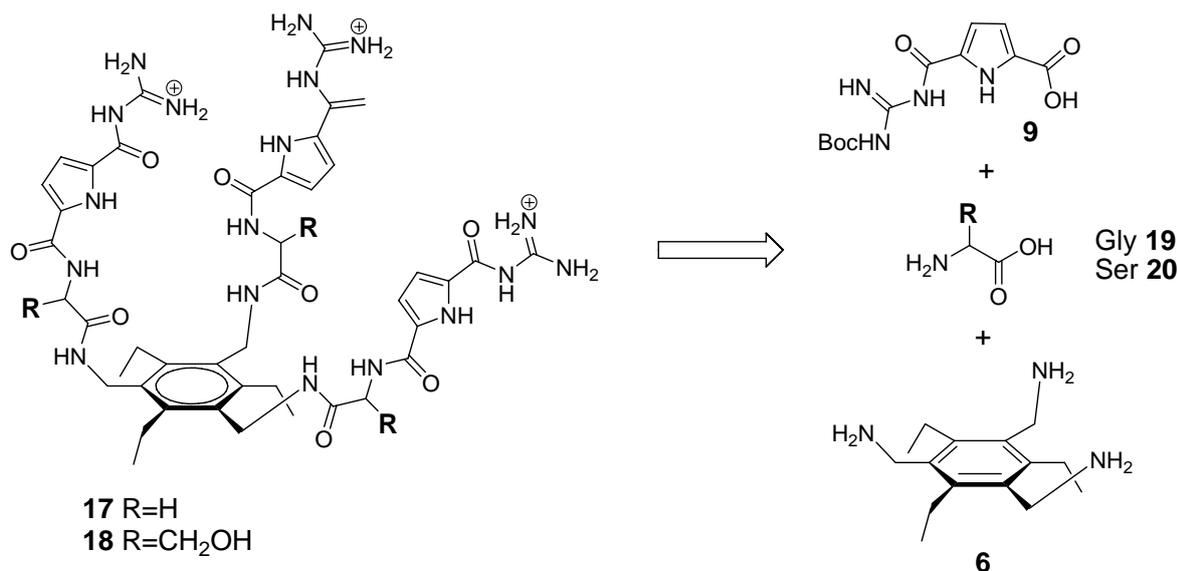


Abb. 2.8: Retrosynthese der beiden multivalenten Rezeptoren **17** und **18** mit Glycin- bzw. Serin-Spacer.

Nach der Synthese der Rezeptoren **17** und **18** sollen diese wiederum auf ihre Bindungseigenschaften für verschiedene Kohlenhydrate getestet werden. Zuerst sollten die anionischen Zucker analog zum einfachen Rezeptor **8** untersucht werden, um zu überprüfen, welchen Einfluss die zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungsmotive und die größere Bindungskavität auf die Komplexierung der verschiedenen anionischen Zucker haben. Außerdem soll untersucht werden, ob durch die Erweiterung des einfachen Rezeptors **8** nun eine Komplexierung von Zuckern wie Glucose in wässrigen polaren Medien möglich ist.

2.3 Entwurf eines cyclischen Acylguanidin-Bindungsmotives zur stereoselektiven Komplexierung von Carboxylaten

In einem weiteren Projekt soll eine chirale Acylguanidin-Kopfgruppe für Carboxylate entwickelt werden, die bei der Komplexierung zwischen Stereoisomeren differenzieren kann.^[34] Damit könnte es möglich sein, höhere Substratselektivitäten bei Aminosäuren oder kleinen Peptiden zu erreichen.

Der Rezeptor soll auf Basis eines Acylguanidins aufgebaut werden, da im Arbeitskreis *Schmuck* gezeigt werden konnte, dass Acylguanidine hohe Bindungskonstanten für Carboxylate in wässrigen Mischungen aufweisen.^[25] Weil

aber die Acylguanidingruppe achiral ist, wäre die nächstmögliche Position für eine stereogene Information die Verknüpfung zwischen der Acylguanidin-Einheit und den folgenden Bausteinen des Rezeptors. Außerdem wäre eine cyclische Guanidineinheit günstig, da sie die konformativen Freiheitsgrade einschränken würde und so eine Präorganisation des Rezeptors für den Erkennungsprozess ermöglichen würde. Als Zielstruktur wurde deswegen das neuartige cyclische Acylguanidin **21** über Molecular Modeling Rechnungen identifiziert, das sowohl aufgrund seiner strukturellen Vorteile als auch seiner vermutlich synthetisch leichten Zugänglichkeit ausgewählt wurde. Die Retrosynthese des cyclischen Acylguanidins **21** ist in Abb. 2.9 gezeigt.

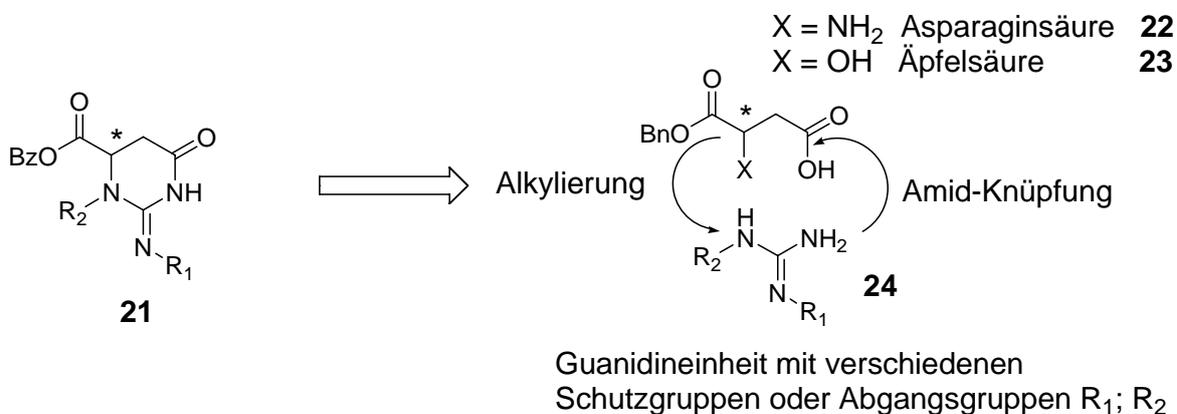


Abb. 2.9: Retrosynthese zur Darstellung der cyclischen Acylguanidin-Kopfgruppe **21**.

In einer zweistufigen Synthese, d.h. eine Alkylierung und die Verknüpfung einer Amidbindung, sollte das cyclische Acylguanidin synthetisch zugänglich sein. Die verschiedenen Methoden zur Durchführung dieser beiden Synthesen werden ausführlich in Kapitel 4 beschrieben.

Nach der Synthese des Bausteins **21** soll zunächst ein "einfacher" Rezeptor **25** mit einer Aminosäure synthetisiert werden, mit dem die ersten Bindungsstudien durchgeführt werden sollen. Damit soll herausgefunden werden, wie hoch die Affinität des neuen Bindungsmotives im Vergleich mit Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren vom Typ **4** bei der Komplexierung von Aminosäuren ist. Außerdem soll bestimmt werden, ob schon mit diesem relativ einfachen Rezeptor eine Diskriminierung von enantiomeren Aminosäuren möglich ist.

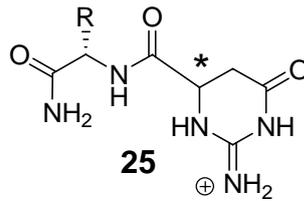


Abb. 2.10: Rezeptor **25** zur enantioselektiven Komplexierung von Aminosäuren.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist somit die Entwicklung von verschiedenen multivalenten Rezeptoren auf Basis von Guanidiniocarbonylpyrrolen zur Komplexierung von biologisch relevanten Substraten wie Citrat oder auch Kohlenhydraten. Diese könnten dann z.B. als Sensoren für die Beobachtung von zellulären Prozessen eingesetzt werden.

Neben diesem Hauptprojekt soll ein neues Acylguanidin-Bindungsmotiv entwickelt werden, mit dem eine stereoselektive Komplexierung von Aminosäure-Carboxylaten ermöglicht werden kann. Diese Rezeptoren könnten dann als Chemosensoren für chirale Aminosäuren eingesetzt werden.

3 Grundlagen und Methoden

In den nachfolgenden Kapiteln wird kurz der Stand der Forschung für die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Themengebiete vorgestellt. Da der vor kurzem von *Schmuck* entwickelte Rezeptor auf Basis von Guanidiniocarbonylpyrrolen eine wichtige Rolle für diese Arbeit spielt, werden zunächst die Vorteile dieses Bindungsmotivs gegenüber einfachen Guanidinen behandelt. Außerdem werden Beispiele für die besonderen Bindungseigenschaften verschiedener Rezeptoren auf Basis der Guanidiniocarbonylpyrrole gegeben. In den darauf folgenden Kapiteln werden dann noch Rezeptoren zur Erkennung von Citrat und anderen Polycarboxylaten und Kohlenhydraten beschrieben, die ausschlaggebend für den rationalen Entwurf von multivalenten Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren waren. Zum Schluss werden ein paar Beispiele für (enantioselektive) Aminosäure-Rezeptoren gegeben und die grundlegenden Methoden zur Bestimmung von Bindungskonstanten vorgestellt.

3.1 Carboxylat-Rezeptoren

3.1.1 Einfache Guanidine als Bindungsmotive für Carboxylate

Die Guanidinium-Gruppe ist in den letzten Jahren eine extrem wichtige Gruppe zur Komplexierung von Anionen geworden. Sie bildet starke nicht-kovalente Wechselwirkungen zu Anionen wie Carboxylat, Phosphat, Sulfat und Nitrat aus.^[32,33] Die Erkennung von Carboxylaten mit Guanidinen kann oft auch in biologischen Systemen in Form der Aminosäure Arginin, die in der Seitenkette eine Guanidinium-Funktion besitzt, beobachtet werden.^[18,19] Die Vorteile des Guanidins liegen in dem breiten pH-Bereich, in dem es protoniert vorliegt, und in der Geometrie, die gut mit den oben genannten Anionen übereinstimmt, was zu starken Wechselwirkungen führt. Aufgrund dieser Vorteile wurden in den letzten Jahren viele Rezeptoren auf Basis der Guanidinium-Gruppe dargestellt. Bereits Ende der 80er Jahre entwickelten *Schmidtchen et al.* ein bicyclisches Guanidin **26**, das die Komplexierung von *p*-Nitrobenzoat in Acetonitril mit einer Bindungs-

konstante von $K_{\text{Ass}} \sim 10^4 \text{ M}^{-1}$ ermöglichte.^[35] Daraufhin folgten weitere ähnliche Rezeptoren wie **27** von *de Mendoza et al*, die aber zu keiner großen Steigerung in den Bindungskonstanten führten (siehe Abb. 3.1).^[36] Allerdings konnte mit dem chiralen Rezeptor **27** eine Selektivität für *L*- gegenüber *D*-Phenylalanin (Faktor 2) beobachtet werden.

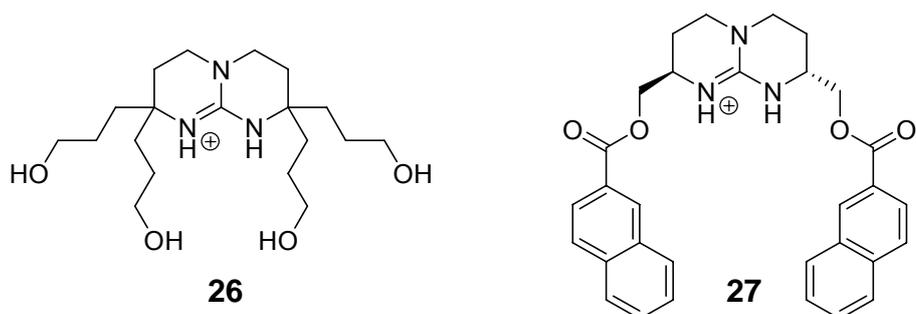


Abb. 3.1: Einfach geladene bicyclische Guanidinium-Rezeptoren **26** und **27** zur Komplexierung von Anionen in organischen Lösemitteln.

Erst durch die Entwicklung mehrfach geladener Rezeptor-Moleküle wie die Rezeptoren **28** nach *Schmidtchen*,^[37] **29** nach *Hamilton*^[38] und **30** nach *Anslyn*^[39] gelang eine Komplexierung in polareren Lösemitteln wie DMSO oder Methanol, vor allem bei mehrfach geladenen Anionen wie Phosphat. Obwohl nun mehrere ionische Wechselwirkungen vom Rezeptor zum Substrat ausgebildet werden, konnten trotzdem nur mittelmäßige Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} = 10^1 - 10^5 \text{ M}^{-1}$ (in DMSO oder MeOH) bestimmt werden. Außerdem sind diese Rezeptoren strukturell sehr anspruchsvoll und können nur in aufwendigen, mehrstufigen Synthesen dargestellt werden.

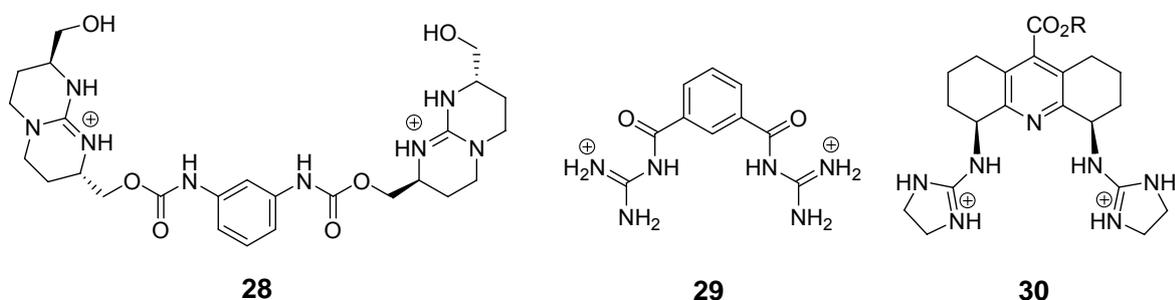


Abb. 3.2: Mehrfach geladene Guanidinium-Rezeptoren **28** - **30** zur Komplexierung von Anionen in organischen Lösemitteln.

3.1.2 Guanidiniocarbonylpyrrole als Bindungsmotiv für Carboxylate

In den letzten Jahren wurden von *Schmuck* Versuche durchgeführt, die Bindungseigenschaften von Guanidinen so zu verändern, dass eine Komplexierung von Anionen in wässrigen Medien möglich wird. Dazu wurden Molecular Modeling Rechnungen (MacroModel 6.5, Amber*-Kraftfeld, GB/SA-Solvatation) durchgeführt, mit denen ein neuartiges Bindungsmotiv, das Guanidiniocarbonylpyrrol **4**, zur Komplexierung von Anionen oder im speziellen von Carboxylaten identifiziert werden konnte.^[25]

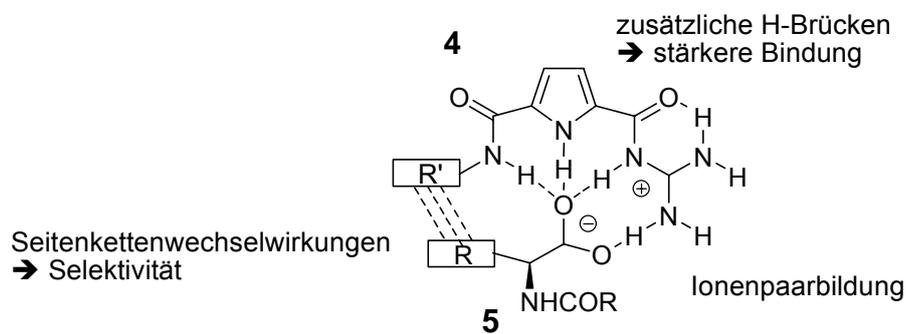


Abb. 3.3: Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **4** nach *Schmuck* zur Erkennung von Carboxylaten wie **5** in wässrigen Medien.

Die strukturellen Vorteile dieses Bindungsmotives gegenüber einfachen Guanidinen sind:

- Die Erhöhung der Acidität durch Acylierung des Guanidins, welche die Ausbildung von Wasserstoffbrücken erleichtert.^[40]
- Zusätzliche Wasserstoffbrücken zu dem Pyrrol-NH und Amid-NH erhöhen die Bindungsaffinität.
- Die Präorganisation des Bindungsmotives, da es sich um ein nahezu planares Molekül handelt, ist ideal für die Bindung von ebenfalls planaren Carboxylaten.
- Selektivität gegenüber verschiedenen Substraten kann durch Seitenketten Wechselwirkungen (Variation des Restes R) erreicht werden.

Das Bindungsmotiv nach *Schmuck* lässt sich über eine 6-stufige Synthese ausgehen von Pyrrol **31** und Guanidin **32** herstellen.^[41] Der Schlüsselschritt ist dabei das Einfügen des Guanidins **34**, das in geschützter Form verwendet wird, da

das Anbringen des einfachen Guanidins nur unter sehr harschen Bedingungen, d.h. mit Natriummethanolat in siedendem Methanol, durchgeführt werden kann (siehe Abb. 3.4).^[24] Nach Entschützen des Benzylesters **35** können nun verschiedene Amine an das freie Carboxylat angebracht werden, womit die Seitenkette des Rezeptors variiert und so Selektivitäten für verschieden Substrate erreicht werden können.

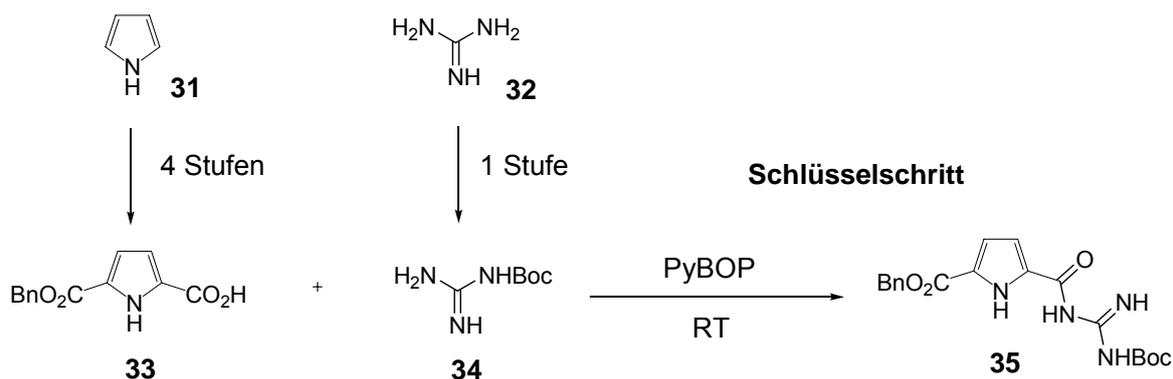


Abb. 3.4: Synthese der Guanidiniocarbonylpyrrol-Bausteine **35** und **38**.

Aufgrund der guten Bindungskonstanten von Rezeptoren wie **42** (Abb. 3.5) für Alanincarboxylat selbst in 40 % Wasser/DMSO ($K_{\text{Ass}} = 770 \text{ M}^{-1}$) wurden verschiedene Acylguanidinium-Rezeptoren (**40-45**) auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber Alanincarboxylat getestet (siehe Abb. 3.5), um zu bestimmen, welchen Einfluss die zusätzlichen Wechselwirkungen im Vergleich zum einfachen Guanidin **32** haben. Dabei zeigte **32** unter diesen Bedingungen keine Bindungsaktivität für Alanincarboxylat, während für das einfache Acylguanidin **40** eine sehr geringe Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 50 \text{ M}^{-1}$ bestimmt wurde. Das Einführen zusätzlicher Wasserstoffbrückendonoren führte zu einer deutlichen Erhöhung der Bindungskonstante. So konnte für Rezeptor **41** durch den zusätzlichen Pyrrolring eine Erhöhung der Bindungskonstante um den Faktor 3 gegenüber dem Acylguanidin **40** beobachtet werden. Das Einführen einer weiteren Amid-Funktion zu den Rezeptoren **42** und **43** erhöhte die Bindungsaffinität um den Faktor 5. Verwendet man an Stelle eines Ethylamins die Aminosäure Valinamid (Rezeptor **45**), konnte sogar eine Erhöhung der Bindungskonstante um den Faktor 12 im Vergleich zu Rezeptor **41** festgestellt werden. Man erkennt also, dass durch Einführen weiterer H-Brücken Donoren die

Bindungsaffinität des auf ionischen Wechselwirkungen beruhenden Acylguanidins **40** sehr stark erhöht werden kann.

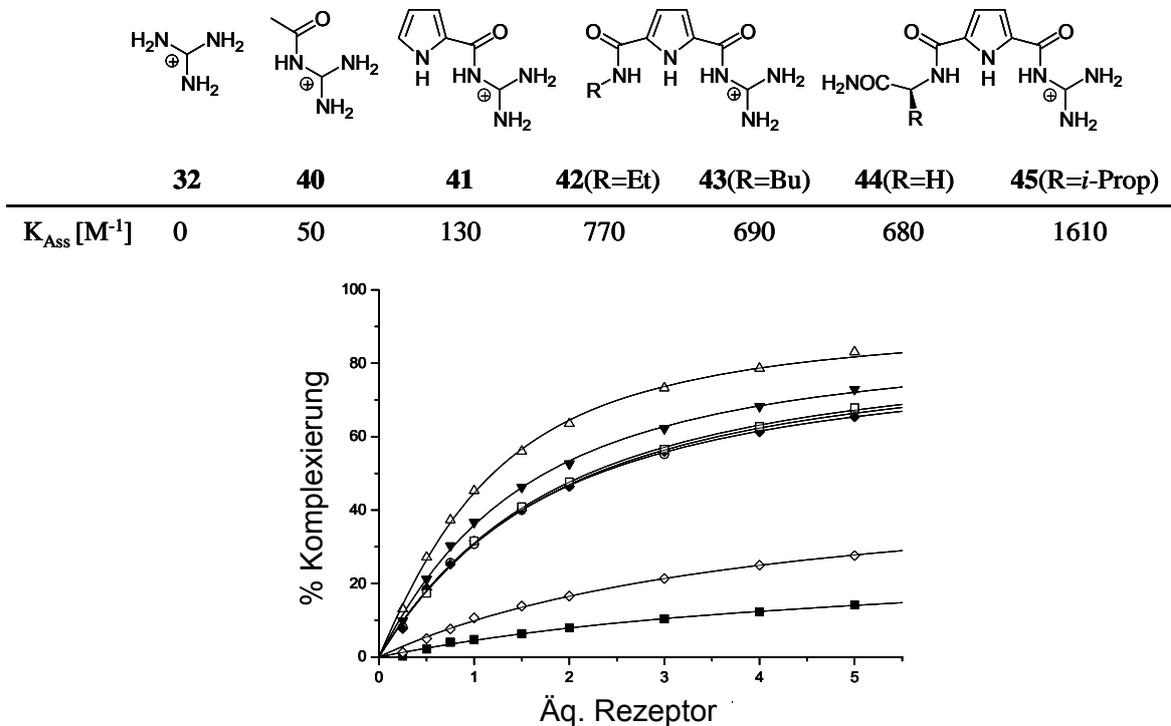


Abb. 3.5: Thermodynamische Bindungsstudien der Rezeptoren **40** - **45** bei der Komplexbildung von Alanincarboxylat. Dargestellt sind die Bindungsisothermen der verschiedenen Rezeptoren (**45** (Δ), **42** (\blacktriangledown), **43** (\bullet), **44** (\diamond), **41** (∇) und **40** (\blacksquare)) in 40 % Wasser/DMSO und die daraus bestimmten Bindungskonstanten.

Mit der Entwicklung dieses Bindungsmotives ist es *Schmuck* gelungen, die Komplexierung von Carboxylaten durch zusätzliche H-Brückenmotive im Vergleich zum einfachen Guanidin **32** in DMSO/Wasser-Mischungen mit hohen Bindungskonstanten zu ermöglichen. Die Bindungsstärke des Komplexes beruht dabei auf einer Kombination von einer ionischen Wechselwirkung und verschiedenen Wasserstoffbrücken zum Acylguanidin und den Amidgruppen des Rezeptors, die alle einen erheblichen Anteil an der Komplexierung aufweisen. Ein Rezeptor, der aus drei Einheiten dieses Bindungsmotives aufgebaut wird, sollte also gut geeignet für die Bindung von Tricarboxylaten wie Citrat in wässrigen Medien sein.

3.1.3 Enantioselektive Erkennung von Aminosäuren

Eine der außergewöhnlichsten Eigenschaften von vielen Biomolekülen wie z.B. Enzymen ist ihre Fähigkeit, Enantiomere in biologischen Prozessen unterscheiden zu können. Fast alle Aminosäuren und deren Derivate, aus denen viele Biomoleküle aufgebaut werden, sind chiral. Die Entwicklung von künstlichen Rezeptoren, die diese Fähigkeiten von Proteinen nachahmen, könnten wertvolle Informationen für das bessere Verständnis nicht kovalenter Wechselwirkungen zwischen Molekülen in der Natur liefern. Außerdem könnte die Untersuchung solcher Modellsysteme zur Entwicklung verschiedenster nützlicher Rezeptoren für biochemische^[42] und pharmazeutische Studien,^[43] Trennungsprozesse,^[44] Katalyse^[45] oder Sensoren^[46] führen.

Im Folgenden werden kurz ein paar Beispiele für die enantioselektive Erkennung von Aminosäuren gegeben. Bereits 1973 gelangen *Cram et al.* die Trennung von enantiomeren Phenylammonium-Salzen mit einem Kronenether-Rezeptor **46**, der durch zwei Binap-Reste verknüpft ist.^[47] Die Autoren konnten durch Extraktionsversuche zwischen Chloroform und Wasser zeigen, dass der enantiomerenreine S,S-Rezeptor bevorzugt das R-Ammonium-Salz komplexiert.

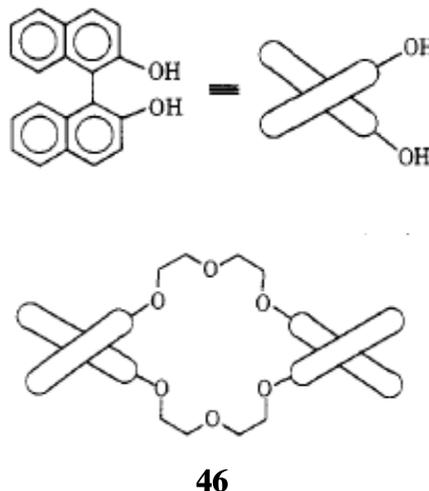


Abb. 3.6: Kronenether Rezeptor **46** nach Cram zur Komplexierung von Ammonium-Salzen.

Aufbauend auf diesem ersten Entwurf wurden in den letzten Jahren viele Rezeptoren entwickelt, die größtenteils aus chiralen Macrocyclen, Kronenethern und Cyclodextrinen bestehen. Neben Rezeptoren zur Komplexierung von Ammonium-Salzen wurden aber auch noch Rezeptoren zur Komplexierung von

Carboxylaten entwickelt. Ein paar Beispiele für diese beiden Typen sind in Abb. 3.7 gezeigt.

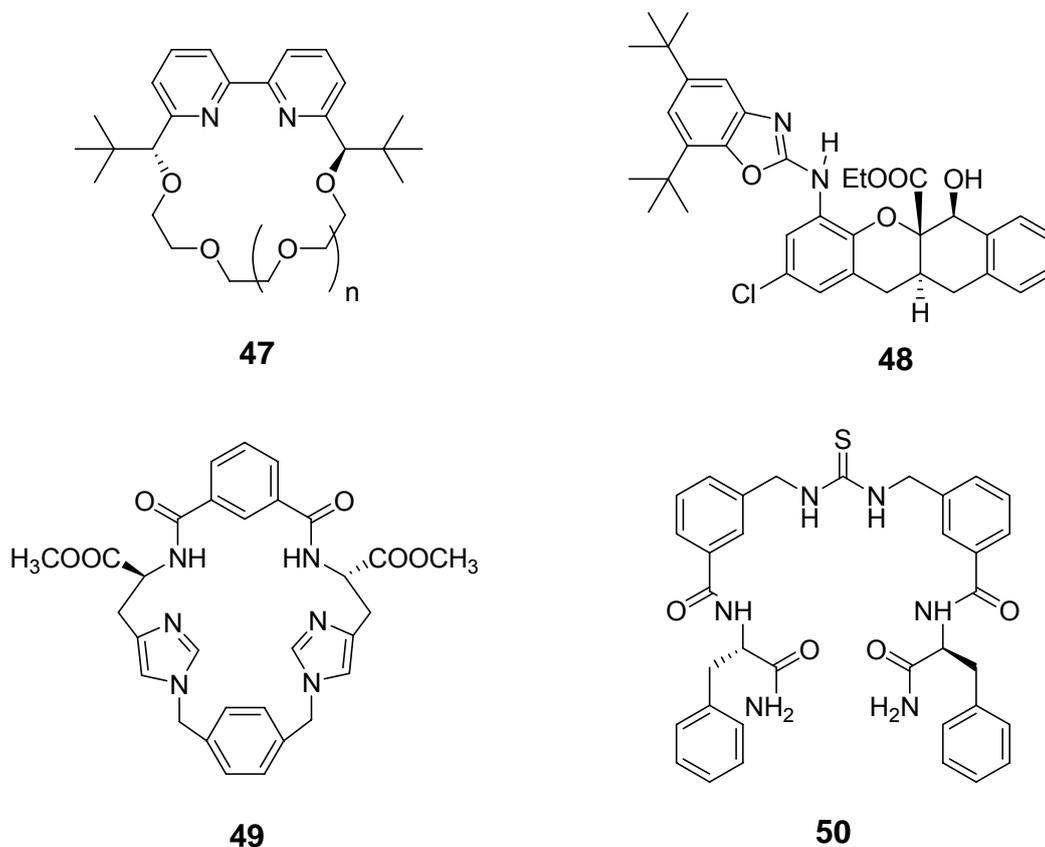


Abb. 3.7: Rezeptoren **47-50** zur enantioselektiven Erkennung von Aminosäuren.

Die beiden Rezeptoren **47** und **48** nach Xie *et al.*^[48] und Kwong *et al.*^[49] wurden zur enantioselektiven Komplexierung von Aminosäure-Ammonium-Salzen entwickelt. Mit ihnen konnten für verschiedene Aminosäuren Selektivitäten für ein Enantiomer von bis zu einem Faktor 3 (in CHCl_3 bzw. CH_2Cl_2) bestimmt werden. Die Rezeptoren **49** und **50** nach Moran *et al.*^[50] und Kilburn *et al.*^[51] dagegen wurden zur selektiven Erkennung von Aminosäure-Carboxylaten hergestellt. Während Rezeptor **50** nur Selektivitäten um den Faktor 3 (in CHCl_3) zeigte, konnte Moran mit den beiden Enantiomeren des Rezeptors **49** z.B. *L*-Prolin mit einer Selektivität um den Faktor 14 (in CHCl_3) komplexieren. Die Autoren konnten mit ihren Rezeptoren zwar hohe Bindungsaffinitäten für Aminosäuren bestimmen, allerdings war die Erkennung nur in unpolaren Lösemitteln wie Chloroform und Dichlormethan möglich, da die Wechselwirkungen nur auf Wasserstoffbrücken beruhen. Deswegen sind sie für den Einsatz für Chemosensoren nicht geeignet.

Die Effektivität diese Strukturen beruht bei **47** und **49** auf starren, präorganisierten Kavitäten, bei denen sterische Wechselwirkungen die Selektivität für verschiedene Enantiomere gewährleisten. Bei **48** und **50** werden die Aminosäuren durch die Bindung zur Kopfgruppe (z.B. Thioharnstoff) fixiert. Die Selektivität beruht bei diesen beiden Rezeptoren auf den sterischen Wechselwirkungen mit dem bzw. den zwei Bindungsarm(en)

Auf ähnliche Art und Weise würde ein Rezeptor bestehend aus dem cyclischen Acylguanidin wie **21** (siehe Kapitel 2.3) und einem Peptidstrang funktionieren. Da so ein künstlicher Peptid-Rezeptor allerdings nicht starr, sondern sehr flexibel ist, wird die Selektivität durch Ausbildung einer β -Faltblatt-Struktur bestimmt. Aufgrund dieser Struktur und der Komplexierung des Carboxylats durch die Kopfgruppe kommt es zu einer Fixierung des Rezeptors, die eine Selektivität für C-terminale Carboxylate von Peptiden bewirken könnte. Mit so einem Motiv könnte dann eine selektive Erkennung auch in polaren Medien wie Wasser oder DMSO möglich sein.

3.2 Citrat und Polycarboxylat-Rezeptoren

Analog zu den bisher publizierten Rezeptoren zur Komplexierung von einfachen Carboxylaten, entwickelten *Anslyn et al.* einen Rezeptor zur Komplexierung von Citrat auf Basis von Guanidinen.^[26] Da es sich bei Citrat um ein dreifach geladenes Tricarboxylat handelt, entwickelten sie den dreifach positiv geladenen Rezeptor **7**, der aus einem Templat und drei Guanidin-Einheiten aufgebaut ist. Als Templat verwendeten sie das Polyamin **6**, welches durch seine alternierende Substituierung am Aromaten die Guanidine auf einer Seite des Templats fixiert und somit den Rezeptor **7** für die Komplexierung von Polycarboxylaten wie Citrat präorganisieren sollte.

Um nachzuvollziehen, welchen Einfluss Design-Prinzipien wie Präorganisation, Wasserstoffbrücken und Ladungspaarung auf die selektive und effektive Komplexierung von Polycarboxylaten durch Rezeptoren wie **7** haben, wurden noch die beiden Vergleichsrezeptoren **6** und **51** auf ihre Bindungseigenschaften untersucht. Dabei sollte mit Rezeptor **51** gezeigt werden, welchen Einfluss die Präorganisation,^[2,52-54] die in der Literatur gut dokumentiert ist, auf die Komplexierung hat, da durch die fehlenden Ethylgruppen die drei Guanidine nicht mehr auf einer Seite fixiert sind.

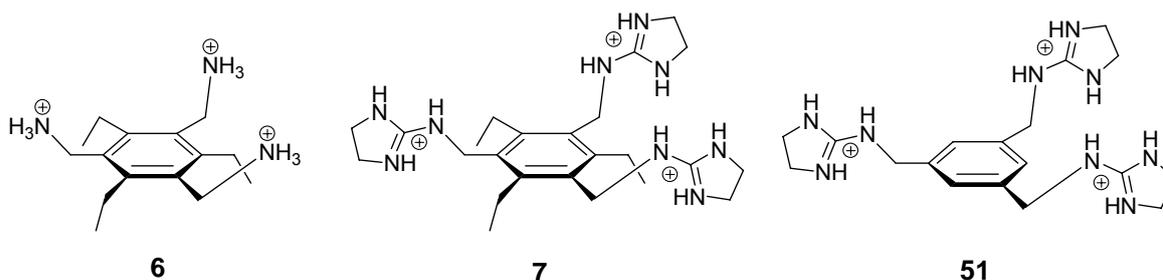


Abb. 3.8: Polykationische Rezeptoren nach *Anslyn et al.* zur Komplexierung von Citrat. Bindungskonstanten wurden in D_2O bei $pH=7.4$ aufgenommen.

Da Ammonium-Ionen aufgrund ihrer höheren Ladungslokalisierung bei der Ladungspaarung im Vergleich zu den delokalisierten Guanidinium-Ionen effektivere Komplexoren sein sollten,^[55] wurde deswegen zum Vergleich noch der Triammonium-Rezeptor **6** getestet. Trotz der höheren Ladungsdichte wird in der Natur Arginin vor Lysin bei der Komplexierung von Anionen bevorzugt, was wohl

auf die gerichteten Wechselwirkungen des Guanidins im Vergleich mit dem Amin und auf die größere Zahl der möglichen Wasserstoffbrücken zurückzuführen ist.^[56] Mit den drei Rezeptoren **6**, **7** und **51** (siehe Abb. 3.8) wurden diese drei Prinzipien auf ihren Einfluss bei der Komplexierung von Citrat getestet.

Die Autoren konnten anhand von Bindungsstudien zeigen, dass die Präorganisation des Rezeptors **7** einen großen Einfluss auf die Komplexierung von Citrat in Wasser hat, da dieser Citrat mit $K_{\text{Ass}} = 6.9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ fast um den Faktor drei besser bindet als der Rezeptor **51** mit $K_{\text{Ass}} = 2.4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Außerdem konnten sie darlegen, dass die Ladungsdichte nicht der einzige bestimmende Faktor beim Binden von Salzen in wässrigen Medien ist, da der Rezeptor **51** mit $K_{\text{Ass}} = 6.9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ um den Faktor zwei besser bindet als der einfache Ammonium-Rezeptor **6** mit $K_{\text{Ass}} = 3.0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Somit haben die zusätzlichen Wasserstoffbrücken des Guanidins einen großen Einfluss auf die Bindung von Citrat.

Ferner konnten sie noch zeigen, dass der Rezeptor **7** eine hohe Selektivität für Citrat gegenüber anderen biologisch relevanten Dicarboxylaten aufweist. So komplexierte dieser die Dicarboxylate Succinat und Glutarat nur noch mit Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} \sim 200 \text{ M}^{-1}$, was eine Selektivität für Citrat um den Faktor 30 bedeutet. Allerdings zeigt der Rezeptor **7** nur noch mäßige Bindungskonstanten, wenn in gepufferten Lösungen gearbeitet wurde. So fiel die Bindungskonstante für die Komplexierung von Citrat sowohl in Phosphat- als auch in HEPES-Puffer auf $K_{\text{Ass}} \sim 10^2 \text{ M}^{-1}$.

Interessant sind aber nicht nur Rezeptoren, die ihre Substrate mit hoher Affinität und Selektivität binden, sondern viel mehr auch Sensor-Systeme, mit denen die Komplexierung in Mischungen optisch nachgewiesen werden kann.^[12,57,58] So konnte *Anslyn* mit einem Sensorsystem basierend auf dem Rezeptor **7** und dem Reporter Carboxyfluorescein **52** (siehe Abb. 3.9) den Citrat-Gehalt in diversen Getränken bestimmen.^[59] Diese Methode, bei der ein Reporter für optische Messmethoden verwendet wird, da der Rezeptor keine oder sehr geringe optische Eigenschaften aufweist, bezeichnet man als *indicator displacement assay (IDA)*.^[12] Die genaue Durchführung eines solchen Experimentes wird später noch ausführlich in diesem Kapitel vorgestellt (siehe Kapitel 3.4.2).

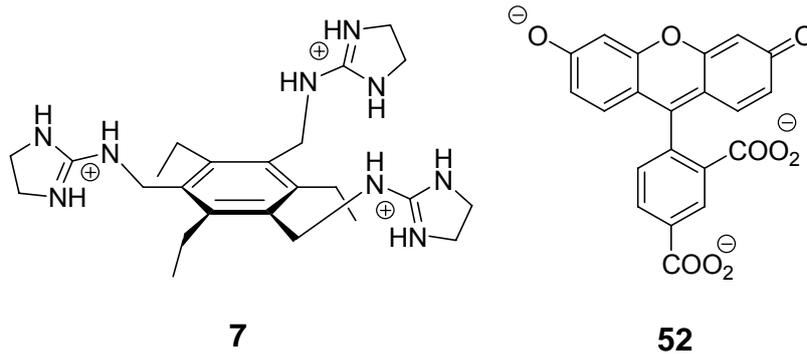


Abb. 3.9: Sensorsystem nach Anslyn et al. bestehend aus Rezeptor **7** und Carboxyfluorescein **52**.

In den letzten Jahren wurden von *Anslyn et al.* noch weitere Rezeptoren und Sensorsysteme zur Komplexierung von Citrat und anderen biologisch relevanten Polycarboxylaten wie Malat und Tatarat vorgestellt.^[12,60,61] Zwei Beispiele dafür sind in Abb. 3.10 gezeigt. Der Rezeptor **53** (als Sensorsystem mit CF **52**) wurde zur Bestimmung von Malat und Tatarat in Getränken verwendet.^[61] In 75 % MeOH/Wasser (pH = 7.3; HEPES Puffer) konnte eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 5.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ für Tatarat gefunden werden. Diese Komplexierung beruht allerdings auf nicht reversiblen kovalenten Verknüpfungen über Boronsäureester und ist deshalb zum direkten Vergleich mit Rezeptoren, die nur nicht-kovalente Wechselwirkungen ausbilden, nicht geeignet.

Rezeptor **54** wurde als Fluoreszenz-Sensor zur Bestimmung von Citrat in Getränken entwickelt.^[59] Für die Komplexierung von Citrat konnte eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 8.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ in 85 % MeOH/Wasser (pH = 7.4; HEPES Puffer) bestimmt werden. Da dieser Rezeptor aber auf Metall-Ligand-Wechselwirkungen beruht, die viel stärkere, semi-kovalente Bindungen zwischen Rezeptor und Substrat ausbilden als nicht-kovalente Interaktionen, kann diese Bindungskonstante ebenfalls nicht direkt mit den Ergebnissen der bisher vorgestellten auf klassischen, nicht-kovalenten Wechselwirkungen beruhenden Rezeptoren verglichen werden.

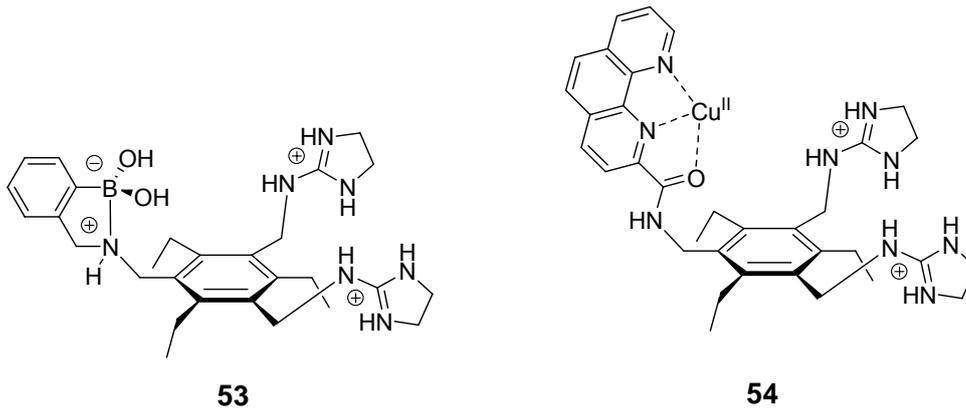


Abb. 3.10: Rezeptoren **53** und **54** nach Anslyn et al. auf Boronsäure- und Metall-Basis zur Komplexierung von Citrat und anderen Polycarboxylaten.

Ein Rezeptor zur Komplexierung von Citrat auf Metallionen-Basis wurde auch kürzlich von *Fabbrizzi et al.* publiziert.^[62] Sie entwickelten einen Kupfer haltigen Trifurcat-Rezeptor **55**, der die selektive Erkennung von Citrat in wässrigem Puffer mit einer Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 3.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ermöglicht. Damit ist **55** nach Angaben der Autoren der bisher beste Rezeptor zur Komplexierung von Citrat in Wasser. Andere biologisch relevante Polycarboxylate wie Malat oder auch Tatrart zeigen geringere Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} < 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Damit bindet der Rezeptor **55** Citrat mindestens um den Faktor 3 besser als andere biologisch relevante Polycarboxylate. Da dieser Rezeptor aber wiederum auf starken Metall-Ligand-Wechselwirkungen beruht, kann er zum direkten Vergleich mit Rezeptoren, die nur nicht kovalente Wechselwirkungen ausbilden, nicht verwendet werden.

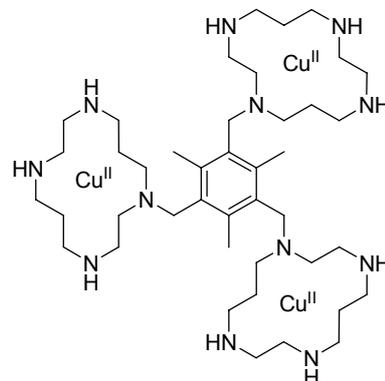


Abb. 3.11: Kupfer-haltiger Trifurcat-Rezeptor **55** nach Fabbrizzi et al. zur Komplexierung von Citrat.

Neben den bisher vorgestellten Rezeptoren zur Komplexierung von Citrat gibt es noch diverse Rezeptoren zur Komplexierung von anderen Polycarboxylaten wie z.B. der Trimesinsäure **10**. Zwei Beispiele dafür sind in Abb. 3.12 gezeigt.^[63,64] Die Rezeptoren **56** und **57** beruhen auf cyclischen, hochgeladenen Polyammonium-Salzen, die bei verschiedenen pH-Werten aufgrund der unterschiedlichen Protonierungsstufen starke bis schwache Bindungskonstanten für die Trimesinsäure in Wasser aufweisen. So konnte z.B. für den dreifach protonierten Rezeptor **56** in Wasser (0.15 M NaCl) bei der Komplexierung der Trimesinsäure eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 1.4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ bestimmt werden, während der dreifach protonierte Rezeptor **57** in Wasser (0.1 M NMe₄Cl) eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ zeigte.

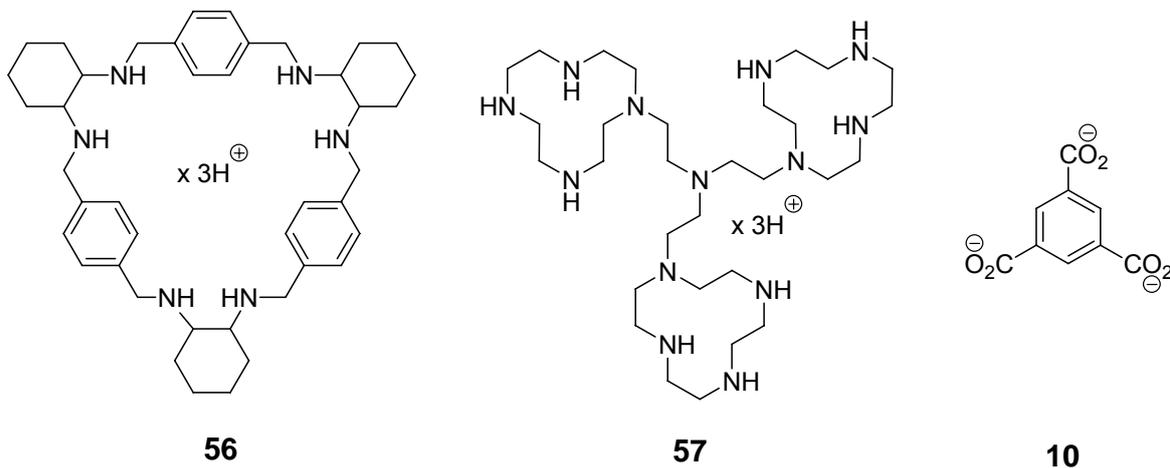


Abb. 3.12: Polyammonium-Rezeptoren **56** nach Hodacova et al. und **57** nach Bencini et al. und das Substrat Trimesinsäure **10**.

Die Arbeiten der oben genannten Autoren zeigen, dass eine selektive Erkennung von Citrat gegenüber anderen biologisch relevanten Polycarboxylaten mit hohen Bindungskonstanten möglich ist. Allerdings wiesen die Systeme von *Anslyn* schon bei Einsatz von kleinsten Konzentrationen an Puffer nur noch sehr geringe Affinitäten für Citrat auf, wenn man die Rezeptoren auf Boronsäure- und Metall-Basis nicht berücksichtigt. Da diese Rezeptoren aber unter physiologischen Bedingungen (120 mM NaCl, Phosphatpuffer, pH = 7.4) zur Erkennung von Citrat eingesetzt werden sollen, könnte der Einsatz von Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren im Gegensatz zu einfachen Guanidinen bei den Rezeptoren von *Anslyn* zu einer Steigerung der Bindungskonstanten führen und vielleicht eine

effektivere Komplexierung in gepufferten Medien mit hoher Ionenstärke ermöglichen.

3.3 Kohlenhydraterkennung

Während in den letzten Jahren viele Fortschritte bei der Komplexierung von Aminosäuren und kleinen Peptiden gemacht wurde,^[42,65] bleibt die Komplexierung von Zuckern und Kohlenhydraten schwierig.^[10,66] Die meisten Rezeptoren, die bisher publiziert wurden, zeigen nur gute Bindungskonstanten in Lösemitteln wie Chloroform oder Methanol.^[68-70] Nur wenige Beispiele für die Komplexierung von Zuckern in wässrigen Medien sind bisher bekannt,^[71-77] wobei die Bindungskonstanten doch sehr gering sind, wenn man Rezeptoren auf Boronsäure-Basis vernachlässigt, die bei der Komplexierung von Zuckern kovalente Bindungen ausbilden.^[67] Im folgenden werden nun Beispiele für Kohlenhydrat-Rezeptoren gegeben. Bei den meisten Rezeptoren zur Komplexierung von Zuckern handelt es sich um rigide, präorganisierte hydrophobe Kavitäten, die relativ schwer herzustellen sind und die größtenteils auf unpolaren Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken beruhen.

So veröffentlichten *Davis et al.* vor kurzem ein rigides cyclisches Triamid **58** (siehe Abb. 3.13), das die Komplexierung von Zuckern in Wasser ermöglicht.^[68] Allerdings konnten hier nur sehr geringe Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} = 30 \text{ M}^{-1}$ für Alkylglucoside wie **59** in D_2O bestimmt werden. Dabei konnten Selektivitäten für verschiedene Glucoside um den Faktor 3 beobachtet werden.

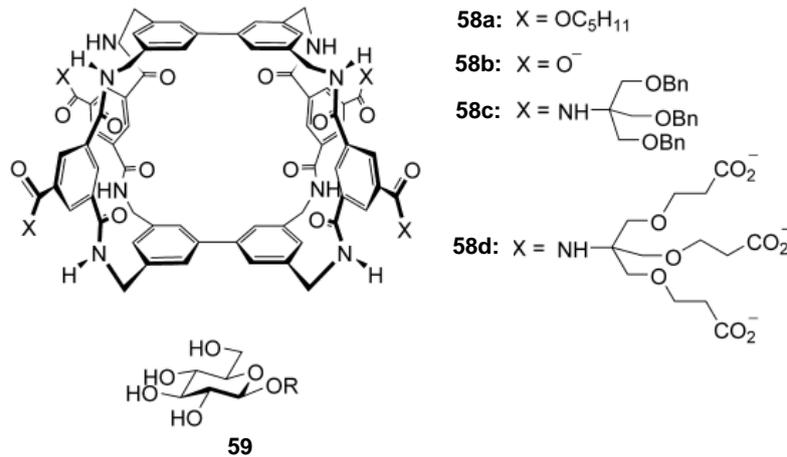


Abb. 3.13: Starre Polyamid-Rezeptor **58 a-d** nach Davis et al. zur Komplexierung von Glucosiden.

Ein ähnlicher starrer unpolare Rezeptor **60** wurde von Schmidtchen et al. entwickelt.^[69] Dieser besteht aus zwei übereinander liegenden Porphyrinen, die an den Seiten verknüpft sind (siehe Abb. 3.14). Mit **60** wurden Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} \sim 1000 \text{ M}^{-1}$ für Monosaccharide in 5 % MeOH /Wasser bestimmt. Allerdings konnte keine Selektivität für bestimmte Zucker gefunden werden. Im Gegensatz dazu zeigten Di- und Trisaccharide höhere Bindungskonstanten mit $K_{\text{Ass}} \sim 50000 \text{ M}^{-1}$, wobei die Bindungskonstanten von Mono- zu Trisacchariden anstiegen. Die Selektivität für Trisaccharide basiert wahrscheinlich auf der relativen Größe der Saccharide, die genau in die Kavität passen.

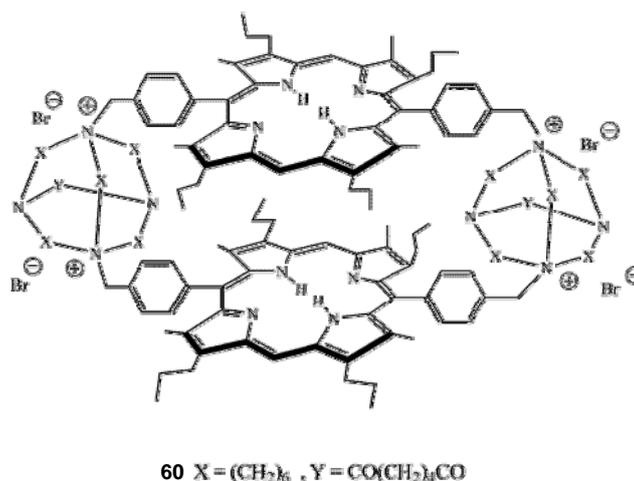
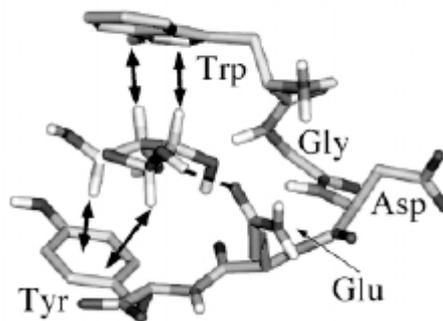


Abb. 3.14: Di-Porphyrin-Rezeptor **60** nach Schmidtchen et al. zur Komplexierung von Zuckern.

Einen kombinatorischen Ansatz zur Entwicklung von Kohlenhydrat-Rezeptoren wählten Sugimoto und Mitarbeiter.^[70] In Anlehnung an die natürlichen Zucker-

bindenden Proteine, die Lectine, stellten sie eine Bibliothek aus 62000 Mitgliedern von Pentapeptiden her, die an den Positionen i und $i+4$ hydrophobe Aminosäure beinhalten, mit denen Sandwich-Komplexe aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen mit den Zuckern gebildet werden sollten. So konnten für verschiedene Pentapeptide mit Fluoreszenz-Spektroskopie Bindungskonstanten von bis zu $K_{\text{Ass}} = 3.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ in Wasser gefunden werden. Allerdings muss man hierbei beachten, dass die Ergebnisse nicht mit anderen spektroskopischen Methoden bestätigt wurden. Außerdem wurden die Messungen bei 1°C durchgeführt, was sehr untypisch ist, da normalerweise Titrations bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Da die Bindungskonstante aber von der Temperatur abhängt und mit steigender Temperatur abnimmt, könnte es sogar sein, dass bei Raumtemperatur keine Komplexbildung mehr stattfindet, weswegen auch kein direkter Vergleich mit anderen Systemen möglich ist.



61

Abb. 3.15: Energieminimierte Struktur des Komplexes aus dem Pentapeptid 61 (Tyr-Glu-Asp-Gly-Trp) und Erythrose. Die Pfeile und Linien beschreiben die nicht-kovalenten Wechselwirkungen im Komplex.

Neben diesen wenigen Beispielen für die Komplexbildung von Zuckern in wässrigen Medien gibt es noch viele Beispiele für die Erkennung in unpolaren Medien. Diese Rezeptoren bestehen wiederum aus starren Kavitäten wie Calixarenen, Porphyrinen, Polyamiden und auch cyclischen Peptiden.^[71-74] Außerdem gibt es noch Rezeptoren auf Harnstoff-, Aminopyridin- und Pyridin-carboxylatbasis.^[75-77] Die Rezeptoren sind entweder neutral oder besitzen geladene Gruppen wie Phosphate oder Carboxylate. Ein paar aktuelle Beispiele für solche Rezeptoren sind in Abb. 3.16 gezeigt. Eine ausführliche Übersicht für die Zuckererkennung in unpolaren Medien wurde vor kurzem von *Davis et al.*

publiziert.^[10] Da diese Systeme allerdings nur in unpolaren Medien wie DCM ausreichend hohe Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} \sim 10^3 - 10^5 \text{ M}^{-1}$ aufweisen und das Ziel dieser Arbeit die Erkennung von Zuckern in wässrigen Medien war, werden sie hier nicht näher beschrieben.

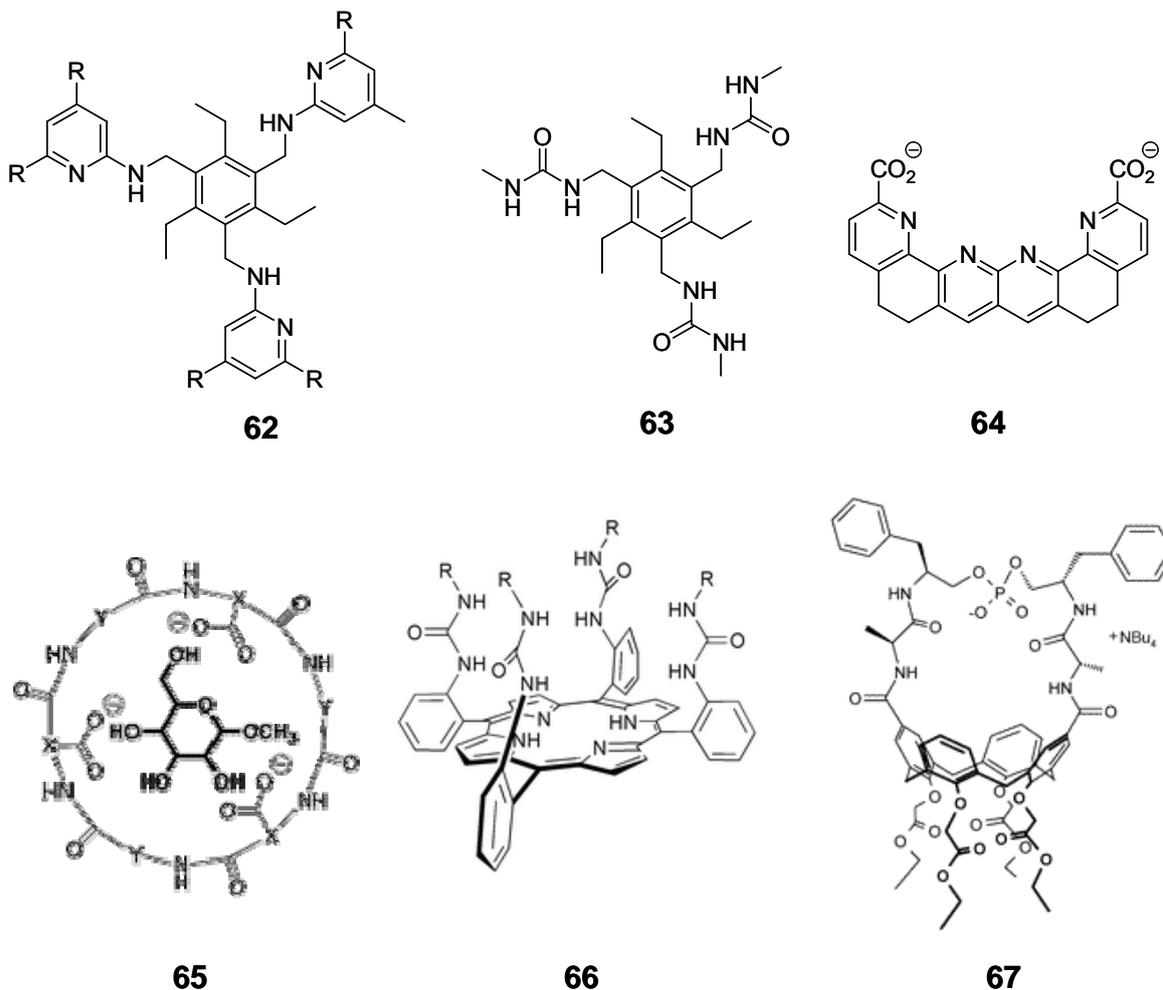


Abb. 3.16: Rezeptoren zur Komplexierung von Glucosiden in unpolaren Medien nach Mazik et al. **62**, Roelens et al. **63**, Diederich et al. **64**, Kubik et al. **65**, Bonar-Law et al. **66** und Bell et al. **67**.

Dennoch zeigen diese Arbeiten, dass mit einer Kombination aus polaren und unpolaren nicht-kovalenten Wechselwirkungen eine Erkennung von Zuckern sowohl in unpolaren Medien als auch in Wasser grundsätzlich möglich ist. Mit der Weiterentwicklung der in diesem Kapitel vorgestellten Systeme aufbauend auf den bisher gemachten Erfahrungen könnte es in Zukunft möglich sein, Zucker und Kohlenhydrate nach dem Vorbild der Natur in Wasser mit hohen Bindungskonstanten und Selektivitäten zu erkennen.

3.4 Methoden zur Bestimmung von Bindungskonstanten

Für die Bestimmung von Bindungskonstanten gibt es verschiedene physikalisch-organische Methoden, die jeweils ihre eigenen Vor- und Nachteile aufweisen. Oft genutzte Verfahren zur Bestimmung von Bindungskonstanten sind optische Methoden wie UV- oder Fluoreszenzspektroskopie, NMR-Spektroskopie oder auch die Kalorimetrie.^[78-80] Da im Rahmen dieser Arbeit nur die optischen, spektroskopischen Methoden und die NMR-Spektroskopie angewendet wurden, werden diese in den nächsten beiden Kapiteln ausführlich beschrieben.

3.4.1 NMR-spektroskopische Methoden

Ein großer Vorteil der Bestimmung von Bindungskonstanten mittels der NMR-Spektroskopie gegenüber den optischen Methoden ist, dass aus den Verschiebungen der einzelnen Signale, die durch die Komplexierung hervorgerufen werden, wichtige Strukturinformationen erlangt werden können. Man kann somit aus den Ergebnissen schließen, welche funktionellen Gruppen des Rezeptors an der Bindung beteiligt sind, wenn Änderungen in den chemischen Verschiebungen beobachtet werden. Mit diesen Informationen können dann die Rezeptorstrukturen optimiert werden.

Die Bestimmung von Bindungskonstanten über die NMR-Spektroskopie beruht auf den Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Signale, die durch die Komplexierung hervorgerufen werden. Diese bezeichnet man auch als "complexation-induced shifts" (CIS), die durch die Änderungen der chemischen Umgebungen der einzelnen funktionellen Gruppen entstehen. Diese können durch Wechselwirkungen wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbrücken oder auch unpolare Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat hervorgerufen werden. Allerdings können auch Protonierungsreaktionen ausschlaggebend sein, die ähnliche Kurvenverläufe wie Bindungsisothermen aufweisen, weswegen später in diesem Kapitel auch noch ein Experiment vorgestellt, mit dem die Ergebnisse darauf überprüft werden können.^[81]

Da Bindungsprozesse allerdings dynamische Vorgänge sind, spielen die Austauschgeschwindigkeiten zwischen dem freien Substrat, dem freien Rezeptor und dem Komplex im Vergleich mit der NMR-Zeitskala für die Auswertung der Spektren eine entscheidende Rolle. Ist der Austauschprozess langsam im Vergleich zur NMR-Zeitskala, zeigen die freien Komponenten und der Komplex verschiedene Signale, die separat ausgewertet werden können. So können die Konzentrationen direkt über die Integration der einzelnen Signale erhalten werden. Ist der Austausch allerdings schneller, so überlagern sich die Signale des Komplexes und der freien Komponenten. Da im Rahmen dieser Arbeit nur der zweite Fall beobachtet wurde, wird die Formel für die Bestimmung der Bindungskonstante kurz hergeleitet.

Die Komplexierung nach einem einfachen 1:1 Modell zwischen einem Rezeptor R und einem Substrat S zu einem Komplex RS wird durch folgendes Gleichgewicht beschrieben:



Unter Vernachlässigung der Aktivitätskoeffizienten lautet das Massenwirkungsgesetz für die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante (K_{Ass} bzw. K_{Diss}):

$$K_{\text{Ass}} = \frac{[RS]}{[R] \cdot [S]} = \frac{1}{K_{\text{Diss}}} \quad (2)$$

Für die Konzentrationen des Rezeptors und des Substrates im Gleichgewicht gilt:

$$[R] = [R_0] - [RS] \quad (3)$$

$$[S] = [S_0] - [RS] \quad (4)$$

mit $[S_0]$ und $[R_0]$ = Startkonzentrationen von Rezeptor und Substrat.

Wie schon oben erwähnt lassen sich Gleichgewichte mit schnellen Austauschgeschwindigkeiten nicht direkt auswerten, da die Signale unterschiedlicher chemischer Verschiebung vom Komplex und der freien

Komponenten zu einem Signal mit einer gewichteten mittleren Verschiebung zusammenfallen, die sich durch folgende Formel beschreiben lässt:

$$\delta_{\text{beo}} = \frac{[\text{R}_0] - [\text{RS}]}{[\text{R}_0]} \cdot \delta_{\text{R}} + \frac{[\text{RS}]}{[\text{R}_0]} \cdot \delta_{\text{RS}} \quad (5)$$

bzw.

$$\delta_{\text{beo}} = \delta_{\text{R}} + \frac{[\text{RS}]}{[\text{R}_0]} \cdot \Delta\delta \quad (6)$$

mit

$$\Delta\delta = \delta_{\text{RS}} - \delta_{\text{R}} \quad (7)$$

δ_{beo} = beobachtete chemische Verschiebung

δ_{R} = chemische Verschiebung des freien Rezeptors

δ_{RS} = chemische Verschiebung des Komplexes RS

Somit ist die bei der Titration beobachtete chemische Verschiebung eine Funktion der Startkonzentration des Rezeptors, der chemischen Verschiebung des freien Rezeptors, der chemischen Verschiebung des Komplexes und der Gleichgewichtskonzentration des Komplexes.

Setzt man nun die Formeln (2) und (3) gleich, substituiert die erhaltene Formel in (4) und löst die daraus resultierende quadratische Gleichung, gelangt man zu folgender Formel, die die Gleichgewichtskonzentration des Komplexes beschreibt:

$$[\text{RS}] = \frac{1}{2} \left\{ K_{\text{Diss}} + [\text{R}_0] + [\text{S}_0] - \sqrt{(K_{\text{Diss}} + [\text{R}_0] + [\text{S}_0])^2 - 4 \cdot [\text{R}_0] \cdot [\text{S}_0]} \right\} \quad (8)$$

Setzt man nun noch Formel (6) und (8) gleich, gelangt man zu folgender Formel, die die beobachtete chemische Verschiebung in Abhängigkeit von den Startkonzentrationen des Rezeptors und des Substrats, der chemischen Verschiebung des freien Rezeptors, der chemischen Verschiebung des Komplexes und der Dissoziationskonstante als zu bestimmende Funktion beschreibt.

$$\delta_{\text{beo}} = \delta_{\text{R}} + \frac{\Delta\delta}{2 \cdot [\text{R}_0]} \cdot \left\{ K_{\text{Diss}} + [\text{R}_0] + [\text{S}_0] - \sqrt{(K_{\text{Diss}} + [\text{R}_0] + [\text{S}_0])^2 - 4 \cdot [\text{R}_0] \cdot [\text{S}_0]} \right\} \quad (9)$$

Diese Gleichung beschreibt eine Hyperfläche, die durch die Variablen $[\text{R}_0]$, $[\text{S}_0]$ und $\Delta\delta$ bestimmt wird. Bei einem Experiment wird aber üblicherweise nur ein zweidimensionaler Ausschnitt aus dieser Hyperfläche beobachtet, da bei der Titration normalerweise eine Konzentration konstant gehalten wird, während die andere Komponente zugegeben wird. Bei der Auswertung wird Gleichung (9) dann mit einer iterativen nicht linearen Kurvenregression an die beobachteten chemischen Verschiebungen angepasst. Alle anderen Variablen sind entweder bekannt oder werden durch die Anpassung ermittelt.

Bei der Auswertung der Ergebnisse muss man beachten, dass große C/S nicht gleichzeitig große Bindungskonstanten bedeuten. Vielmehr zeigt sich die Stärke der Komplexierung anhand des Kurvenverlaufs, d.h. hat die Titrationskurve eine starke Krümmung, handelt es sich um hohe Bindungskonstanten, zeigt sie eine schwache Krümmung, handelt es sich um geringere Bindungskonstanten. Die Größe der C/S hängt meistens davon ab, wie groß die Änderung der chemischen Umgebung der einzelnen Atome durch die Komplexierung ist. Deshalb weisen funktionelle Gruppen, die direkt an der Bindung beteiligt sind, meistens die größten chemischen Verschiebungen auf, während Atome, die nur indirekt, über weit reichende Elektronendichteververschiebungen an der Bindung beteiligt sind, schwächere C/S zeigen. Da allerdings bei allen Signalen immer die gleiche Komplexierung stattfindet, sollte der Kurvenverlauf bei allen Signalen identisch sein und somit bei der Auswertung die gleichen Bindungskonstanten liefern. Bei den Experimenten werden meistens die funktionellen Gruppen beobachtet, die direkt an der Bindung beteiligt sind und somit die größten C/S aufweisen, da sie die geringeren Fehler haben sollten als die Gruppen mit kleinen C/S .

Pearson und *Deranleau* konnten zeigen, dass aussagekräftige Informationen über die Stärke einer Bindungskonstante nur in einem bestimmten Teil der Titrationskurve enthalten sind.^[82,83] Die Bindungsisotherme wird durch den p-Wert ("probability of binding") beschrieben, der als Verhältnis aus Konzentration von Komplex und maximaler Konzentration des Komplexes definiert ist. Dieser p-Wert sollte zwischen 0.2 und 0.8 liegen, da sich außerhalb dieser Bereiche, in denen Rezeptor und Substrat im hohen Überschuss vorliegen, die Bindungsisothermen von schwachen und starken Komplexen nicht mehr großartig unterscheiden und

deswegen keine Informationen über die Stärke der Komplexierung erhalten werden können.

Das bedeutet, dass Bindungskonstanten nur bestimmt werden können, wenn der Kurvenverlauf eine Krümmung in Form einer Exponentialfunktion aufweist und ein Plateau in der chemischen Verschiebung erreicht wird. Außerdem ist es ungünstig, wenn der Kurvenverlauf nur langsam oder gar kein Plateau erreicht, da sonst große Fehler bei der Bestimmung der maximalen Verschiebung des Komplexes auftreten können und somit die Bindungskonstante nur mit großen Fehlern bestimmt werden kann.

Der ideale Konzentrationsbereich zur Bestimmung von Bindungskonstanten liegt ungefähr bei $c = 10^{\pm 1} \cdot K_{\text{ASS}}$. Deswegen sollten zuerst Probetitrationen durchgeführt werden, um die Bindungskonstante grob zu bestimmen, damit die optimale Konzentration für die Bindungsstudien ermittelt werden kann.

Bei der Bestimmung von Bindungskonstanten muss aber immer auch darauf geachtet werden, ob Rezeptor und/oder Substrat saure bzw. basische Gruppen enthalten, denn Protonierungsreaktionen zeigen oft ähnliche Kurvenverläufe wie Bindungsisothermen, da es bei beiden zu einer Änderung der chemischen Umgebung des Rezeptors bzw. Substrats kommt.^[81] Deswegen muss bei der Beobachtung von Bindungsphänomenen zwischen einer reinen Komplexierung, einer Säure-Base-Reaktion und einer Kombination aus beiden unterschieden werden. Dies lässt sich anhand eines einfachen Verdünnungsexperimentes aufklären. Dazu wird eine äquimolare Lösung aus Rezeptor und Substrat hergestellt und sukzessive verdünnt. Das Verhältnis der beiden Komponenten bleibt dabei konstant, während die Konzentrationen abnehmen. Zeigt der Verlauf der chemischen Verschiebungen einen linearen Verlauf, so handelt es sich um eine Säure-Base-Reaktion, da diese nicht konzentrationsabhängig ist. Zeigt die Isotherme allerdings einen hyperbolischen Verlauf, handelt es sich um eine Komplexierung, da diese konzentrationsabhängig ist. Bei einem linearen Verlauf muss man aber noch zwischen einer reinen Säure-Base-Reaktion und einer Kombination mit einer Komplexierung unterscheiden. Dies kann allerdings mit NMR-Methoden nicht bestimmt werden. Informationen darüber kann die Bestimmung von pK_S -Werten der einzelnen Komponenten liefern.

Die Berechnung von Bindungskonstanten mit den oben hergeleiteten Gleichungen ist allerdings nur möglich, wenn die genaue Stöchiometrie des Komplexes bekannt

ist, in diesem Fall nur bei 1:1 Komplexen. Wenn nun höhere Komplexe vorliegen, beruht die Formel zur Komplexierung auf einem anderen Massenwirkungsgesetz und die hergeleiteten Formeln haben somit keine Gültigkeit.

Methoden zur Bestimmung der Stöchiometrie sind:

- Job-Plot z.B. mittels NMR- und UV-Spektroskopie^[84]
- Massenspektrometrie
- Röntgenstrukturanalyse

Während die beiden letzten Experimente die Stöchiometrie ohne weitere Auswertungen liefern, aber nicht notwendigerweise die Situation in Lösung widerspiegeln, da es sich hier um Gasphasen- und Festkörperuntersuchungen handelt, müssen bei den Job Plots mehrere NMR-Spektren aufgenommen werden. Hierzu werden Lösungen aus Rezeptor und Substrat hergestellt, die die gleiche Gesamtmolalität aufweisen, sich aber im Verhältnis von Rezeptor zu Substrat unterscheiden. Dabei zeigen die Änderungen der chemischen Verschiebungen multipliziert mit dem Molenbruch ein Maximum bei dem Molenbruch, der der Stöchiometrie des Komplexes entspricht.

Der große Vorteil der Bestimmung von Bindungskonstanten mittels der NMR-Spektroskopie liegt wie oben schon beschrieben in den detaillierten strukturellen Ergebnissen, die die chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale liefern. Allerdings birgt die NMR-Spektroskopie auch Nachteile. Z.B. werden relativ hohe Konzentrationen ($c > 1 \text{ mM}$) benötigt, um gut aufgelöste NMR-Spektren erhalten zu können. Das ist meistens mit Löslichkeitsproblemen verbunden, da viele Rezeptoren in Wasser nur begrenzt löslich sind, in unpolareneren Lösemitteln allerdings zu starke Bindungskonstanten aufweisen, um sie mit nichtlinearen Regressionsanalysen bestimmen zu können (siehe oben). Außerdem können auch Probleme mit Änderungen des pH-Wertes während der Titration oder auch Säure-Base-Reaktion auftreten, die die Ergebnisse verfälschen. Der Einsatz von Puffern bei der NMR-Spektroskopie ist meistens schwierig, da die Puffer Signale die Signale des Rezeptors oft überlagern.

Diese beiden Nachteile sprechen für die Verwendung von optischen Methoden, da hier weit niedrigere Konzentrationen ($c > 1 \cdot 10^{-7}$ M) verwendet und Puffer gewählt werden können, die keine Absorption im gleichen Wellenlängenbereich aufweisen wie der Rezeptor. Deswegen werden im nächsten Kapitel die Grundlagen zur Bestimmung von Bindungskonstanten mit optischen Methoden vorgestellt.

3.4.2 UV- und Fluoreszenz-spektroskopische Methoden

Wie schon im vorherigen Kapitel erwähnt bieten die optischen Methoden - die UV- und Fluoreszenzspektroskopie - zur Bestimmung von Bindungskonstanten Vorteile gegenüber der NMR-Spektroskopie. Die größten Vorteile sind dabei der geringere Konzentrationsbereich und der Einsatz von gepufferten Lösungen, so dass Protonierungsreaktionen keinen Einfluss auf die Bestimmung von Bindungskonstanten haben bzw. diese nicht auftreten sollten. Bei der UV- und Fluoreszenzspektroskopie werden, ähnlich wie bei der NMR-Spektroskopie, die elektronischen Änderungen, die durch die Komplexbildung hervorgerufen werden, beobachtet. Bei einer Komplexbildung kommt es zu einer Elektronendichteververschiebung im Molekül. Allerdings werden für die UV-Spektroskopie Chromophore benötigt, die im Bereich von 200-700 nm eine Absorption aufweisen. Das heißt im einfachsten Fall werden Aromaten wie Pyrrol verwendet, das z.B. ein Maximum der UV-Absorption bei $\lambda \sim 300$ nm zeigt. Hat das Molekül kein Chromophor, gibt es noch eine andere Möglichkeit, Bindungskonstanten über optische Methoden zu bestimmen. Dies bezeichnet man als *indicator displacement assay*, der später noch ausführlicher betrachtet wird.^[78] Bei der Komplexbildung eines Carboxylats durch einen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor konnten bereits Bindungskonstanten über die Änderung der Pyrrol-Bande bei $\lambda = 300$ nm bestimmt werden.^[85,86] Dies liegt einerseits daran, dass das Pyrrol üblicherweise eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carboxylat ausbildet, wodurch es zu einer Elektronendichteververschiebung im Rezeptor kommt. Außerdem sollte auch die ionische Wechselwirkung des Acylguanidins mit dem Carboxylat noch einen Einfluss auf die Elektronendichte im Pyrrol haben. Diese Faktoren führen dazu, dass Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren bei der

Komplexierung von Carboxylaten Abnahmen der UV- Absorption aufweisen. Auf die gleiche Art und Weise kann mittels Fluoreszenzspektroskopie eine Änderung der Fluoreszenzbande des Pyrrols bei $\lambda = 335 \text{ nm}$ beobachtet werden. Die Grundlagen zur Bestimmung von Bindungskonstanten mittels optischer Methoden werden im Folgenden kurz hergeleitet.

Das Massenwirkungsgesetz für einen 1:1 Komplex aus Rezeptor und Substrat lautet:

$$K_{\text{Ass}} = \frac{[\text{RS}]}{[\text{R}] \cdot [\text{S}]} \quad (2)$$

Es wird nun eine Funktion benötigt, die die Observable Absorption A mit der zu bestimmenden Bindungskonstante K_{Ass} in Verbindung bringt. Die Absorption einer Lösung wird beschrieben durch die Konzentrationen und die molaren Extinktionskoeffizienten des freien Rezeptors ϵ_{R} , Substrats ϵ_{S} und des Komplexes ϵ_{SR} :

$$A = \epsilon_{\text{R}} \cdot [\text{R}] + \epsilon_{\text{S}} \cdot [\text{S}] + \epsilon_{\text{RS}} \cdot [\text{RS}] \quad (10)$$

Da die freien Konzentrationen an Rezeptor und Substrat aber nicht bestimmt werden können, müssen diese noch durch die bekannten Startkonzentration $[\text{R}_0]$ und $[\text{S}_0]$ ersetzt werden. Es gilt:

$$[\text{R}_0] = [\text{R}] + [\text{RS}] \text{ bzw. } [\text{R}] = [\text{R}_0] - [\text{RS}] \quad (11)$$

sowie

$$[\text{S}_0] = [\text{S}] + [\text{RS}] \text{ bzw. } [\text{S}] = [\text{S}_0] - [\text{RS}] \quad (12)$$

und

$$\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{RS}} - \epsilon_{\text{S}} - \epsilon_{\text{R}} \quad (13)$$

Nach Substitution der Gleichungen (11)-(13) mit Gleichung (14) erhält man den folgenden Ausdruck für die Absorption A:

$$A = \varepsilon_R \cdot [R_0] + \varepsilon_S \cdot [S_0] + \Delta\varepsilon \cdot [RS] \quad (14)$$

Ersetzt man nun die Konzentration des Komplexes [RS] durch Gleichung (2), gelangt man zu folgender Gleichung, die die Absorption in Abhängigkeit von der Bindungskonstante beschreibt.

$$A = \varepsilon_R \cdot [R_0] + \varepsilon_S \cdot [S_0] + \Delta\varepsilon \cdot K_{Ass} \cdot [R] \cdot [S] \quad (15)$$

Analog zu Gleichung (10) sind hier wiederum die freien Konzentrationen von Rezeptor und Substrat gegeben, die nicht bekannt sind. Mit Hilfe von Gleichung (2) und (12) gelangt man nun zu folgender Gleichung, in der die Absorption noch in Abhängigkeit zur zu bestimmenden Bindungskonstante und der freien Konzentration an Substrat steht:

$$A = \varepsilon_R \cdot [R_0] + \varepsilon_S \cdot [S_0] + \frac{\Delta\varepsilon \cdot K_{Ass} \cdot [R_0] \cdot [S]}{1 + K_{Ass} \cdot [S]} \quad (16)$$

Die unbekannte freie Konzentration an Substrat kann nun über eine Taylorreihenentwicklung nach $[S_0]$ aufgelöst werden:

$$[S] = [S]_0 - \frac{K_{Ass} \cdot [R]_0 \cdot [S]_0}{(1 + K_{Ass} \cdot [S]_0)^2 + K_{Ass} \cdot [R]_0} \quad (17)$$

Substituiert man nun Gleichung (17) in (16) erhält man folgende Gleichung, in der die Absorption nur noch in Abhängigkeit zur Bindungskonstante und dem molaren Absorptionskoeffizienten des Komplexes RS steht:

$$A = \varepsilon_R \cdot [R_0] + \varepsilon_S \cdot [S_0] + \frac{K_{Ass} \cdot [R]_0 \cdot \Delta\varepsilon \cdot \left\{ \frac{K_{Ass} \cdot [R]_0 \cdot [S]_0}{(1 + K_{Ass} \cdot [S]_0)^2 + K_{Ass} \cdot [R]_0} \right\}}{K_{Ass} \cdot \left\{ \frac{K_{Ass} \cdot [R]_0 \cdot [S]_0}{(1 + K_{Ass} \cdot [S]_0)^2 + K_{Ass} \cdot [R]_0} \right\} + 1} \quad (18)$$

Diese Formel wurden zur Bestimmung von Bindungskonstanten für 1:1 Komplexe mittels einer nichtlinearen Regressionsanalyse verwendet. Da allerdings der molare Absorptionskoeffizient des Komplexes unbekannt ist, muss dieser ebenfalls bei der Anpassung an die experimentellen Daten berechnet werden. Hier liegt auch die Hauptfehlerquelle bei der Anpassung an die experimentellen Daten. Der molare Absorptionskoeffizient des Komplexes sollte sich stark von dem des Rezeptors unterscheiden, da ansonsten keine exakte Bestimmung der Bindungskonstante möglich ist, bzw. große rechnerische Fehler auftreten. Je geringer der Unterschied ist, desto mehr ähnelt die Komplexierung der reinen Verdünnung des Rezeptors, so dass mit nichtlinearen Regressionsanalysen keine Anpassung mehr möglich ist. Deswegen wird bei den Auswertungen der experimentellen Daten die Wellenlänge des Maximums der UV-Absorption verwendet, da hier die größten Unterschiede in der Absorption beobachtet werden können.

Die gleiche Formel kann ebenfalls für die Auswertung von Fluoreszenz-Titrationen verwendet werden, die noch einen weiteren Vorteil gegenüber den UV-Titrationen aufweisen. Diese Messmethode ist noch empfindlicher als die UV-Spektroskopie, so dass Konzentrationen von $c \sim 10^{-7}$ M bereits ausreichen, um Bindungskonstanten ermitteln zu können.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung von Bindungskonstanten mit optischen Methoden, auch wenn Rezeptor oder Substrat keine Absorption oder Fluoreszenz zeigen, bieten die so genannten *indicator displacement assays (IDA)*.^[78] Hierbei wird ein Reporter verwendet, der durch den Rezeptor komplexiert und durch das Substrat wieder verdrängt wird (siehe Abb. 3.17).

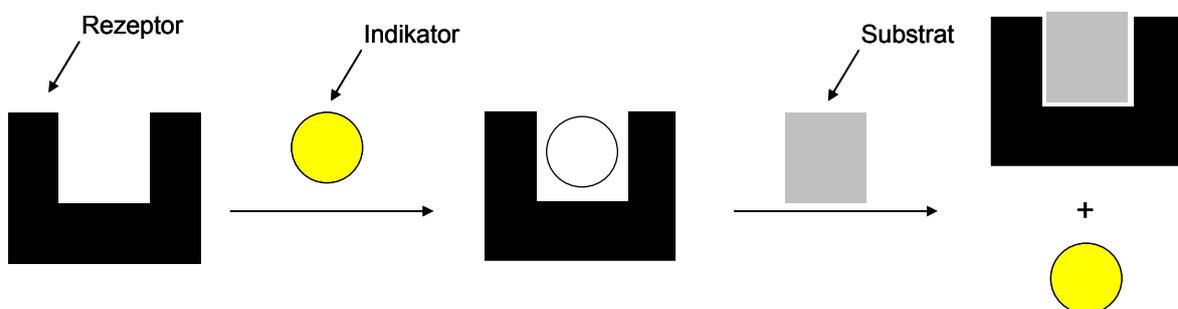


Abb. 3.17: Schematischer Ablauf eines indicator displacement assays.

Ein derartiger Reporter sollte ähnliche strukturelle Eigenschaften aufweisen wie das Substrat, das der Rezeptor erkennen soll. Zum Beispiel wurde von *Anslyn* der Reporter Carboxyfluorescein gewählt, der genau wie Citrat ein Trianion aber kein Tricarboxylat ist.^[26] Deswegen sollte es etwas schlechter binden als Citrat, aber ausreichend stark genug, um eine Bindungskonstante bestimmen zu können. Zuerst wird das Carboxyfluorescein vorgelegt und mit dem Rezeptor titriert. Dabei wird die Änderung der Absorption oder Fluoreszenz beobachtet und die Bindungskonstante für dieses System bestimmt. Im nächsten Schritt wird ein Komplex aus Rezeptor und Carboxyfluorescein vorgelegt und mit dem gewünschten Substrat titriert. Dabei sollte bestenfalls die ursprüngliche Absorption bzw. Fluoreszenz des Carboxyfluoresceins wiederhergestellt werden, da dieses aus dem Komplex verdrängt werden sollte. Mit der schon vorher bestimmten Bindungskonstante von Rezeptor und Carboxyfluorescein und einem kompetitiven Bindungsalgorithmus kann nun die Bindungskonstante aus der Verdrängungstitration bestimmt werden. Ein Beispiel für eine derartige experimentelle Durchführung ist in Abb. 3.18 gezeigt.^[12] Bei Zugabe des Rezeptors zum Indikator (siehe Abb. 3.18 A) kommt es zu einer Änderung der Absorption. Wird nun zu diesem Komplex das Substrat gegeben, wird die ursprüngliche Absorption des Indikators wieder hergestellt (siehe Abb. 3.18 B), das heißt der Indikator wird aus dem Komplex verdrängt.

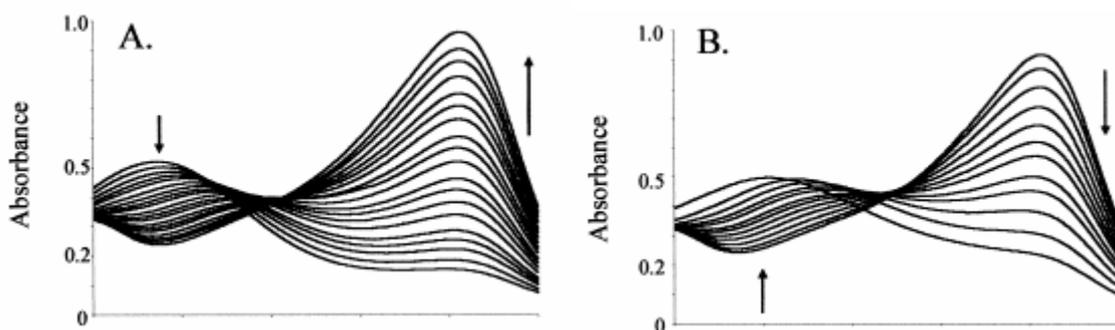


Abb. 3.18: Ablauf eines Indicator displacement assays. (links): Zunahme der Absorption des Indikators nach Zugabe des Rezeptors. (rechts) Abnahme der Absorption des Indikators durch Zugabe des Substrats aufgrund der kompetitiven Verdrängung des Indikators aus dem Komplex.

Interessant sind dabei aber nicht nur spektroskopischen Methoden zur Bestimmung von Bindungskonstanten, sondern auch Sensorsysteme, bei denen

man mit dem bloßen Auge die Gegenwart von bestimmten Analyten selektiv nachweisen kann. Dies kann sowohl über *IDAs* erfolgen, wenn ein nicht kovalent verknüpfter Reporter verwendet wird, der im sichtbaren Bereich eine Änderung in der Absorption bei der Komplexbildung des Rezeptors bzw. der Verdrängung aus dem Komplex zeigt, oder auch mit farbigen Rezeptoren, die ihre optischen Eigenschaften während der Komplexbildung ändern. Dies bezeichnet man auch als *naked eye detection*. In letzter Zeit wurden verschiedene Beispiele zur optischen Detektion von verschiedenen Analyten publiziert, die allerdings größtenteils auf starken Metall-Ligand-Wechselwirkungen oder auf der Ausbildung von kovalenten Bindungen, z.B. von Boronsäureestern, beruhen.^[87,88] Ein Beispiel für eine *naked eye detection* ist in Abb. 3.19 gezeigt. Durch Zugabe eines Analyten zum Rezeptor-Indikator-Komplex ändert sich die Farbe der Lösung von hellorange nach tiefrot, was auf die Freisetzung des Indikators aus dem Komplex hindeutet.^[87]

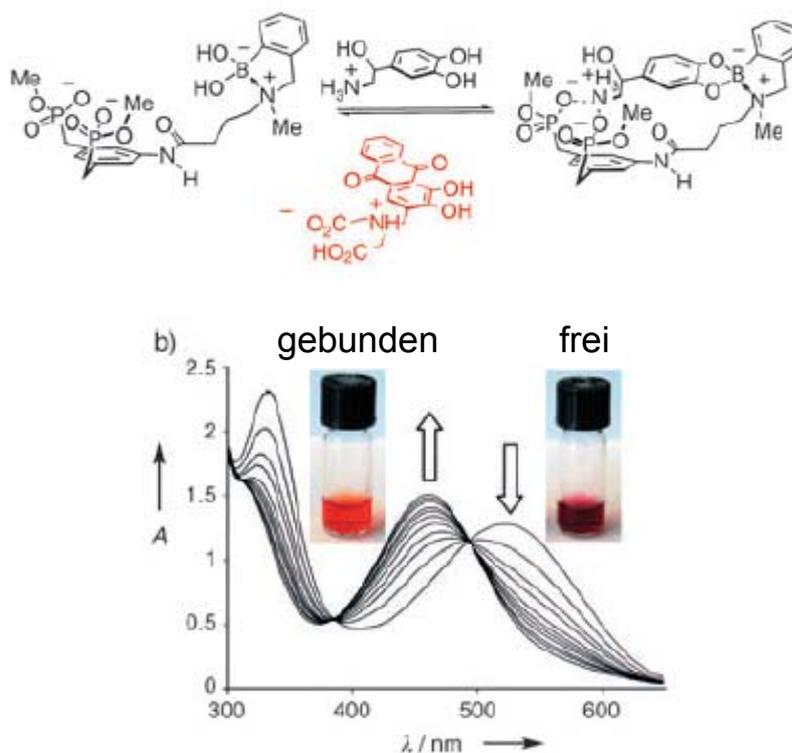


Abb. 3.19: Darstellung einer *naked eye detection* der Komplexbildung des Boronsäure-Rezeptors (links) von Catecholamin (Mitte). Als Indikator wird Alizarin-Komplexon (rot) verwendet, das in gebundener Form eine orangene Farbe zeigt. Bei Zugabe des Catecholamins zum Indikator-Rezeptor Komplex ändert sich die Farbe der Lösung nach tiefrot, was einer Verdrängung des Komplexons durch das Catecholamin aus dem Komplex entspricht

Die beiden spektroskopischen Methoden, die in diesem Kapitel vorgestellt wurden, zeigen klar definierte Vor- und Nachteile. Während bei der NMR-Spektroskopie strukturelle Informationen über die Komplexbildung erhalten werden können, werden bei den optischen Methoden geringere Konzentrationen benötigt und gepufferte Lösungen können leichter verwendet werden. Welche spektroskopische Methode die beste für die jeweilige Situation ist, hängt dabei vor allem von der Löslichkeit der Rezeptoren und Substrate ab. Ist die Löslichkeit gering, ist die optische Spektroskopie die Methode der Wahl, ist die Löslichkeit in wässrigen Medien groß, kann die NMR-Spektroskopie Vorteile bieten, da sie strukturelle Informationen über die Komplexbildung geben kann. Die Wahl der Methode muss also für jedes System aufgrund ihrer Vor- und Nachteile abgewogen werden.

4 Durchführung und Diskussion

In den nachfolgenden Kapiteln werden zunächst die Synthese und Untersuchungen des „einfachen“ multivalenten Guanidiniocarbonylpyrrolrezeptors **8** vorgestellt. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der physikalisch-organischen Charakterisierung, d.h. auf den Bindungsstudien mit diesem System. Danach werden die Synthesen der beiden Rezeptoren **17** und **18** mit Linker und die ersten vorläufigen Bindungsstudien mit diesen beiden Systemen vorgestellt.

Zum Schluss wird noch kurz auf die Entwicklung des cyclischen Acylguanidins **21** zur stereoselektiven Erkennung von Aminosäure-Carboxylaten eingegangen.

4.1 Synthese des Rezeptors **8**

Wie schon in Kapitel 3 erwähnt war das Ziel dieses Teils der Arbeit die Entwicklung eines multivalenten Guanidiniocarbonylpyrrolrezeptors zur Bindung von (poly)-anionischen Substraten. Das Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv sollte aufgrund seiner hervorragenden Eigenschaften bei der Komplexierung von Carboxylaten mehrfach an ein Templat gebunden werden.^[24] Als Templat wurde hierfür das Triamin **6** gewählt, das durch die alternierende Substitution mit Ethylgruppen die Rezeptorarme auf einer Seite des Templats fixiert, so dass der Rezeptor perfekt präorganisiert für die Komplexierung von komplementären Substraten sein sollte.^[26]

Die Retrosynthese des Rezeptors **8** ist in Abb. 4.1 gezeigt. Der Rezeptor sollte hierbei aus 3 Modulen aufgebaut werden:

1. Triamin-Templat **6**
2. Pyrrol-Baustein **33**
3. Guanidin-Baustein **34**

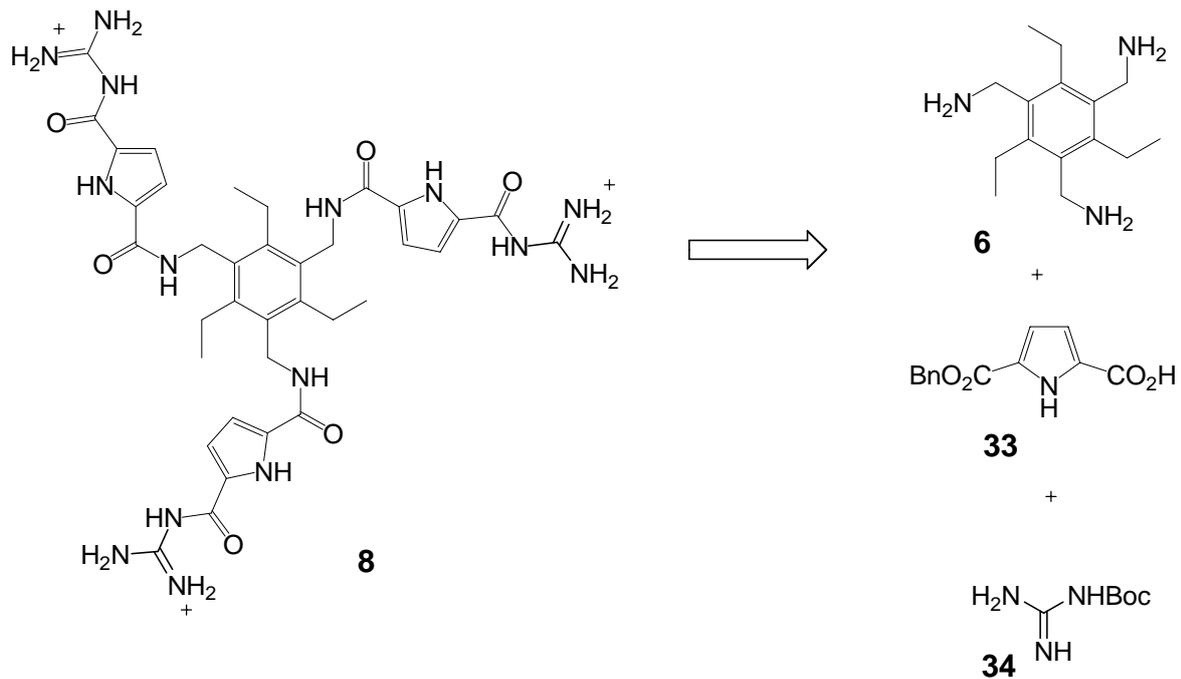


Abb. 4.1: Retrosynthese des Rezeptors **8** bestehend aus den 3 Modulen **6**, **33** und **34**.

Für die Synthese des Rezeptors sind nun zwei Wege möglich:

- Route 1 : Die Anbindung des Pyrrolbausteins **33** an das Templat und nach anschließender Entschützung Kupplung des Guanidin-Bausteins **34**.
- Route 2: Die Kupplung des Pyrrolbausteins **33** an den Guanidin-Baustein **34** und nach anschließender Entschützung Anbindung an das Templat **6**.

Die Vor- und Nachteile dieser beiden Synthesewege werden in den nächsten Kapiteln beschrieben. Zuvor werden in den folgenden Kapiteln allerdings die Arbeiten an den Synthesen der einzelnen Bausteine vorgestellt.

4.1.1 Synthese des Triamin-Templats **6**

Anslyn-Route:

Als Templat wurde das von *Anslyn* in seine Arbeiten zur Komplexierung von Anionen oft verwendete Triamin-Templat **6** gewählt.^[12,27] Wie schon oben erwähnt präorganisiert dieses Templat aufgrund seiner alternierenden Substituenten die freien Amine auf einer Seite des Benzolrings. Das Templat **6** wurde bereits 1993 von *Raymond* zur Präorganisation von Catecholaminen verwendet.^[89] Seitdem wurden verschiedene Routen zur Synthese dieses Bausteins entwickelt, von denen die Route nach *Anslyn* gewählt wurde.^[61]

Dazu wurde im ersten Schritt Triethylbenzol **69** mit Bromwasserstoff und Para-Formaldehyd in Essigsäure (33 %) bromomethyliert. Da hierbei allerdings keine vollständige, d.h. dreifache Substituierung, stattfindet, sondern nur ein Gemisch aus zwei- und dreifach bromomethyliertem Produkt entsteht, wurde die Reaktion ein zweites Mal, diesmal mit Kaliumbromid in Schwefelsäure und Essigsäure, durchgeführt. Hierbei konnte das Tribromid **71** mit einer Ausbeute von 45 % erhalten werden, was nahezu der Literatur-Ausbeute von 52 % entspricht.

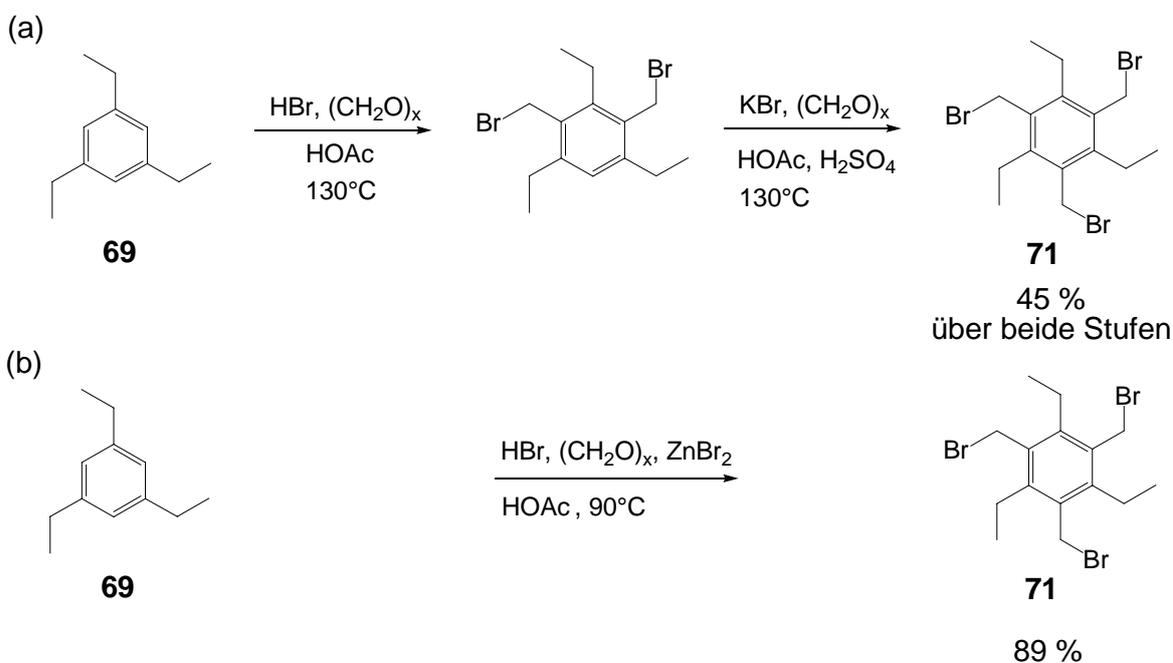


Abb. 4.2: Darstellung des Tribromids **71** (a) nach *Anslyn* und (b) nach *Roelens*.

Im späteren Verlauf dieser Arbeit wurde allerdings noch eine Synthese veröffentlicht, die weit bessere Ausbeuten lieferte. *Roelens et al.* konnten die

Ausbeute dieser Reaktion durch Zugabe von Zinkbromid als Lewisäure auf 97 % steigern, ohne dass eine zweite Umsetzung nötig war.^[75] Diese Synthese konnte mit einer Ausbeute von 89 % sehr gut nachvollzogen werden.

Der weitere Verlauf der Synthese des Templats nach *Anslyn et al.* ist in Abb. 4.3 dargestellt. Das Tribromid wurde mit Natriumazid zum Triazid **72** mit einer Ausbeute von 65 % umgesetzt, die etwas unter der Literatur-Ausbeute von 89 % liegt. Im nächsten Schritt wurde dann das Triazid in einer Staudinger Reaktion zum Triamin **6** reduziert.

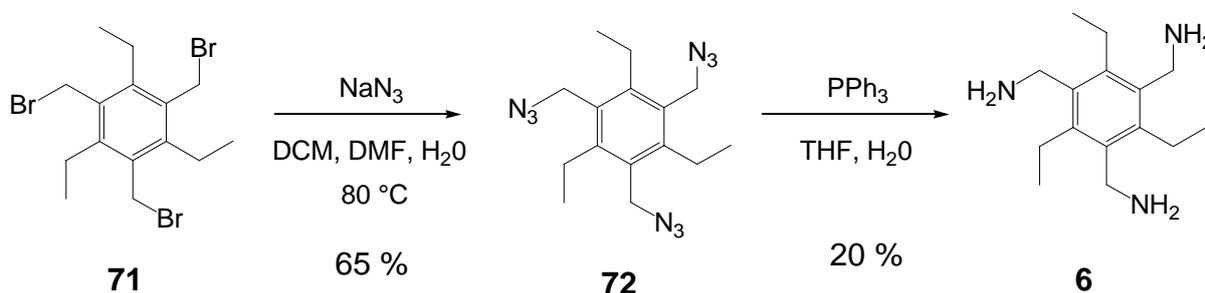


Abb. 4.3: Darstellung des Triamins **6** nach *Anslyn*.

Allerdings traten hierbei Probleme bei der Reinigung des Triamins auf. Aufgrund des amphiphilen Charakters des Moleküls war die Extraktion sehr problematisch, da es sich als deprotoniertes Amin sowohl in der wässrigen, basischen als auch in der organischen Phase löste. Außerdem konnten Spuren des bei der Reaktion entstehenden Triphenylphosphanoxids nicht abgetrennt werden. Auch eine Extraktion aus Chloroform mit verd. Salzsäure und anschließende Lyophilisierung lieferte kein sauberes Produkt. Nur nach wiederholtem Waschen der sauren, wässrigen Phase mit Chloroform konnte das Produkt sauber erhalten werden, was allerdings nur mit sehr hohen Ausbeuteverlusten möglich war, so dass das Triamin **6** nur mit Ausbeuten von ca. 20 % erhalten werden konnte. Diese Ausbeute liegt weit unter der angegebenen Literaturausbeute von 99 %. Die exakte Durchführung der Literaturvorschrift ohne zusätzliche Reinigungsschritte brachte das gewünschte, leicht verunreinigte Produkt allerdings mit einer Ausbeute von ~ 70 %. Es kann nur vermutet werden, dass die Autoren geringe Verunreinigungen bei der Isolierung ignorierten, so dass sie eine Ausbeute von 99 % erreichen konnten.

Da dieses Templat allerdings in größeren Mengen in hoher Reinheit für die Synthese des Rezeptors nötig war, wurde nach alternativen Syntheserouten gesucht. Dabei sollte aus sicherheitstechnischen Gründen auch darauf geachtet werden, dass der Einsatz von Natriumazid vermieden werden sollte.

Phthalid-Route:

Eine weitere Möglichkeit zur Überführung eines Halogenalkans in ein Amin ist die Gabrielynsynthese.^[90] Daher wurde das Tribromid analog zu einer Literaturvorschrift (Tributylderivat des Tribromids) mit Kaliumphthalid in DMF bei 60 °C für 3 h erhitzt.^[91] So konnte das Triphthalid **73** nach Extraktion mit einer Ausbeute von 44 % (Lit. 64 %) erhalten werden. Da diese Reaktion nur einmal durchgeführt wurde, wurden die Reaktionsbedingungen nicht weiter optimiert.

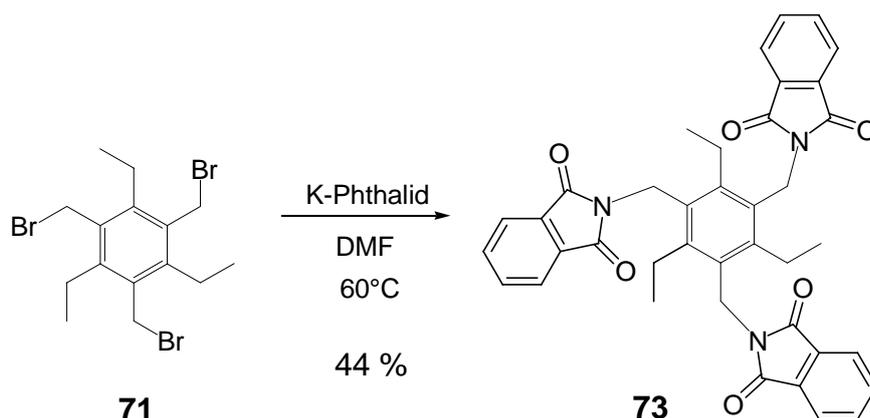


Abb. 4.4: Darstellung des Triphthalids **73**.

Im nächsten Schritt der Synthese wurde das Triphthalid **73** dann mit Hydrazinhydrat in Ethanol für 1 h im Rückfluss erhitzt. Allerdings traten hier die gleichen Probleme bei der Reinigung auf, die zuvor bei der Staudinger Reduktion beobachtet wurden. Wie oben schon beschrieben war eine saubere Aufarbeitung aufgrund des tensidischen Charakters des Triamins nicht möglich. In diesem Fall konnte das Produkt nicht von dem bei der Reaktion entstehenden Phthalhydrazids getrennt werden. So konnte wiederum das Produkt nur mit sehr hohen Ausbeuteverlusten sauber erhalten werden. Die Ausbeute lag hierbei unter 10 %. Da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit allerdings schon eine andere Synthese für das Templat entwickelt werden konnte, wurde diese Syntheseroute nicht weiter verfolgt.

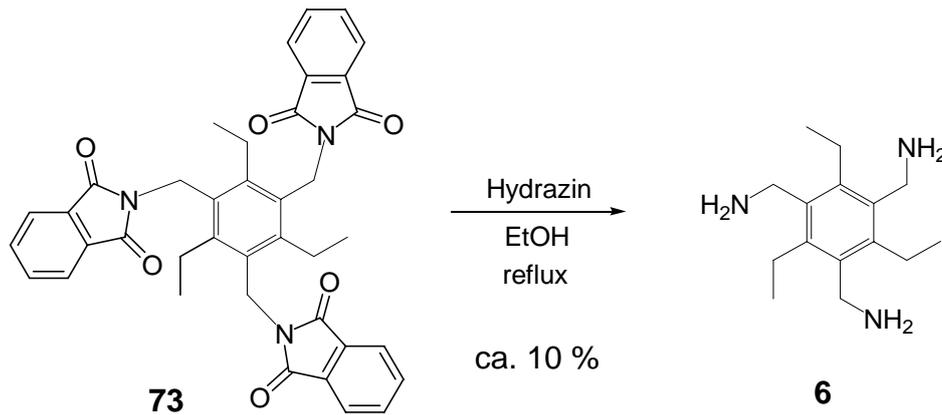


Abb. 4.5: Darstellung des Triamins **6** über die Phthalid-Route.

Allerdings wurde im späteren Verlauf der Promotion dann noch eine Synthese des Triamins über die Phthalid-Route veröffentlicht.^[75] *Roelens et al.* verwendeten DMSO als Lösmittel und führten die Reaktion bei 100 °C durch. So konnte das Triphthalid, das aus DMSO während der Reaktion größtenteils ausfiel, sehr einfach mit einer Ausbeute von 94 % erhalten werden (Lit. 97 %). Die Entschützung des Amins wurde in einer Mischung von Hydrazinhydrat in Ethanol/Toluol unter Erhitzen im Rückfluss durchgeführt. Durch die Zugabe von Toluol zum Reaktionsgemisch im Gegensatz zur oben durchgeführten Reaktion (siehe Abb. 4.5), fiel das gewünschte Produkt leicht verunreinigt aus der Lösung aus. Nach weiterer Aufarbeitung konnte so das Triamin **6** in einer Ausbeute von 69 % (Lit. 78 %) erhalten werden.

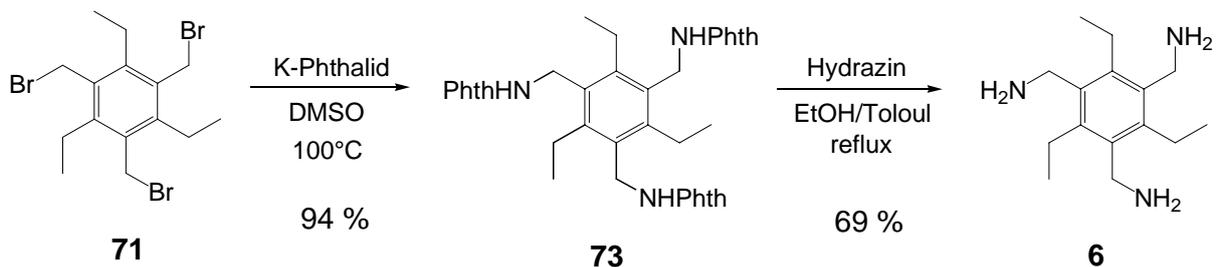


Abb. 4.6: Darstellung des Triamins **6** nach Roelens.

Allerdings konnte diese Synthese auch nur im kleinen Maßstab reproduziert werden. Bei einem größeren Ansatz im Gramm-Maßstab konnten die Ergebnisse nicht nachvollzogen werden, da das Triamin wie schon vorher beschrieben in der wässrigen, basischen Phase löslich war, so dass es nicht sauber extrahiert werden konnte. Da zu diesem Zeitpunkt im Rahmen dieser Arbeit schon eine

andere Synthese entwickelt worden war, die im nächsten Abschnitt vorgestellt wird, wurde diese Route ebenfalls nicht weiter verfolgt.

Boc-Route:

Da auch über die Phthalid-Route das Templat bei großen Ansätzen nicht mit guten Ausbeuten in hoher Reinheit erhalten werden konnte, wurde nach anderen Stickstoff-Nucleophilen gesucht, mit denen das Tribromid sauber in das Triamin umgewandelt werden kann. Allerdings sollten bei dieser Reaktion keine Nebenprodukte entstehen, da die Reinigung des Triamins wiederum sehr kompliziert werden kann. Eins der einfachsten Stickstoff-Nucleophile ist Ammoniak, welcher allerdings ein relativ schwaches Nucleophil ist.^[92] Deswegen ist wahrscheinlich ein sehr hoher Überschuss an Ammoniak nötig, um so das Triamin **6** erhalten und um eine Mehrfach-Alkylierung verhindern zu können. Ein weiterer Vorteil dieser Synthese ist, dass überschüssiger Ammoniak einfach destillativ entfernt werden kann, so dass keine weitere Reinigung nötig sein sollte.

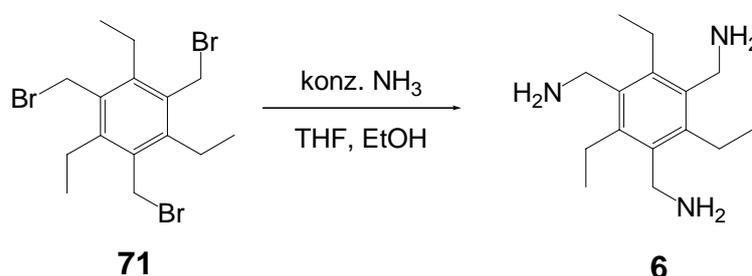


Abb. 4.7: Darstellung des Triamins **6** mit konz. Ammoniak.

So wurde das Tribromid **71** in einer Mischung aus konzentriertem Ammoniak, THF und Ethanol über Nacht gerührt und ohne weitere Aufarbeitung nur vom Lösemittel befreit.^[93] Das NMR-Spektrum dieser „Rohsubstanz“ war allerdings nicht ausreichend rein genug, um eine Ausbeute bestimmen zu können. Außerdem entstehen bei der Reaktion auch noch drei Äquivalente Ammoniumbromid, die nicht abgetrennt wurden. Eine saubere Extraktion des Triamins war wiederum aus den oben schon beschriebenen Gründen nicht möglich. Allerdings deutete das NMR der Rohsubstanz eine hohe Ausbeute und eine höhere Reinheit an, als bisher mit den anderen Syntheserouten erreicht werden konnte.

Deswegen wurde nach einer Möglichkeit gesucht, das Triamin aus dem Reaktionsgemisch sauber isolieren zu können. Hier bot sich die *in situ* Schützung des Triamins an, z.B. mit Carbamatschutzgruppen wie Cbz oder Boc.^[94] Deswegen wurde das Reaktionsgemisch der Umsetzung des Triamins vom überschüssigen Ammoniak befreit und direkt mit Boc-Anhydrid umgesetzt. Das so entstandene dreifach Boc-geschützte Templat **74** konnte nun sehr leicht durch Silicagel-Säulenchromatographie mit einer Ausbeute von 63 % erhalten werden. Die Entschützung mit Trifluoressigsäure lieferte quantitativ das Triamin in analytischer Reinheit, da bei der Entschützung nur flüchtige Nebenprodukte entstehen, die destillativ abgetrennt werden können.

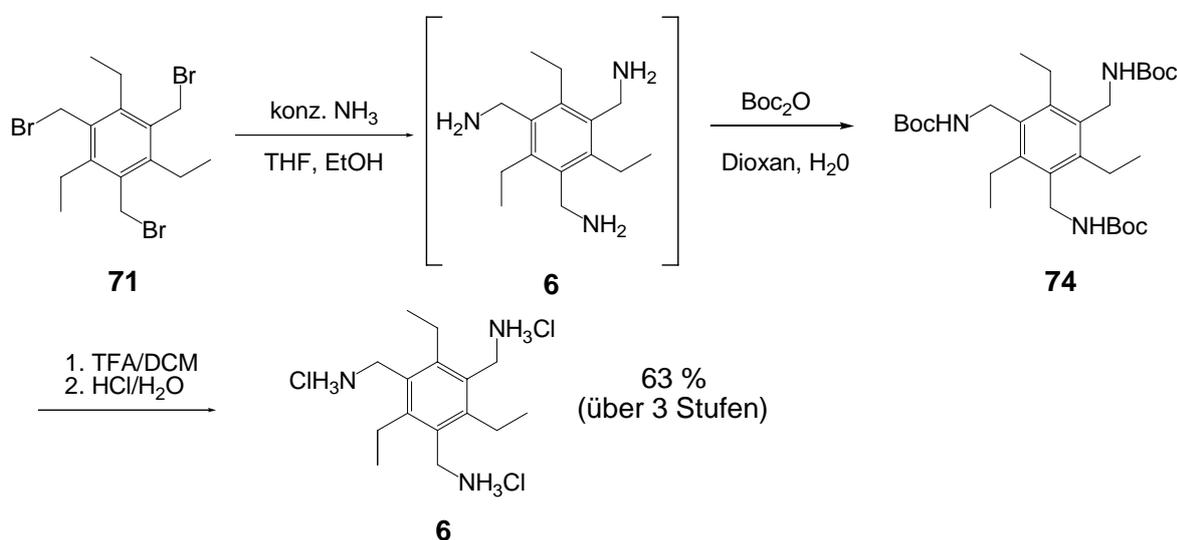


Abb. 4.8: Darstellung des Triamins **6** über die Boc-Route.

Im Rahmen dieses Teils der Arbeit konnte somit eine Synthese des Triamins **6** über eine dreistufige Synthese mit einer guten Gesamtausbeute von 63 % entwickelt werden. Die Synthese von *Roelens et al.* lieferte zwar höhere Ausbeuten bei kleinen Ansätzen, konnte aber bei größeren Ansätzen im „Gramm-Maßstab“ nicht mehr reproduziert werden, da sich das deprotonierte Triamin wiederum beim Extrahieren zu gut in der wässrigen Phase löste. Deswegen wurde für die Synthese des Rezeptors die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Synthese über die Boc-Route bevorzugt.

4.1.2 Synthese der Carboxylat-Bindungsstelle

Wie schon in Kapitel 2 erwähnt sollte das Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv nach *Schmuck* aufgrund seiner hervorragenden Eigenschaften bei der Komplexierung von Carboxylaten als Grundlagen für den multivalenten Rezeptor **8** dienen.^[24] Im Folgenden wird deswegen noch einmal kurz die Synthese dieses Bausteins vorgestellt.

Die Carboxylat-Bindungsstelle besteht aus einem Guanidin-Baustein **34** und einem Pyrrol-Baustein **33**. Für die Synthese des Rezeptors **8** wurde zunächst die Strategie verfolgt, zuerst nur den Pyrrol-Baustein an das Templat **6** zu koppeln, da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit noch keine Synthese für den Baustein **9** entwickelt worden war, die diesen in guten Ausbeuten und größeren Mengen zugänglich machte. Im zweiten Schritt sollte dann erst die Guanidineinheit eingefügt werden. Die Synthesen der beiden Bestandteile des Bindungsmotives werden im Folgenden kurz vorgestellt.

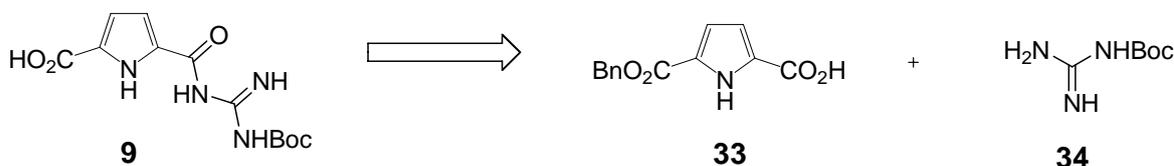
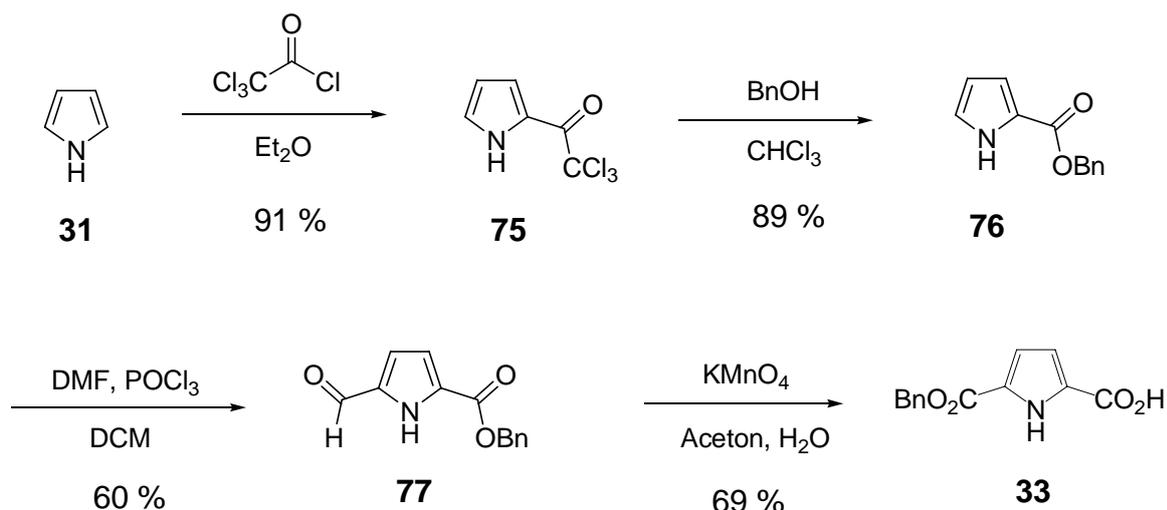
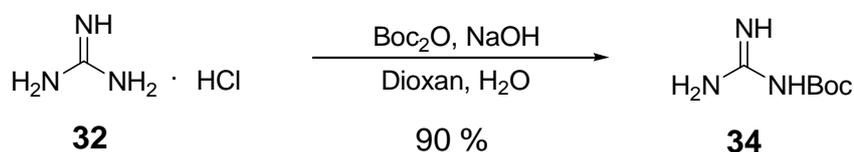


Abb. 4.9: Retrosynthese des Guanidiniumcarbonylpyrrol-Bausteins **9**.

Der Pyrrol-Baustein **33** wurde nach einer vierstufigen Synthese nach *Schmuck* und *Geiger* ausgehend von Pyrrol **31** (siehe Abb. 4.10) dargestellt.^[41] Im ersten Schritt der Synthese wird Pyrrol in 2-Position mit Trichloracetylchlorid acetyliert. Das Trichloracetylpyrrol **75** konnte mit einer Ausbeute von 91 % erhalten werden (Lit. 95 %). Dieses wurde dann in einer Haloform-Reaktion zum Benzylester **76** mit einer Ausbeute von 89 % umgesetzt (Lit. 95 %). Im nächsten Schritt der Synthese wurde der Benzylester **76** in einer Vilsmeier-Haack Formylierung mit Phosphorylchlorid und DMF in 5 Position formyliert. Das 4 substituierte Pyrrol, das ebenfalls bei dieser Synthese entsteht, wurde nicht isoliert und man erhielt den Aldehyd **77** mit einer Ausbeute von 60 % (Lit. 62 %). Im letzte Schritt der Synthese wurde der Aldehyd mit Kaliumpermanganat zur Carbonsäure oxidiert und man erhielt den Pyrrol-Baustein **33** mit einer Ausbeute von 69 % (Lit. 67 %).

Abb. 4.10: Synthese des Pyrrol-Bausteins **33**.

Der Guanidin-Baustein **34** wurde ebenfalls nach einer Synthese von *Geiger* und *Schmuck* hergestellt.^[41] Hierzu wurde Boc_2O in Gegenwart von NaOH mit einem fünffachen Überschuss an Guanidiniumhydrochlorid versetzt, um bevorzugt eine Mono-Schützung des Guanidins zu erreichen. So erhielt man den mono-geschützten Guanidin-Baustein **34** mit einer Ausbeute von 90 % (Lit. 92 %).

Abb. 4.11: Synthese des mono-geschützten Guanidin-Bausteins **34**.

Somit konnten alle benötigten Bausteine für die Synthese des Rezeptors **8** nach Route 1 (siehe nächste Seite) hergestellt werden.

Im späteren Verlauf dieser Arbeit konnte dann auch noch eine Synthese entwickelt werden, mit der der Guanidiniocarbonylpyrrol-Baustein **9** in hohen Ausbeuten und größeren Mengen hergestellt werden konnte. Das Problem der Synthese von Baustein **9** ist die Aufarbeitung nach der Entschützung des Benzylesters (siehe Abb. 4.12). Die freie Carbonsäure **9** ist in den meisten Lösemitteln schlecht löslich. Aus diesem Grund wird **9** in großen Mengen an DMF gelöst, damit die Palladium-Kohle abfiltriert werden kann. Das Produkt wurde dann wiederum durch Zugabe von Wasser zum DMF ausgefällt, wobei immer noch relativ viel Produkt in der wässrigen DMF-Phase gelöst blieb. Dieses Problem konnte dadurch behoben

werden, dass die Hydrogenolyse in Gegenwart von Triethylamin durchgeführt wurde, so dass das Carboxylat in Methanol löslich war. Auf diese Weise konnten die Ausbeuten auf 85 % gesteigert werden und man erhielt **9** als Triethylammonium-Salz.^[95]

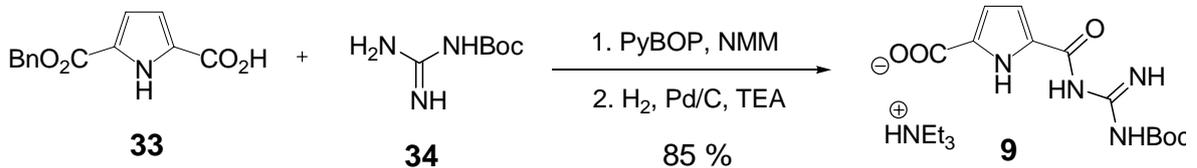


Abb. 4.12: Synthese des Guanidiniocarbonylpyrrols **9**.

Somit konnten nun auch alle Bausteine für die Synthese des Rezeptors **8** nach Route 1 und 2 (s.u.) erfolgreich hergestellt werden. Die Vor- und Nachteile dieser beiden Routen sowie deren Durchführung werden ausführlich im nächsten Kapitel beschrieben.

4.1.3 Modulare Synthese des Rezeptors **8**

Wie schon erwähnt ist die Synthese des Rezeptors **8** auf zwei verschiedenen Routen denkbar:

- Route 1 : Die Kupplung des Pyrrolbausteins **33** an das Templat **6** und nach anschließender Entschützung Einfügen des Guanidin-Bausteins **34**.
- Route 2: Die Kupplung des Pyrrolbausteins **33** an den Guanidin-Baustein **34** und nach anschließender Entschützung Anbindung an das Templat **6**.

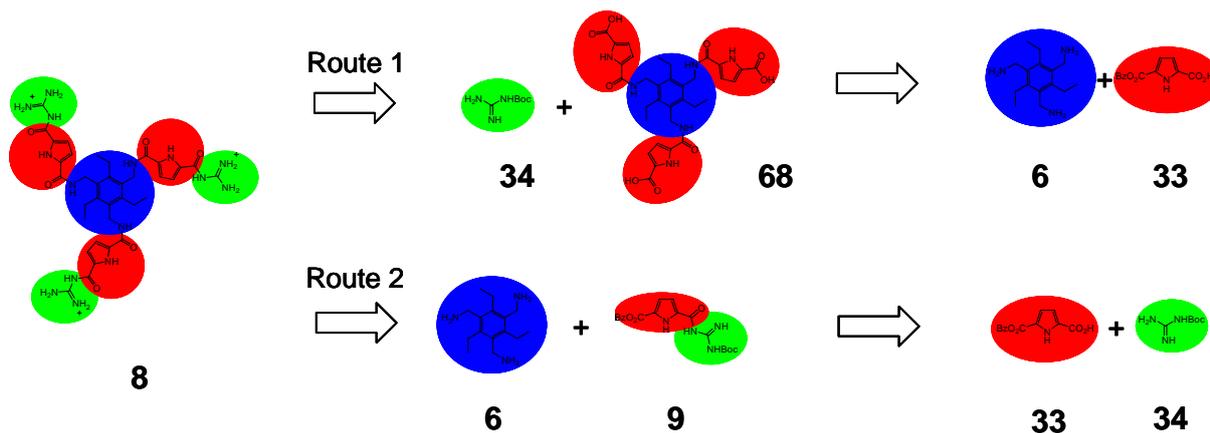


Abb. 4.13: Schematische Darstellung der zwei möglichen Routen zum Rezeptor **8** (Templat **6** = blau; Pyrrolbaustein **33** = rot; Guanidinbaustein **34** = grün).

Da am Anfang dieser Arbeit der Guanidiniocarbonylpyrrol-Baustein **9** nicht in ausreichender Menge vorhanden war, wurde als erstes die Route 1 verfolgt. Im späteren Verlauf dieser Arbeit war dann auch der Baustein **9** in größeren Mengen verfügbar, so dass später die zweite Route durchgeführt wurde.

Route 1:

Im ersten Schritt der Synthese sollte die Pyrrolcarbonsäure **33** an das Triamin **6** über eine Amidbindung gekuppelt werden. Hierfür wurden zwei Strategien ausgewählt:

1. Kupplung über das Säurechlorid
2. Kupplung über PyBOP oder ähnliche Aktivester

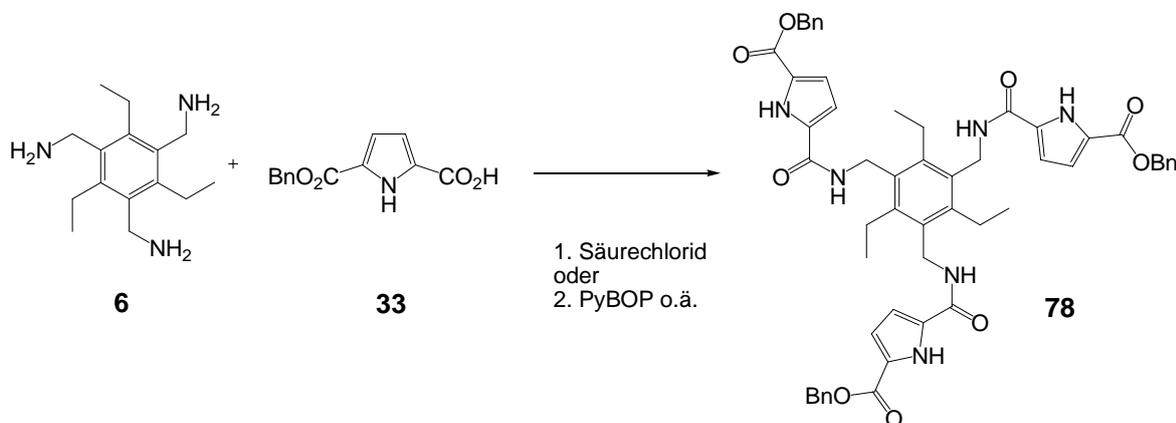


Abb. 4.14: Synthese des tris-Benzylesters **78**.

Zuerst wurde die Synthese über das Säurechlorid gewählt, da diese höhere Reaktivitäten aufweisen als die Aktivester von Kupplungsreagenzien wie PyBOP.^[96]

Dafür wurde die Pyrrolcarbonsäure **33** mit Oxalylchlorid in THF zum Säurechlorid **79** umgesetzt. Nach 3 h bei 40 °C war die Umsetzung laut DC-Kontrolle quantitativ erfolgt.

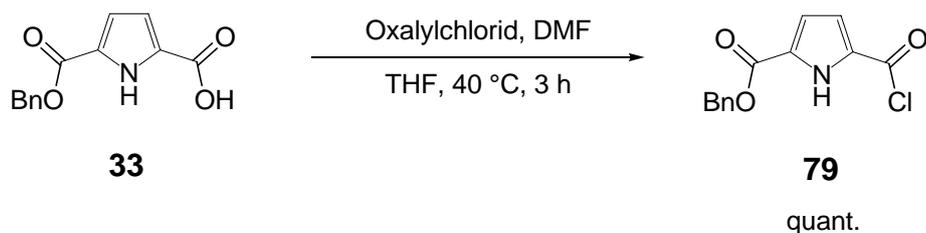


Abb. 4.15: Synthese des Säurechlorids **79**.

Die weitere Umsetzung des Säurechlorids mit dem Templat **6** erfolgte in THF und TEA (Abb. 4.16). So konnte das gewünschte Produkt **78** mit einer Ausbeute von 42 % erhalten werden. Ein Grund für die schlechte Ausbeute dieser Reaktion könnte die schlechte Löslichkeit des Triamins in THF sein. Deswegen wurde die Reaktion in DMF wiederholt, wodurch die Ausbeute auf 70 % erhöht werden konnte, was fast einer Verdopplung der Ausbeute entspricht.

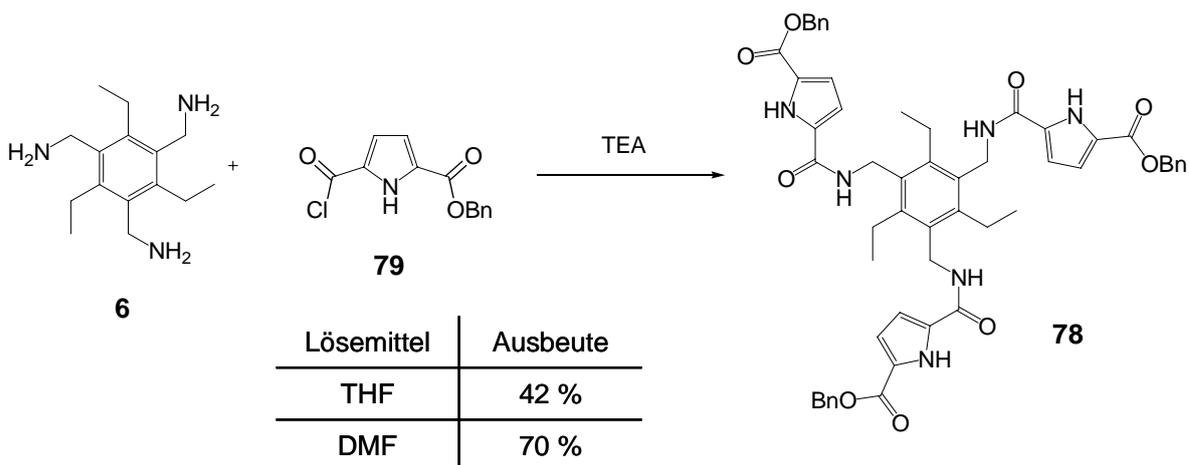


Abb. 4.16: Synthese des Benzylesters **78** über das Säurechlorid **79**.

Die Reaktion wurde dann noch einmal mit dem Kupplungsreagenz PyBOP durchgeführt, um zu testen, ob hiermit noch bessere Ausbeuten erreicht werden können. Ab diesem Zeitpunkt der Arbeit wurde statt des freien Triamins allerdings

das Ammonium-Salz von **6** verwendet, da dieses bei der Synthese über die Boc-Route erhalten wurde. Außerdem sollte das Ammonium-Salz über längere Zeit stabil sein, da Amine dazu neigen, mit CO₂ aus der Luft Carbamate zu bilden, die die Amine blockieren würden.

Die Reaktion wurde unter Standard-Kupplungsbedingungen, d.h. in DMF mit 5 % NMM als Base durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte allerdings kein Produkt, sondern nur die Edukte isoliert werden. Es wurden noch verschiedene andere Basen wie TEA oder DMAP getestet, von denen aber keine zum Erfolg führte.

Die Vermutung war nun, dass das Triamin **6** in der DMF-Lösung trotz Basenzugabe noch protoniert vorliegt. Auch die Löslichkeit könnte ein Problem sein, da sich das Triamin erst im Verlauf der Reaktion langsam löste. Um dies zu überprüfen, wurde das Triammonium-Salz des Templates **6** mit 3 äq. NaOH in einer Lösung aus DMF und Wasser (9/1) versetzt, anschließend die restlichen Reagenzien hinzugefügt und die Lösung über Nacht gerührt. Tatsächlich konnte das Produkt mit dieser Methode mit einer sehr guten Ausbeute von 82 % erhalten werden, was ungefähr einer Ausbeute von 94 % pro Kupplungsschritt entspricht.

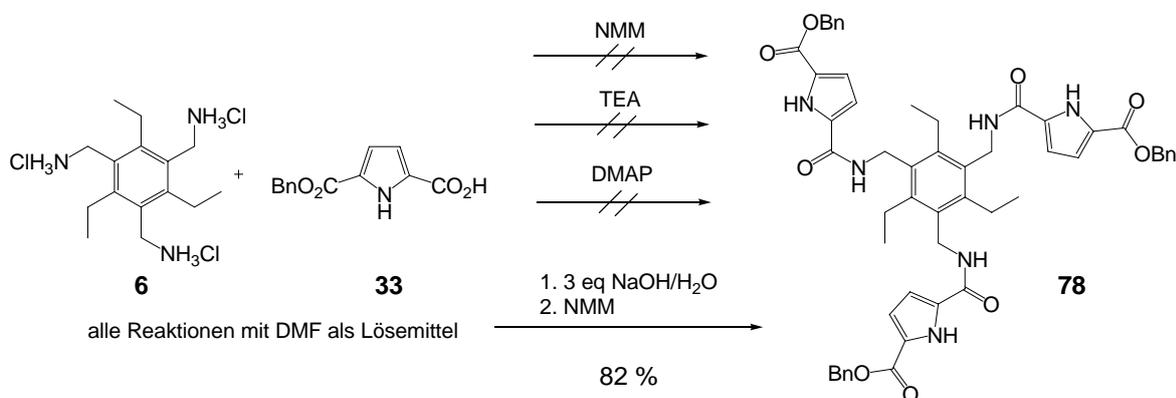


Abb. 4.17: Synthese des Benzylesters **78** mit dem Kupplungsreagenz PyBOP.

Im nächsten Schritt wurden dann die Benzylester von **78** durch eine Hydrogenolyse mit Pd/C in einer Mischung aus Methanol/ THF (1/1) quantitativ in die Tricarbonsäure **68** umgewandelt.

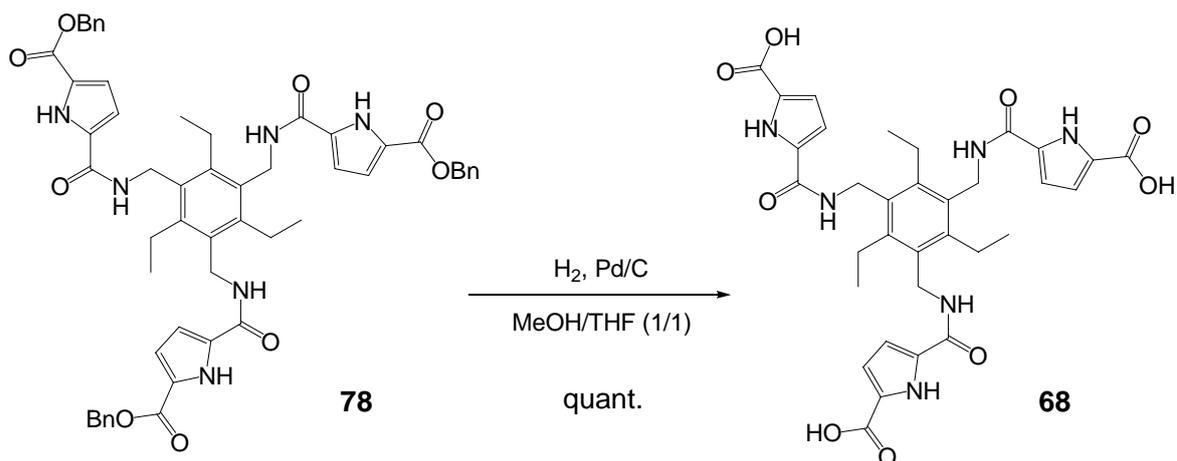


Abb. 4.18: Hydrogenolyse der Benzylester zur Tricarbonsäure **68**.

Der Guanidinbaustein **34** wurde nun wiederum unter Standard-Bedingungen mit PyBOP in DMF/NMM eingeführt. Nach Reinigung wurden die Boc-Schutzgruppen mit TFA in DCM entfernt, das entstandene TFA-Salz des Rezeptors mit HCl umgesalzen und man erhielt die Zielstruktur **8** mit einer Ausbeute von 73 % über beide Stufen. Das NMR-Spektrum des Rezeptors und die Zuordnung der Signale sind in Abb. 4.19 gezeigt.

So konnte der Rezeptor **8** über eine vierstufige Synthese nach Route 1 mit einer guten Gesamtausbeute von ca. 60 % hergestellt werden. Zur Überprüfung, ob mit Route 2 bessere Ausbeuten erreicht werden können, wurde diese Synthese als nächstes durchgeführt.

4 Durchführung und Diskussion

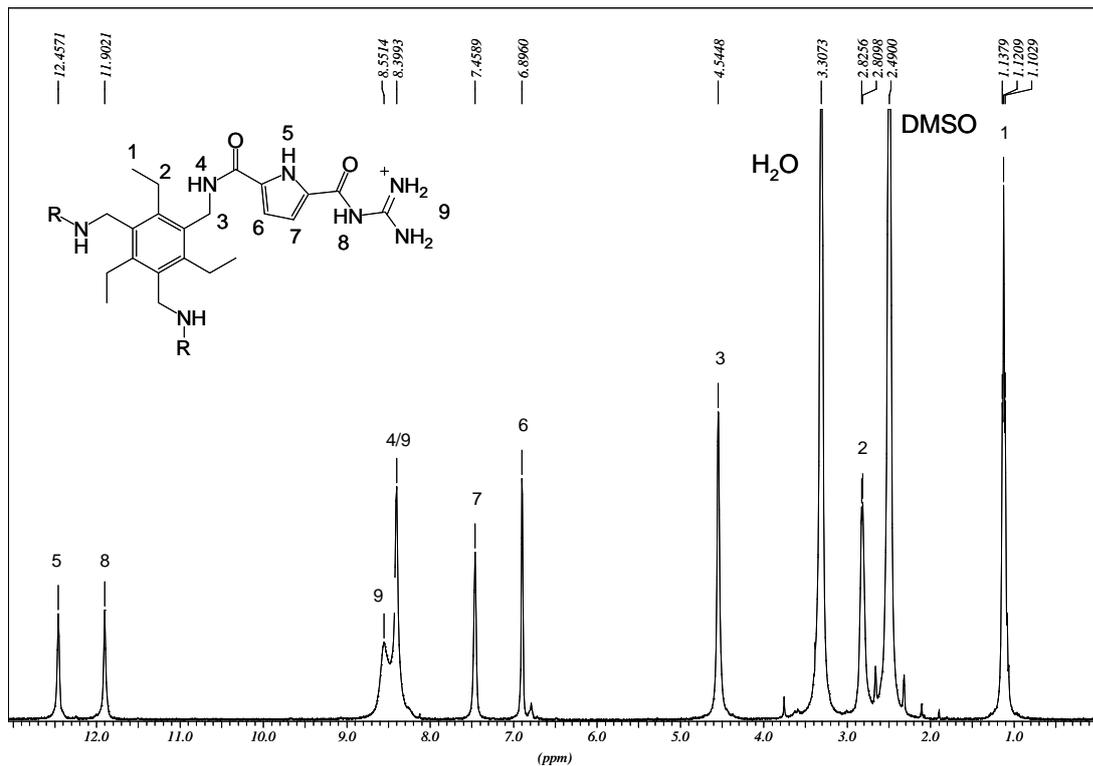
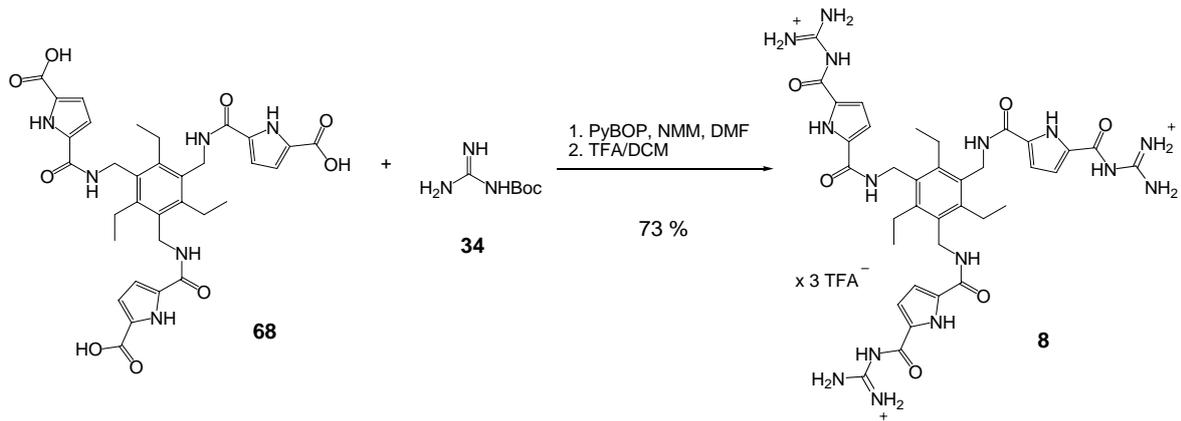


Abb. 4.19: Synthese der Zielstruktur **8** und NMR-Spektrum (DMSO) mit Zuordnung (mittels 2D-Experimenten).

Route 2:

Die Reaktion wurde wiederum unter Standardbedingungen mit PyBOP und NMM in DMF durchgeführt. Analog zur Reaktion des Templats **6** und der Pyrrolcarbonsäure **33** wurde das Triamin vor der Reaktion mit drei Äquivalenten NaOH deprotoniert, bevor die restlichen Reagenzien hinzugegeben wurden. Nach Reinigung, Entschützen der Boc-Schutzgruppen und Umsalzen mit HCl konnte der Rezeptor **8** mit einer Ausbeute von 65 % über 2 Stufen erhalten werden.

4 Durchführung und Diskussion

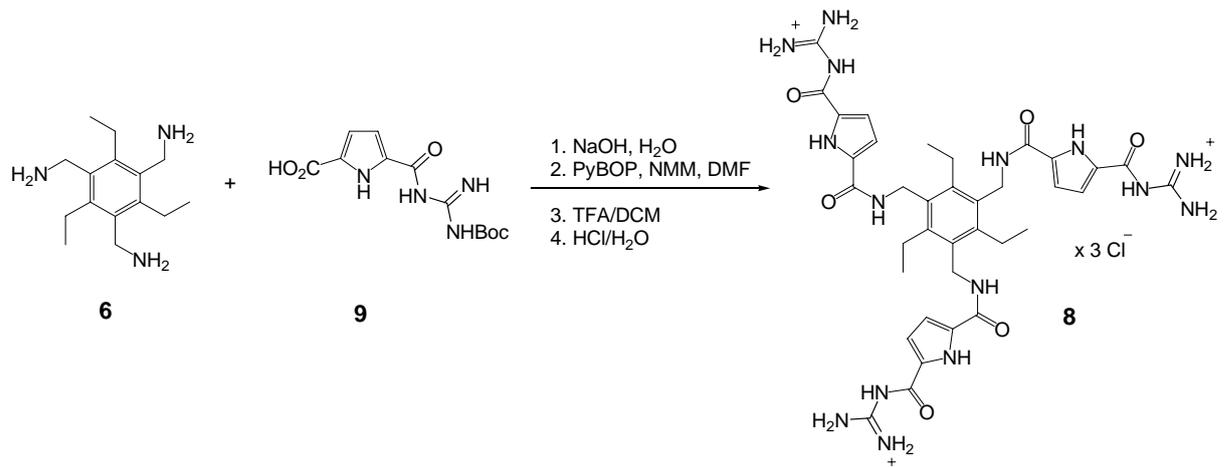


Abb. 4.20: Synthese des Rezeptors **8** nach Route 2.

Die Zielstruktur **8** konnte somit über zwei verschiedene Routen mit guten Ausbeuten hergestellt werden. Berücksichtigt man bei der zweiten Route die Synthese des Bausteins **9** aus den Edukten **33** und **34** (siehe Abb. 4.13), gelangt man zu einer Gesamtausbeute von 55 % über 4 Stufen. Somit liefert Route 1 mit 60 % über 4 Stufen eine bessere Ausbeute als die zweite Route.

Im nun folgenden Kapitel werden die ausführlichen physikalisch-organischen Untersuchungen an diesem System vorgestellt.

4.2 Bindungsstudien von Rezeptor 8 mit Citrat und anderen Polycarboxylaten

Nachdem der Rezeptor **8** erfolgreich hergestellt wurde, konnten die ersten Bindungsstudien durchgeführt werden. Wie schon in Kapitel 2 erwähnt, wurde der Rezeptor so entwickelt, dass er durch eine Kombination von ionischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen Polycarboxylate oder andere Oxo-Anionen binden sollte. Verschiedene biologisch relevante Anionen wie Citrat, Tartrat und Malat, sowie einige aromatische Polycarboxylate wurden auf ihre Bindungseigenschaften für Rezeptor **8** getestet. Dazu wurden unterschiedliche spektroskopische Methoden verwendet. Außerdem wurden Molecular Modeling Rechnungen durchgeführt, mit deren Hilfe die spektroskopischen Daten interpretiert werden. Die Ergebnisse dieser Studien an Rezeptor **8** werden in den nächsten Kapiteln vorgestellt.

4.2.1 Spektroskopische Untersuchungen

Citrat und andere Polycarboxylate wie Malat und Tartrat spielen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen. Ein Rezeptor, der selektiv Citrat erkennt, könnte also für diverse Zwecke eingesetzt werden. Zum Beispiel entwickelte *Anslyn* mit seinem Citrat-Rezeptor unter anderem ein Sensorsystem zu Erkennung von Citrat in Getränken oder auch von Malat und Tartrat in Weinen.^[59,60]

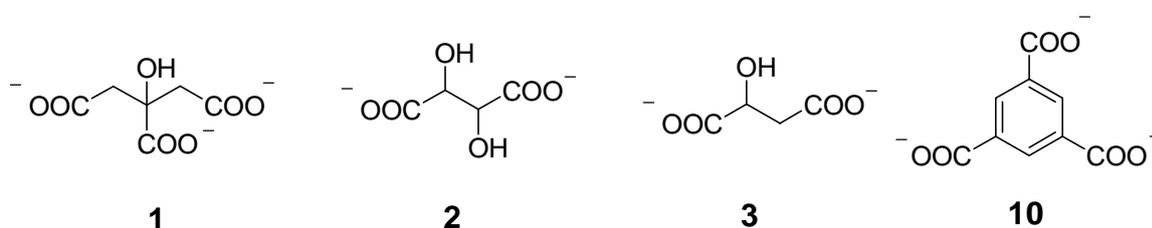


Abb. 4.21: Biologisch relevante Polycarboxylate 1-3 und das Modellsystem Trimesinsäure-tricarboxylat 10.

Zunächst wurden allerdings Bindungsstudien mit dem Modell-Substrat Trimesinsäure **10** durchgeführt, das selbst keine biologische Rolle spielt.

Allerdings zeigt die Trimesinsäure die gleiche C3 Symmetrie wie der Rezeptor, so dass dieses Substrat optimal geometrisch komplementär zum Rezeptor sein sollte und somit für erste Bindungsstudien gut geeignet sein sollte.

NMR-Spektroskopie:

Als erstes wurden ^1H -NMR-Bindungsstudien in 90 % DMSO/Wasser durchgeführt, um zu schauen, ob in diesem sehr polaren Gemisch Wechselwirkungen zu beobachten sind. Bei der Zugabe von Trimesinsäuretricarboxylat zum Rezeptor (1 mM, Chlorid-Salz) konnten starke durch Komplexierung induzierte Änderungen in der Verschiebung des Amid-NHs 4 und der Pyrrol-CHs 6 und 7 beobachtet werden, was auf eine sehr starke, intermolekulare Wechselwirkung zwischen **8** und **10** hindeutet. Wenn man nun die anderen Signale des Rezeptors beobachtet, sieht man, dass diese keine Verschiebungen aufweisen. Diese lässt darauf schließen, dass die Alkyl-Gruppen des Templats keine Wechselwirkungen mit dem Substrat ausbilden. Dieses würde auch noch einmal die angenommene räumliche Struktur des Rezeptors bestätigen, bei der die Alkyl-Gruppen, genauso wie die Rezeptorarme, jeweils alle auf einer Seite des Templats fixiert sind.

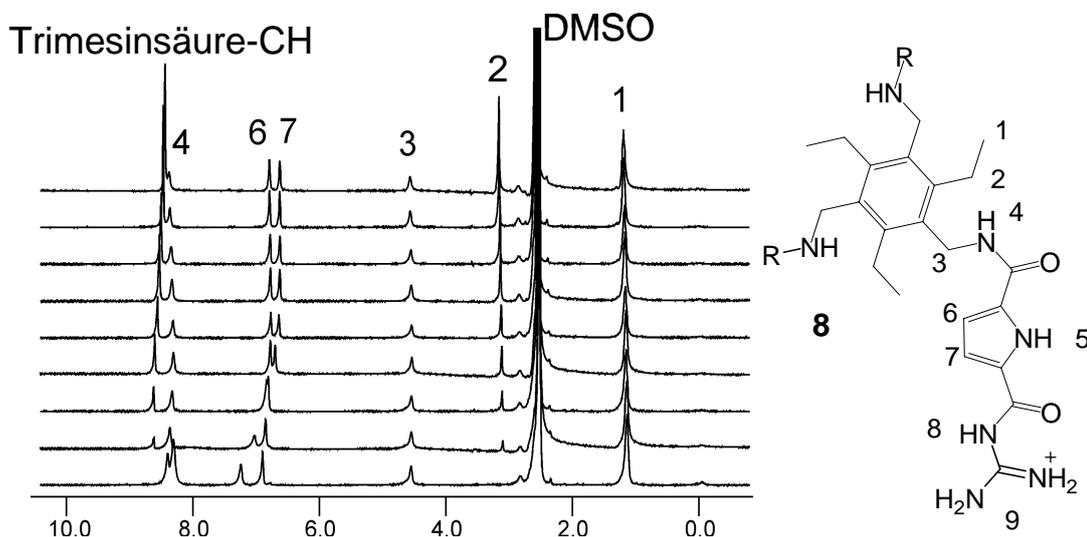


Abb. 4.22: NMR-Verschiebungen für die Titration von **8** mit **10** in 90 % DMSO/Wasser mit Zuordnung der Signale.

Eine quantitative Analyse der durch die Komplexierung induzierten Veränderungen der chemischen Verschiebungen des Protons 7 zeigt eine lineare Abnahme bis zu einer Stöchiometrie von 1:1, was einen 1:1 Komplex bestätigt.

Zum Beispiel ändern sich die chemischen Verschiebungen des Pyrrol-CHs 7 von $\delta = 7.24$ nach 6.60 und des Pyrrol-CHs 6 von $\delta = 6.90$ nach 6.73. Im Gegensatz dazu zeigt das Amid NH 4 eine Hochfeldverschiebung von $\delta = 8.41$ nach 8.29 bis zu einem Äquivalent Zugabe an Trimesinsäure worauf eine geringe Tieffeldverschiebung folgt, die auf Komplexe mit einer Stöchiometrie größer als 1:1 schließen lässt. Die linearen Anteile der Bindungsisotherme (siehe Abb. 4.23; gepunktete Linien) deuten aber auch auf eine sehr hohe Bindungskonstante unter diesen Bedingungen hin (90 % DMSO/Wasser; 1 mM Rezeptor). Die Komplexierung ist so stark, dass sie mit NMR-Methoden nicht mehr bestimmt werden kann (siehe Kapitel 3.4.1). Deshalb konnte die Bindungskonstante auch nur auf $K_{\text{Ass}} > 10^5 \text{ M}^{-1}$ abgeschätzt werden.

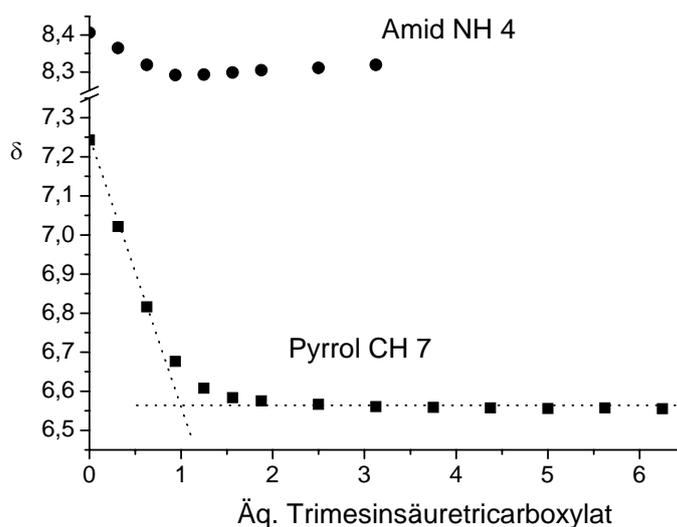


Abb. 4.23: Bindungsisotherme der Titration von **8** (1 mM) mit **10** (10 mM) in 90 % DMSO/Wasser.

Aus diesem Grund wurde die Titration noch einmal mit einem höheren Wassergehalt durchgeführt. Unglücklicherweise fiel bei millimolaren Konzentrationen, die für NMR-Titrationsen notwendig sind, bei höherem Wassergehalt (40 % Wasser in DMSO) während der Titration der Komplex von **8** und **10** aus. Bis zu diesem Zeitpunkt sah der Verlauf der durch die Komplexierung hervorgerufenen Verschiebungen wiederum sehr linear aus, was auf eine hohe Bindungskonstante hindeutet. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte allerdings keine genaue Bindungskonstante mit NMR-Methoden bei höherem Wassergehalt bestimmt werden.

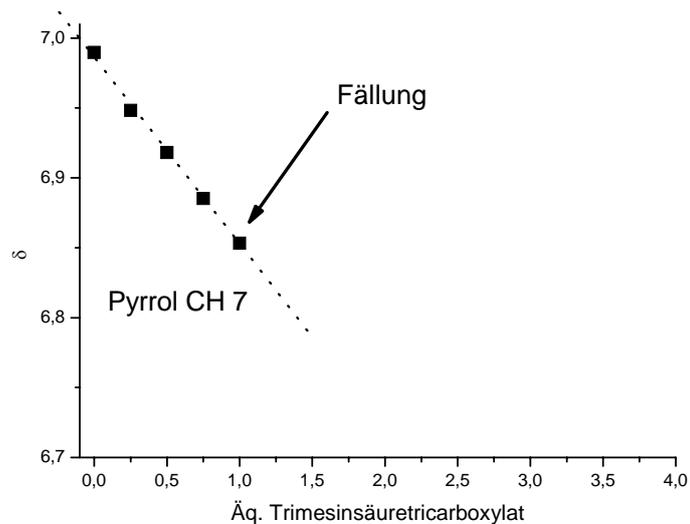


Abb. 4.24: Bindungsisotherme der Titration von **8** (1 mM) mit **10** (10 mM) in 60 % DMSO/Wasser.

Da mit NMR-Methoden keine genauen Bindungskonstanten bestimmt, sondern nur auf größer als $K_{\text{Ass}} > 10^5 \text{ M}^{-1}$ abgeschätzt werden konnten, wurde nun nach anderen Methoden gesucht, bei denen die Bestimmung von Bindungskonstanten in höheren Wasseranteilen möglich ist. Hier bieten sich, wie schon in Kapitel 3 erwähnt, die UV- und Fluoreszenzspektroskopie an, bei der nur Konzentrationen von ca. 10^{-5} M benötigt werden.

UV- und Fluoreszenzspektroskopie

In diesem Konzentrationsbereich (10^{-5} M) war der Rezeptor in reinem Wasser löslich, das dann auch als Lösemittel gewählt wurde. Der Rezeptor wurde dazu auf pH 6.3 eingestellt, da in diesem pH Bereich später auch die Bindungstitrationen durchgeführt wurden. Dieser pH-Wert wurde als Kompromiss gewählt, da bei höheren pH-Werten der Rezeptor wahrscheinlich größtenteils als Mono- bzw. Dikation vorliegt (siehe pH Profil von **8** in Abschnitt 4.3.2), und bei niedrigeren pH-Werten die Tricarbonsäuren protoniert werden. Bei pH 6.3 sollten also sowohl der Rezeptor als auch die Tricarbonsäuren mindestens als doppelt geladene Spezies vorliegen.

Um eine mögliche Selbstassoziation des Rezeptors auszuschließen, wurde als erstes eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Dazu wurde eine wässrige Lösung,

ebenfalls mit HCl auf pH 6.3 eingestellt, zum Rezeptor **8** titriert und die Änderung der Absorption aufgenommen.

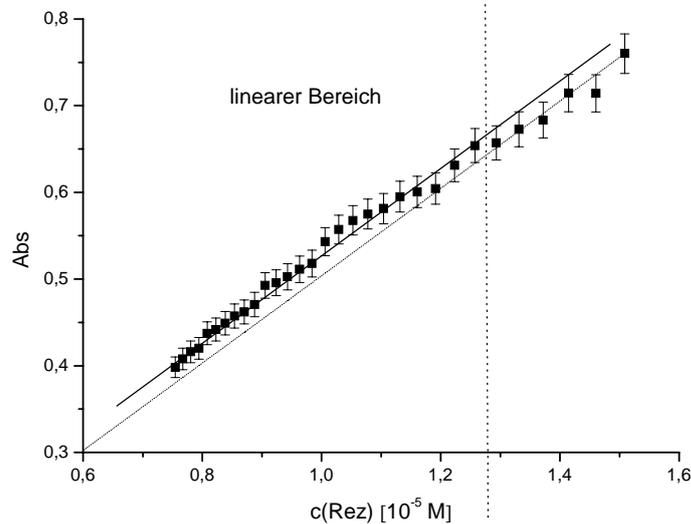


Abb. 4.25: Verdünnungsreihe ($\lambda = 300 \text{ nm}$) des Rezeptors **8** in reinem Wasser ($\text{pH} = 6.3$). Dargestellt sind die berechnete Verdünnung bezogen auf den Startwert (gepunktet) und eine graphische Anpassung (Linie) an die experimentellen Datenpunkte (■).

Die Ergebnisse sind in Abb. 4.26 dargestellt. Man sieht, dass der Rezeptor nicht im ganzen dargestellten Konzentrationsbereich dem Lambert-Beer-Gesetz folgt, d.h. keinen linearen Verlauf zeigt. Die berechnete Verdünnung des Rezeptors ausgehend vom Startwert wird durch eine gepunktete Linie dargestellt, während eine graphische Anpassung mit einer schwarzen Linie angegeben ist. Hiernach zeigt der Rezeptor einen linearen Verlauf bei Konzentrationen kleiner als $1.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Ursache für den nichtlinearen Verlauf der Verdünnungsreihe bei höheren Konzentrationen könnte eine mögliche Selbstassoziation des Rezeptors sein. Wahrscheinlicher ist aber, dass geringe pH-Schwankungen oder kleine Änderungen in der Zusammensetzung der Lösung durch die Zugabe von Wasser die Absorption des Rezeptors bei den ersten Zugaben beeinflussen. Ausschlaggebend hierfür könnte z.B. eine Änderung des Protonierungsgrades des Rezeptors sein, der die Absorption der Lösung ändern könnte.

Da es sich hierbei aber nur um Vermutungen handelt, wurden die ersten Bindungsstudien in reinem Wasser bei pH 6.3 und einer Rezeptorkonzentration von $1.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ durchgeführt, um auf jeden Fall eine mögliche Selbstassoziation des Rezeptors ausschließen zu können.

4 Durchführung und Diskussion

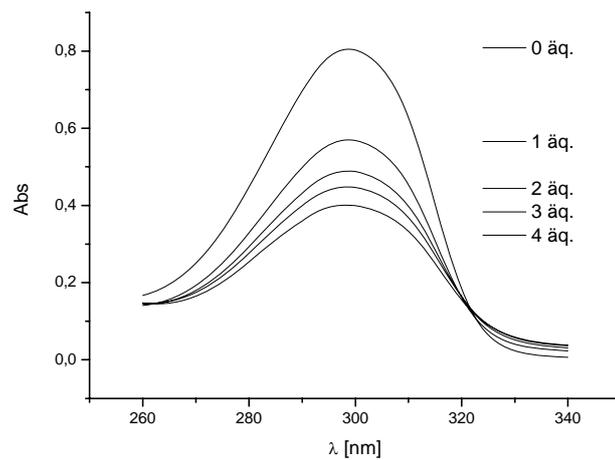


Abb. 4.26: UV-Titration des Rezeptors **8** ($1.2 \cdot 10^{-5}$ M) mit Trimesinsäuretricarboxylat **10** ($2 \cdot 10^{-4}$ M) in Wasser ($\text{pH} = 6.3$).

Zunächst wurde wiederum das Modellsystem Trimesinsäuretricarboxylat auf seine Bindungseigenschaften überprüft. Hierzu wurden Äquivalente einer Trimesinsäurelösung ($2 \cdot 10^{-4}$ M) zur Rezeptorlösung ($1.2 \cdot 10^{-5}$ M) gegeben. Die Komplexbildung wurde durch die Abnahme der UV-Absorption des Pyrrolbausteins bei $\lambda = 300$ nm beobachtet. Die Bindungsisotherme ist in Abb. 4.27 dargestellt. Die Daten wurden nach einem 1:1 Modell mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse ausgewertet.

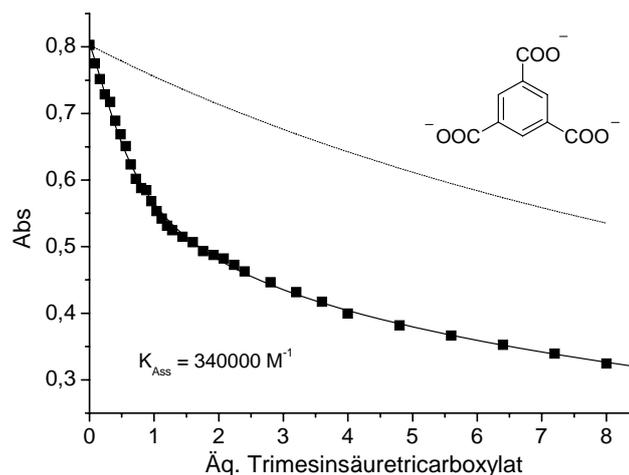


Abb. 4.27: Bindungsisotherme des Rezeptors **8** ($1.2 \cdot 10^{-5}$ M) bei $\lambda = 300$ nm aus der Titration mit Trimesinsäuretricarboxylat **10** ($2 \cdot 10^{-4}$ M) in Wasser ($\text{pH} = 6.3$). Die schwarze Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung an die experimentellen Daten (■), während die gepunktete Linie die erwartete Änderung der Absorption durch die Verdünnung des Rezeptors bei der Titration beschreibt.

Die 1:1 Stöchiometrie konnte sowohl über die Methode der kontinuierlichen Veränderungen, am Knick in der Kurve der Bindungsisotherme (siehe Abb. 4.28; dort ist die reine Änderung nach Abziehen der reinen Verdünnung durch die Komplexierung aufgetragen) zu erkennen, als auch über einen Job Plot (Abb. 4.28) bestätigt werden.^[84,97] Der stark lineare Verlauf der reinen Änderung der Komplexierung (Abb. 4.28) ließ - wie schon bei den NMR-Titrations - auf eine sehr starke Bindungskonstante schließen. In der Tat konnte für die Komplexierung der Trimesinsäure durch den Rezeptor **8** bei pH 6.3 in reinem Wasser eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 3.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ bestimmt werden. Dies macht **8** zu einem der besten Polycarboxylat-Rezeptoren in Wasser. Höhere Bindungskonstanten konnten bisher nur durch Rezeptoren erreicht werden, die auf Wechselwirkungen mit Metall-Zentren beruhen (siehe Kapitel 3.2).

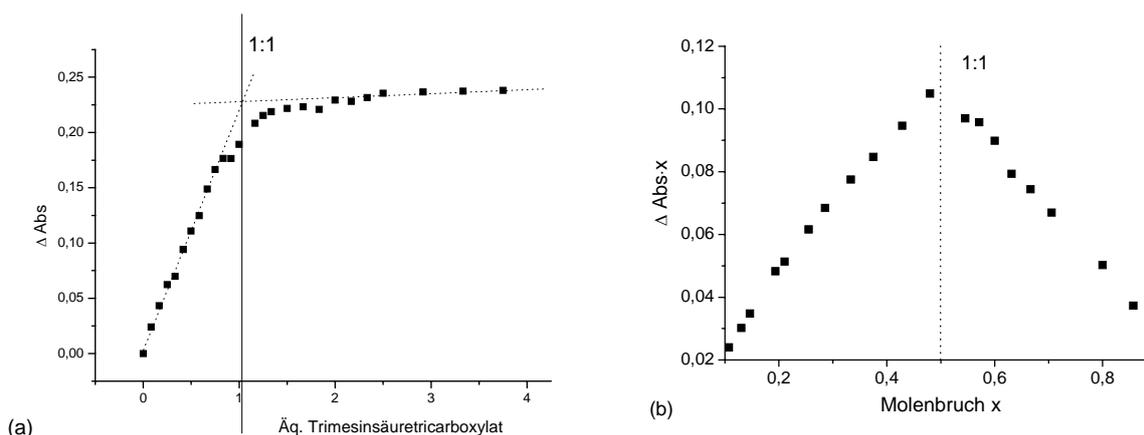


Abb. 4.28: (a) Änderung der Absorption ($\lambda = 300 \text{ nm}$) von **8** durch die Komplexierung von **10** nach Abziehen der Verdünnung. Bestimmung einer 1:1 Stöchiometrie über die Methode der kontinuierlichen Veränderungen (blaue Linien); (b) Job Plot berechnet aus der UV-Titration zeigt eine klare 1:1 Stöchiometrie.

Diese sehr hohe Bindungskonstante konnte unabhängig noch einmal über Fluoreszenzspektroskopie bestätigt werden. Die Komplexierung wurde durch die Abnahme der Fluoreszenz des Pyrrolbausteins bei $\lambda = 335 \text{ nm}$ beobachtet (ein Beispiel für die Auswertung einer Fluoreszenz-Titration wird später anhand eines anderen Substrats beschrieben). Die 1:1 Stöchiometrie wurde wiederum durch einen Job Plot bestätigt. Die Auswertung mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse lieferte eine Bindungskonstante von $K_{\text{ass}} = 4.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, die sehr gut mit dem Ergebnis der UV-Titration übereinstimmt.

Als nächstes sollte nun das biologisch relevante Polycarboxylat Citrat **1** auf seine Bindungseigenschaften überprüft werden. Citronensäure ist flexibler und nicht C3 symmetrisch wie die Trimesinsäure. Außerdem hat sie keinen Benzol-Ring und hat deswegen keine Möglichkeit π -stacking-Wechselwirkungen zum Rezeptor auszubilden. Trotzdem wurde mittels UV-Titrationen eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 1.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ bestimmt, die nicht viel schlechter ist als die der Trimesinsäure. Diese gute Bindungskonstante konnte mit einer Fluoreszenz-Titration anhand der Abnahme der Pyrrol-Bande bei $\lambda = 335 \text{ nm}$ (siehe Abb. 4.29) mit einer Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 2.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ bestätigt werden (siehe Abb. 4.30). Die 1:1 Stöchiometrie wurde durch einen Job Plot gesichert (siehe Abb. 4.30).

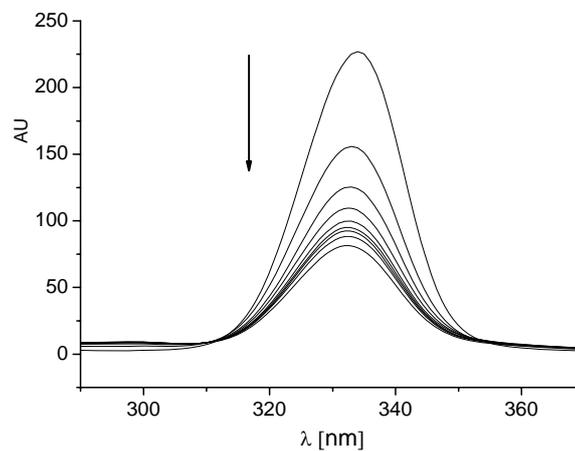


Abb. 4.29: Fluoreszenz-Titration von Rezeptor **8** ($1.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) mit Citrat **1** ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) in Wasser ($\text{pH} = 6.3$). Jede Kurve repräsentiert die Zugabe von einem Äquivalent Citrat.

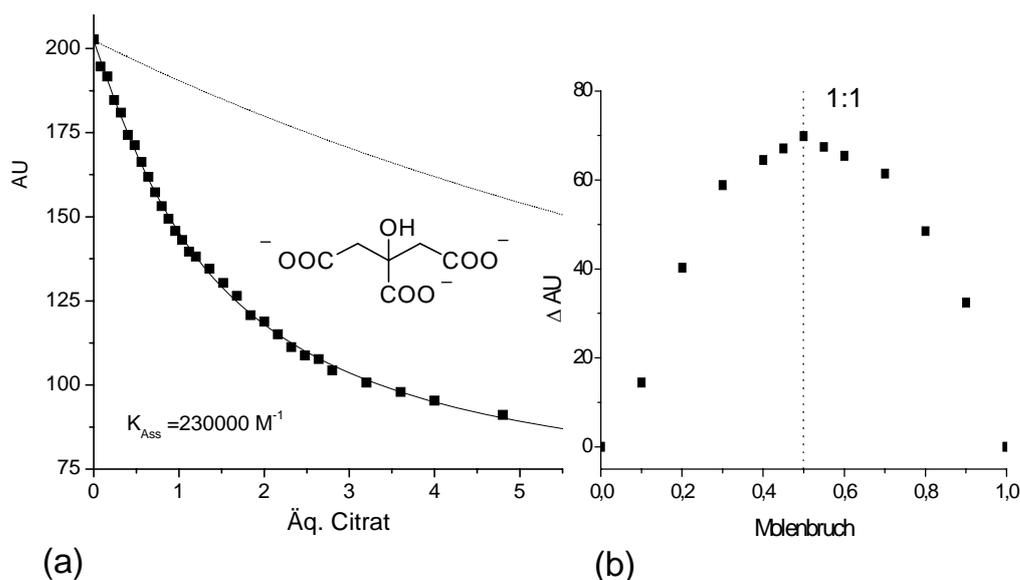


Abb. 4.30: (a) Bindungsisotherme des Rezeptors **8** ($1.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) bei $\lambda = 335 \text{ nm}$ aus der Fluoreszenz Titration mit Citrat **1** ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) in Wasser ($\text{pH} = 6.3$). Die schwarze Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung an die experimentellen Daten (■) und die gepunktete Linie die erwartete Änderung der Absorption durch die Verdünnung des Rezeptors bei der Titration. (b) Job Plot der Komplexbildung des Rezeptors **8** mit Citrat **1** in reinem Wasser erhalten durch die Änderungen des Fluoreszenz des Rezeptors bei $\lambda = 335 \text{ nm}$ (■).

Das macht **8** zu dem bisher stärksten Citrat-Sensor in Wasser, wenn der Rezeptor auf Metallbasis nach *Fabbrizzi*, der mit $K_{\text{Ass}} = 3.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ nur eine geringfügig bessere Bindungskonstante zeigt, vernachlässigt wird. Mit einer Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} > 10^5 \text{ M}^{-1}$ in Wasser bindet er um zwei Größenordnungen besser als *Anslyn's* Citrat-Rezeptor mit $K_{\text{Ass}} = 7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.^[26] Da sich der Rezeptor **7** nach *Anslyn* und Rezeptor **8** nur in den Bindungsarmen unterscheiden, scheint der Austausch von normalen Guanidinen durch das Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv zu einer großen Erhöhung der Bindungskonstante zu führen. Zur Überprüfung der Selektivität des Rezeptors und welchen Einfluss Hydroxy-Gruppen im Substrat oder mögliche unpolare Wechselwirkungen zwischen aromatischen Polycarboxylaten und dem Aromaten des Rezeptors haben, sollten nun noch verschiedene Dicarboxylate (siehe Abb. 4.31) auf ihre Bindungseigenschaften für Rezeptor **8** überprüft werden.

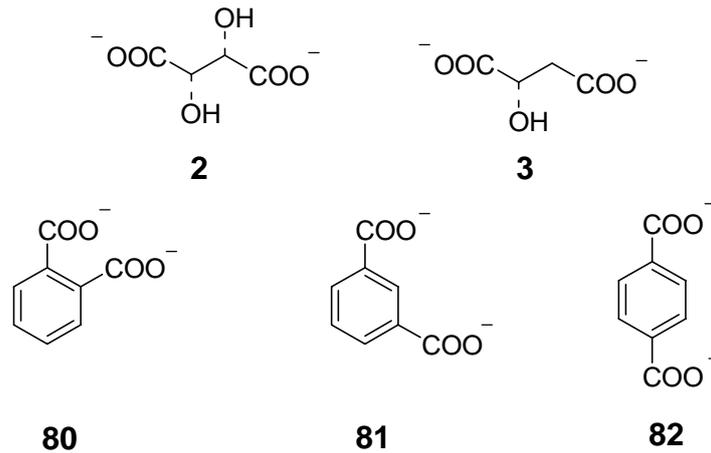


Abb. 4.31: Verschiedene biologisch relevante Dicarboxylate **2** und **3** und aromatische Dicarboxylate **80-82**.

Analog zu den Titrations mit den Tricarbonsäuren wurden Lösungen der Dicarbonsäuren ($2 \cdot 10^{-4}$ M) in reinem Wasser bei pH 6.3 zum Rezeptor ($1.2 \cdot 10^{-5}$ M) gegeben. Allerdings traten bei den Titrations der Dicarboxylate Probleme bei der Auswertung auf. Die beiden ersten Datenpunkte der Bindungsisotherme zeigten im Vergleich zum weiteren Verlauf der Titration zu große Änderungen (siehe Abb. 4.32) und passten nicht zu dem Modell einer 1:1 Stöchiometrie (nach Auswertung der Daten), obwohl der Job Plot diese Stöchiometrie bestätigte. Mögliche Ursachen für diese Ergebnisse könnten geringe Unterschiede in der Zusammensetzung der Rezeptor- und Substratlösungen sein. Ausschlaggebend könnten z.B. verschiedene Chlorid-Konzentrationen sein, da beide Lösungen mit verschiedenen Mengen an Salzsäure auf den gewünschten pH-Wert eingestellt wurden. Auch geringe pH-Unterschiede der beiden Lösungen könnten einen Grund für diese Abweichungen liefern. Nähere Untersuchungen zu diesem Phänomen werden etwas später noch ausführlicher diskutiert. Aufgrund dieser Vermutungen für die Abweichungen der Startwerte wurden die ersten beiden Punkte der Titrations bei der Auswertung nicht berücksichtigt (siehe Abb. 4.32). Dies sollte auch keinen großen Einfluss auf die Höhe der Bindungskonstante haben, da die ersten Punkte einer Bindungsisotherme für die Bestimmung der Bindungskonstante nicht ausschlaggebend sind, sondern die Stärke der Assoziation durch die Krümmung der Bindungskurve bestimmt wird. Die Ergebnisse der Titrations sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

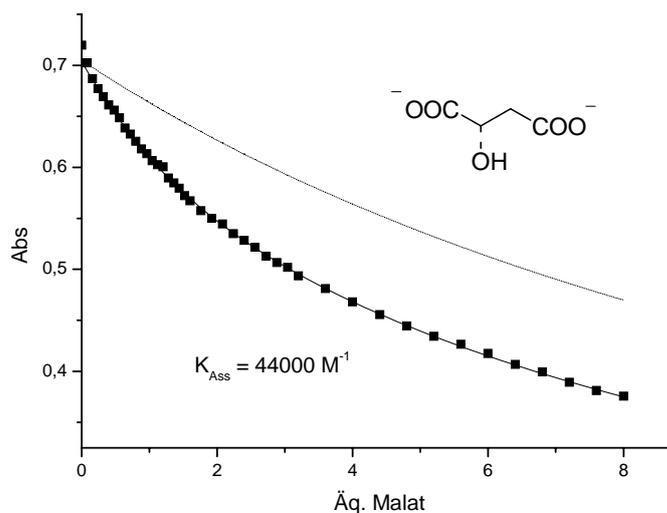


Abb. 4.32: Bindungsisotherme des Rezeptors **8** ($1.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) bei $\lambda = 300 \text{ nm}$ von der UV Titration mit Malat **3** ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) in Wasser ($\text{pH} = 6.3$). Die schwarze Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung an die experimentellen Daten (\blacksquare), während die gepunktete Linie die erwartete Änderung der Absorption durch die Verdünnung des Rezeptors bei der Titration beschreibt.

Tabelle 4.1: Bindungskonstanten verschiedener Polycarboxylate ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}^1$) mit Rezeptor **8** ($1.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}^1$) ermittelt durch die Änderungen der UV Absorption des Rezeptors bei $\lambda = 300 \text{ nm}$ in Wasser.

| Substrat | $K_{\text{Ass}} [\text{M}^{-1}]$ |
|---------------------------------|----------------------------------|
| Trimesinsäure 10 | 340000 |
| <i>i</i> -Phthalsäure 81 | 110000 |
| Terephthalsäure 82 | 88000 |
| Phthalsäure 80 | 67000 |
| Citrat 1 | 160000 |
| Tartrat 2 | 54000 |
| Malat 3 | 44000 |

Wenn man nun die Ergebnisse der Tri- mit den Dicarboxylaten vergleicht, sieht man sofort, dass die Tricarboxylate mindestens um den Faktor 3 höhere Assoziationskonstanten zeigen. So bindet der Rezeptor **8** z.B. das Trimesinsäure-tricarboxylat **10** um den Faktor 5 besser als das Phthalat **80**. Außerdem zeigen die aromatischen Polycarboxylate ungefähr doppelt so hohe Bindungskonstanten wie die aliphatischen Hydroxy-Polycarboxylate, was noch einmal die hydrophoben Wechselwirkungen bestätigt, die schon als mögliche Ursache für die hohen

Bindungskonstanten postuliert wurden. Dass die Hydroxy-Gruppen ebenfalls an der Komplexbildung beteiligt sind, sieht man am Beispiel des Tartrats **2** und Malats **3**. Diese beiden Moleküle unterscheiden sich nur in einer Hydroxyfunktion. Trotzdem wird das Tartrat mit $K_{\text{ASS}} = 54000 \text{ M}^{-1}$ etwas stärker gebunden als Malat mit nur $K_{\text{ASS}} = 44000 \text{ M}^{-1}$. Dass Hydroxy-Gruppen von α -Hydroxycarboxylaten teilweise sogar stärker von Guanidinium-Rezeptoren gebunden werden können als Carboxylate, wurde auch von *Anslyn* bei seinen Rezeptoren beobachtet.^[60] Interessant sind auch noch die unterschiedlichen Bindungskonstanten bei den verschiedenen aromatischen Dicarboxylaten **80-82**, die sich nur in der Substituierung am Aromaten unterscheiden. Die Ergebnisse diese Bindungsstudien werden später noch einmal ausführlich anhand von Molecular Modeling Rechnungen und weiteren Bindungstitrationen diskutiert (siehe Kapitel 4.2.2).

Zunächst sollte aber geklärt werden, warum nun die ersten beiden Zugaben bei der Titration mit den Dicarboxylaten (s.o.) zu große Änderungen im Vergleich zum weiteren Verlauf der Bindungsisotherme zeigten. Wie schon erwähnt könnten hierfür folgende Gründe ausschlaggebend sein:

1. geringe pH-Unterschiede der Rezeptor- und Substratlösungen
2. Unterschiede in den Chlorid-Konzentrationen in den beiden Lösungen

Deswegen wurde zunächst die pH-abhängige Änderung der Pyrrol-Bande bei $\lambda = 300 \text{ nm}$ aufgenommen (siehe Abb. 4.33).

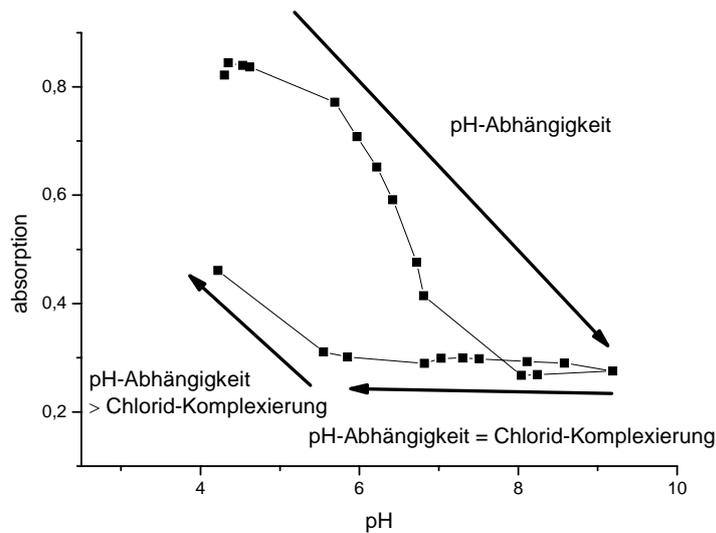


Abb. 4.33: pH abhängige Änderung der UV Absorption des Rezeptors **8** ($1.2 \cdot 10^{-5} M$) bei $\lambda = 300 nm$ in Wasser durch Zugabe von NaOH oder HCl (beide 0.1 N). Die Pfeile beschreiben die vermutlichen Gründe für die Änderung der UV-Absorption des Rezeptors.

Man sieht deutlich, dass der Rezeptor im sauren Medium eine höhere Absorption (hervorgerufen durch die Deprotonierung der Guanidine) zeigt und somit anscheinend eine stark pH-abhängige Absorption aufweist. Auch im pH-Bereich (pH = 6.3) der bisher durchgeführten Bindungsstudien in reinem Wasser kann es zu starken Veränderungen bei der Absorption hervorgerufen durch pH-Schwankungen kommen. Unerwartet ist allerdings, dass die Absorption bei Zugabe von HCl nicht mehr den Startwert bei pH 4 erreicht. Diese deutet daraufhin, dass hier nicht nur eine pH-Abhängigkeit besteht, sondern dass vielleicht die Änderung der Chlorid Konzentration zusätzlich zur pH-Abhängigkeit einen Anteil an der Änderung der Absorption des Rezeptors hat. So könnte die durch die Komplexbildung von Chlorid hervorgerufene Abnahme der Absorption das nicht erneute Ansteigen der Absorption beim Ansäuern erklären.

Um diese Theorie zu bestätigen, wurde dieser Versuch noch einmal durchgeführt, wobei diesmal mit der Zugabe der Salzsäure begonnen wurde.

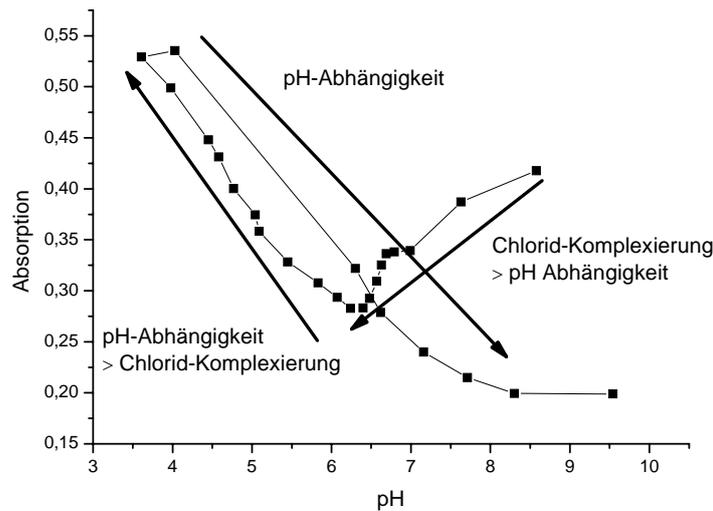


Abb. 4.34: pH abhängige Änderung der UV Absorption des Rezeptors **8** ($1.2 \cdot 10^{-5}$ M) bei $\lambda = 300$ nm in Wasser durch Zugabe von NaOH oder HCl (beide 0.1 N). Die Pfeile beschreiben die vermutlichen Gründe für die Änderung der UV-Absorption des Rezeptors.

In der Tat sieht man zuerst bei Zugabe von HCl eine Abnahme der Absorption. Bei einer reinen pH-Abhängigkeit hätte die Absorption ansteigen müssen. Nach Sättigung mit Chlorid kommt es dann auch ab einem pH-Wert von ca. 6 zu einer Zunahme, wie für die pH-abhängige Änderung erwartet wurde. Bei Zugabe von NaOH erkennt man dann wieder eine pH-abhängige Abnahme der Absorption.

Diese beiden Versuche bestätigen also, dass der Rezeptor sowohl eine stark pH-abhängige Absorption aufweist, als auch sensibel auf die Chlorid-Konzentration reagiert. Zur Bestätigung der Chlorid-Abhängigkeit wurde noch eine Titration mit Natriumchlorid bei pH = 6.3 durchgeführt. Hier konnte eine Abnahme der Absorption hervorgerufen durch die Chlorid-Komplexierung beobachtet werden. Eine Bindungskonstante konnte allerdings nicht bestimmt werden, da der Rezeptor ja bereits als Chlorid-Salz vorliegt und deswegen nicht die genaue Konzentration an Chlorid berechnet werden konnte, die für die Bestimmung einer Bindungskonstante benötigt wird.

Um sicher zu sein, dass keiner dieser beiden Faktoren die Bindungskonstanten der Polycarboxylate entscheidend beeinflusst hat, wurden nun noch weitere UV-Titrations durchgeführt. Hierzu wurden folgenden Bedingungen geändert:

1. Es wurde eine konstante Chlorid Konzentration (10^{-2} M) vorgelegt, so dass die HCl-Zugabe beim pH-Wert einstellen keinen nennenswerten Einfluss haben sollte.
2. Die wässrigen Lösungen wurde mit Bis-Tris-Puffer (2 mM) auf den gewünschten pH-Wert eingestellt, so dass der pH-Wert während der Titration konstant bleiben sollte.

Trotz dieser sehr hohen Konzentration an NaCl und Puffer wird Citrat **1** noch mit einer Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 8.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ gebunden. Die Bindungskonstante ist also nur um den Faktor 2 kleiner als bei der Titration in reinem Wasser. Die geringeren Bindungskonstanten der verschiedenen Polycarboxylate, die alle mindestens um den Faktor 2 schlechter binden als in reinem Wasser (siehe Tabelle 4.1 und 4.2.), können durch die höhere Ionenstärke (Puffer und NaCl) der Lösung erklärt werden, da polare Wechselwirkungen mit Erhöhung der Ionenstärke abnehmen.

Somit konnten die Messungen in reinem Wasser sehr gut in gepufferten Lösungen reproduziert werden. So scheinen zwar unterschiedliche Konzentrationen an Chlorid oder pH-Schwankungen einen Einfluss auf die Absorption des Rezeptors zu haben, die Größe der Bindungskonstanten aber nicht groß zu beeinflussen. Außerdem sollten pH-Schwankungen aufgrund des Puffers gar nicht erst auftreten können. Deswegen wurden unter diesen Bedingungen weitere Bindungsstudien durchgeführt. Ein Beispiel für eine Titration unter diesen Bedingungen ist in Abb. 4.35 für die Kemp'sche Trisäure **83** gezeigt. Die Bindungsisothermen wurden mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse nach einem 1:1 Modell ausgewertet. Zu Bestätigung der Stöchiometrie wurde aus den Titrationsdaten ein Job Plot berechnet, der eine klare 1:1 Stöchiometrie bestätigte.

4 Durchführung und Diskussion

Tabelle 4.2: Bindungskonstanten verschiedener Polycarboxylate ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}^1$) mit Rezeptor **8** ($1.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}^1$) ermittelt durch die Änderungen der UV Absorption des Rezeptors bei $\lambda = 300 \text{ nm}$ in Wasser mit Bis-Tris-Puffer (2 mM) und NaCl (10 mM).

| Substrat | $K_{\text{Ass}} [\text{M}^{-1}]$ |
|---------------------------------|----------------------------------|
| Trimesinsäure 10 | 150000 |
| <i>i</i> -Phthalsäure 81 | 36000 |
| Terephthalsäure 82 | 31000 |
| Phthalsäure 80 | 21000 |
| Kemp'sche Trisäure 83 | 51000 |
| Citrat 1 | 86000 |
| Tartrat 2 | 7000 |
| Malat 3 | 11000 |

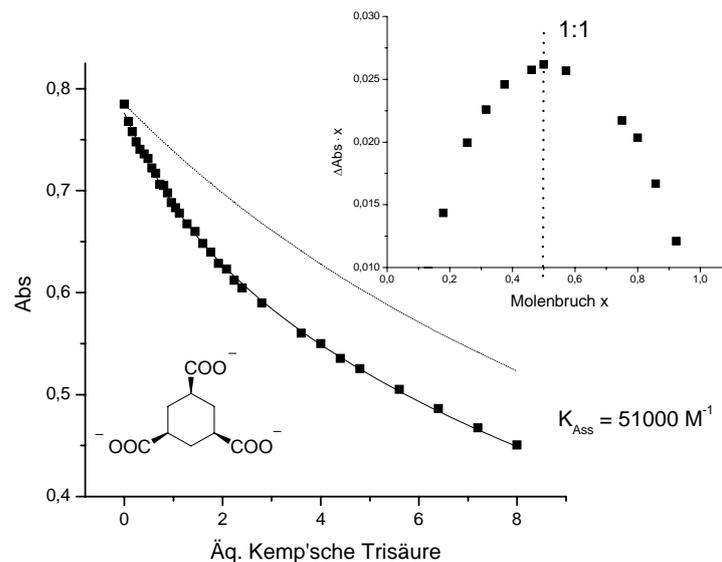


Abb. 4.35: Bindungsisotherme des Rezeptors **8** ($1.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) bei $\lambda = 300 \text{ nm}$ von der UV Titration mit der Kemp'schen Trisäure **83** ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) in Wasser (2 mM Bis-tris-Puffer, pH = 6.3, 10 mM NaCl). Die schwarze Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung an die experimentellen Daten (■), während die gepunktete Linie die erwartete Änderung der Absorption durch die Verdünnung des Rezeptors bei der Titration beschreibt. (oben rechts) Job Plot berechnet aus der UV-Titration.

Die Kemp'sche Trisäure ist als zusätzliches Vergleichssubstrat sehr interessant, da sie eine relativ rigide Struktur wie die Trimesinsäure aufweist, allerdings nicht über die Möglichkeit verfügt, π -Stacking Wechselwirkungen aufzubauen. Allerdings zeigt sie die gleiche C3 Symmetrie wie der Rezeptor. Wenn man die

drei verschiedenen Tricarbonsäuren untereinander vergleicht, kann man also herleiten, welchen Einfluss

1. π -Stacking
2. C3 Symmetrie
3. Hydroxy-Gruppen
4. Rigidität/Flexibilität

auf die Bindungskonstanten haben.

So bindet z.B. die Trimesinsäure mit $K_{\text{Ass}} = 1.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ um den Faktor 2 stärker als Citrat mit $K_{\text{Ass}} = 8.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ und um den Faktor 3 stärker als die Kemp'sche Trisäure mit $K_{\text{Ass}} = 5.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Wenn man die Trimesinsäure mit der Kemp'schen Trisäure vergleicht unterscheiden sie sich in ihrer Struktur nur um Faktor 1 aus der Liste, d.h. also, dass die zusätzlichen π -Stacking Wechselwirkungen eine Verstärkung der Komplexstärke um den Faktor 3 bewirken. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich Citrat und Trimesinsäure um die Punkte 1-4, d.h. das Citrat ist flexibler, hat keine C3 Symmetrie, hat eine Hydroxyfunktion und kann keine π -Stacking Wechselwirkungen aufbauen. Trotzdem bindet sie nur um den Faktor 2 schlechter als die Trimesinsäure.

Dies kann bedeuten, dass die zusätzliche Hydroxyfunktion und die höhere Flexibilität die fehlende π -Stacking Wechselwirkung und C3 Symmetrie mehr oder weniger ausgleichen. Dass die α -Hydroxy Funktion des Citrats einen hohen Einfluss auf die Bindungskonstante haben kann, wurde auch schon von *Anslyn* bei seinen Rezeptoren beobachten. Hier wurden teilweise Hydroxy-Funktionen vor Carboxylaten bei der Komplexierung von Citrat bevorzugt.^[60] Diese Theorie wird auch noch einmal durch die bessere Komplexierung des Citrats gegenüber der Kemp'schen Trisäure durch den Rezeptor bestätigt.

Diese beiden Substrate unterscheiden sich nur noch um die Faktoren 2-4. Trotzdem bindet das Citrat fast um den Faktor 2 stärker als die Kemp'sche Trisäure. Also müssen gerade Flexibilität und die Hydroxyfunktion einen hohen Einfluss auf die Bindungskonstante haben. Falls die fehlende Symmetrie einen Einfluss auf die Bindungskonstante haben sollte, wäre der Einfluss dieser beiden anderen Faktoren umso höher einzuschätzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Komplexierung der Tricarbonsäuren durch Rezeptor **8** gerade die hydrophobe Wechselwirkung einen hohen Einfluss auf die Bindungskonstante zu haben scheint (Vergleich **10** und **83**). Aber auch Flexibilität und Hydroxy-Gruppen der Substrate zeigen einen Einfluss auf die Bindungskonstante für Rezeptor **8** (Vergleich **1** und **83**).

Wie schon bei den Titrationsen in reinem Wasser zuvor binden die Tricarbonsäuren mindestens um den Faktor 4 besser als die entsprechenden aliphatischen oder aromatischen Dicarbonsäuren. Wenn man nun die Bindungskonstanten der biologisch relevanten Polycarboxylate Citrat, Malat und Ttrat untereinander vergleicht, erkennt man, dass Citrat mindestens um den Faktor 8 besser bindet als die beiden Dicarboxylate. Außerdem muss man berücksichtigen, dass diese Selektivität bei einem 1000fachen Überschuss an Chlorid erreicht werden konnte, dass ja auch eine Affinität zum Rezeptor zeigt, was über Titrationsen mit HCl und NaCl gezeigt werden konnte (s. o.). Somit zeigt der Rezeptor **8** eine sehr gute Selektivität von Citrat gegenüber anderen biologisch relevanten Anionen wie Malat, Ttrat oder auch Chlorid. Mit $K_{\text{Ass}} = 8.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ für Citrat in wässrigen Puffer-Lösungen bindet Rezeptor **8** mindestens um den Faktor 100 stärker als der Citrat-Rezeptor **7** nach *Anslyn*, der in gepufferten Medien nur noch Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} \sim 10^2 \text{ M}^{-1}$ zeigte. Höhere Affinitäten für Citrat unter den gleichen Bedingungen konnten bisher nur durch Rezeptoren auf Metall-Basis erreicht werden (siehe Kapitel 3.2).

Interessant sind auch noch die unterschiedlichen Bindungskonstanten innerhalb der aromatischen Dicarboxylate, die auch schon in reinem Wasser beobachtet werden konnten. Dabei bindet die *i*-Phthalsäure mit $K_{\text{Ass}} = 3.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ am besten, danach die Terephthalsäure mit $K_{\text{Ass}} = 3.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ und die Phthalsäure mit $K_{\text{Ass}} = 2.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Dies lässt sich anhand der Symmetrie der *i*-Phthalsäure erklären, die der des Rezeptors ähnlich ist. Bei der Phthalsäure liegen die Carboxylate direkt in benachbarter Position, weswegen sich der Rezeptor etwas verbiegen muss, um den Komplex auszubilden. Dazu kommt noch, dass sich die kationischen Arme sehr nahe kommen müssen, was zu elektronischen Abstoßungen führen könnte. Bei der Terephthalsäure liegen die beiden Carboxylate weiter auseinander, so dass es zu keiner elektrostatischen Abstoßung kommt. Allerdings muss sich aber auch hier der Rezeptor aus seiner C3 Symmetrie verbiegen, um beide Carboxylate komplexieren zu können. So

könnte die Reihenfolge *i*-Phthalsäure > Terephthalsäure > Phthalsäure erklärt werden.

Bisher konnte also mit spektroskopischen Methoden gezeigt werden, dass der Rezeptor **8** Polycarboxylate wie Trimesinsäure oder auch Citrat mit hohen Bindungskonstanten in Wasser erkennen kann. Dabei bindet Rezeptor **8** sowohl in Wasser als auch in Puffer um den Faktor 100 besser als der Citrat-Rezeptor **7** nach *Anslyn*. Außerdem zeigt der Rezeptor Selektivität sowohl für die Tricarbonensäuren gegenüber den Dicarbonensäuren als auch für die aromatischen gegenüber den aliphatischen Polycarboxylaten. Zum Beispiel bindet Rezeptor **8** Citrat in Gegenwart eines hohen Überschusses an Chlorid mindestens um den Faktor 7 besser als andere biologisch relevante Anionen.

Um die Vermutungen für die Selektivität, des Rezeptors **8** für verschiedene Polycarboxylate, die bisher anhand der Ergebnisse der Bindungsstudien gemacht wurden, zu bestätigen und Informationen über eine mögliche Komplexstruktur zu erhalten, wurden als nächstes Molecular Modeling Rechnungen und NOESY-Spektroskopie durchgeführt.

4.2.2 Komplexstruktur und Selektivität

Dazu wurde ein NOESY-NMR-Spektrum einer 10 mM Lösung aus Rezeptor und Trimesinsäuretricarboxylat in reinem DMSO vermessen. Ein Ausschnitt des so erhaltenen NOE-Spektrums ist in Abb. 4.36 gezeigt.

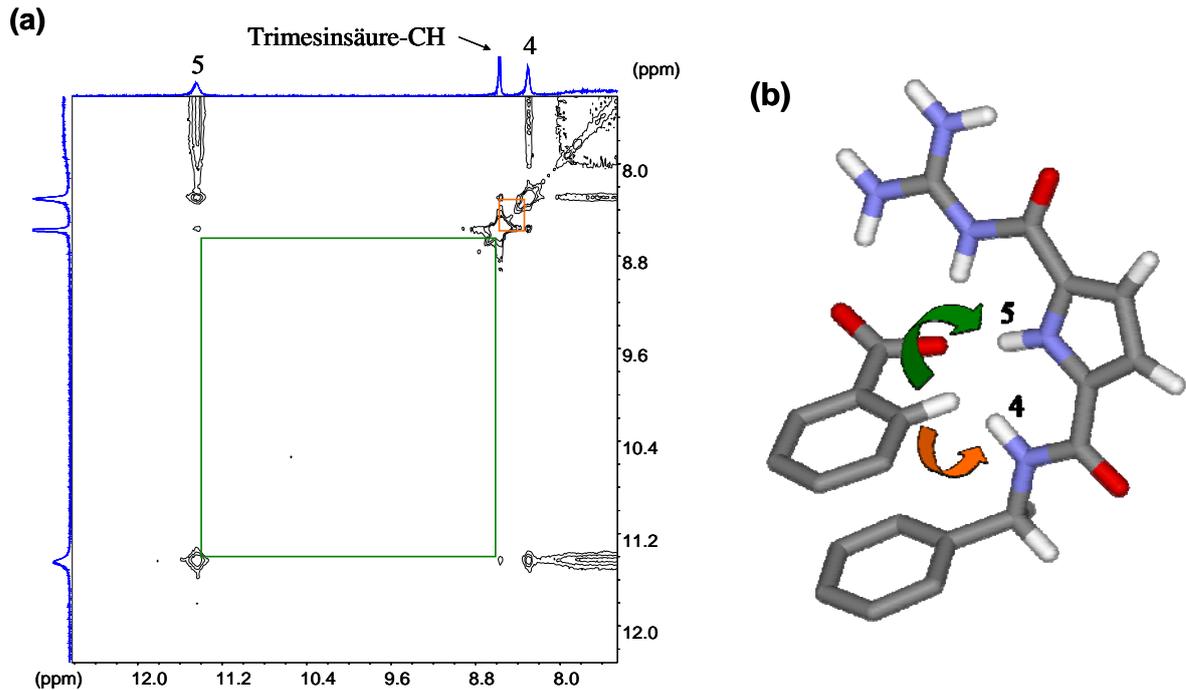


Abb. 4.36. (a) Ausschnitt des NOE Spektrums von Rezeptor **8** und Trimesinsäure **10** (beide 10 mM) in DMSO; (b) Zuordnung der beobachteten NOE-Signale (zur Übersichtlichkeit wurden zwei Bindungsarme entfernt).

Das NOE-Spektrum zeigt Cross Peaks sowohl zwischen dem Pyrrol-NH **5** und dem Trimesinsäure CH als auch dem Amid NH **4** und dem Trimesinsäure CH. Zusätzlich weist der Rezeptor noch Cross-Peaks zwischen den Pyrrol CHs und dem Trimesinsäure CH auf, die in diesem Ausschnitt des NOEs nicht zu sehen sind. Diese Cross Peaks bestätigen also noch einmal die Komplexierung des Trimesinsäurecarboxylats durch den Rezeptor. Zusätzlich bestätigen sie aber auch noch, dass das Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv in den Bindungsarmen des Rezeptors **8** eine syn Konformation annimmt. Diese Konformation ist zwar nicht der energetisch bevorzugte Grundzustand des Rezeptors (obwohl in Wasser die Unterschiede zwischen den Energien der einzelnen Konformere nach Molecular Modeling Rechnungen sehr klein zu sein scheinen),^[98] aber es ist die Konformation, die für die Komplexierung von Carboxylaten durch das Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv notwendig ist.^[25] Um noch mehr Informationen über die wahrscheinlichste Komplexstruktur aus Rezeptor und Trimesinsäuretricarboxylat zu erlangen, wurden Molecular Modeling Rechnungen durchgeführt.^[99] Die daraus resultierende Komplex-Struktur ist in Abb. 4.37 gezeigt.

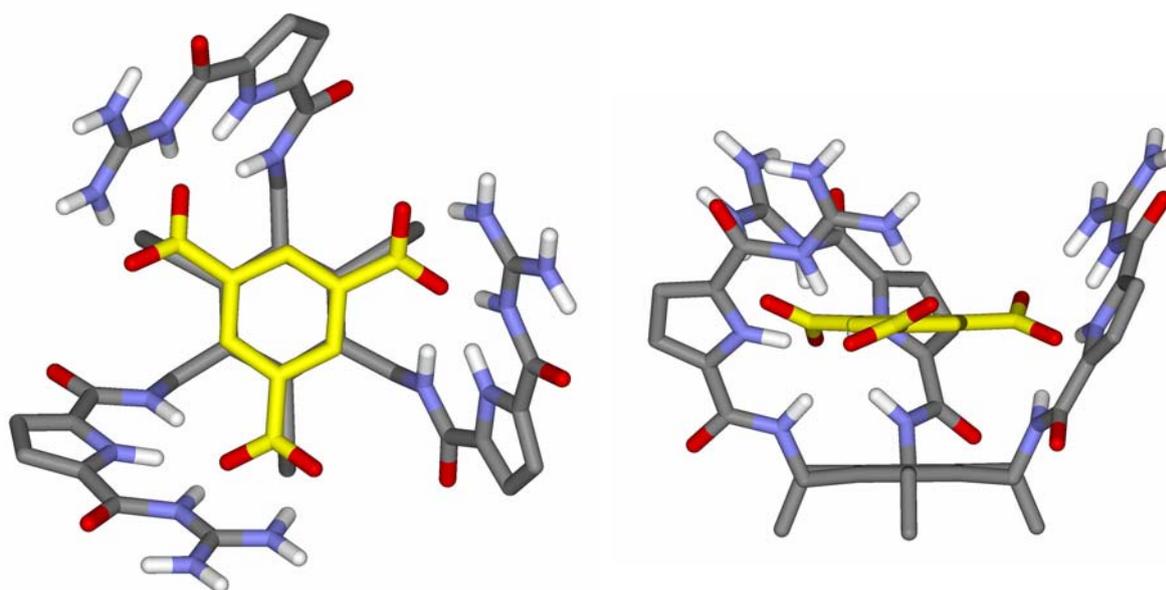


Abb. 4.37: Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von Rezeptor **8** (grau) und Trimesinsäuretricarboxylat **10** (gelb). Unpolare Wasserstoffatome wurden zur besseren Übersicht entfernt.

Das Substrat liegt über dem Benzol-Ring des Rezeptors innerhalb van-der-Waals-Radius, was π -Stacking Wechselwirkungen zwischen dem elektronenreichen Aromaten des Rezeptors und dem elektronenarmen Aromaten des Trimesinsäuretricarboxylats vermuten lässt. Jedes Carboxylat des Substrats wird auf gleiche Art und Weise von den Rezeptorarmen komplexiert. Dabei werden neben der ionischen Wechselwirkung zwischen dem Carboxylat und dem Acylguanidinium noch zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Amid-NH und dem Pyrrol-NH aufgebaut. Dieses Bindungsmotiv entspricht exakt dem von einfach geladenen Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren bei der Komplexierung von Carboxylaten, das von *Schmuck et al.* vor kurzem beobachtet werden konnte.^[25] Außerdem entsprechen die Ergebnisse aus den Rechnungen genau denen, die aus den NOE-Untersuchungen erhalten werden konnten. Dies ist auch noch einmal in Abb. 4.38 dargestellt, in der die gerechneten Wechselwirkungen mit den Interaktionen verglichen werden, die durch die NOE-Untersuchungen nachgewiesen werden konnten.

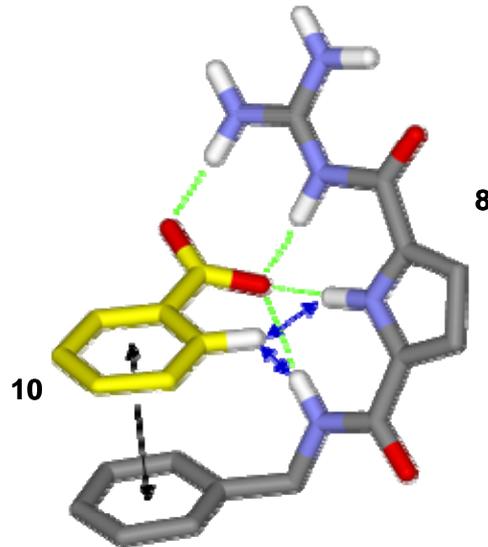


Abb. 4.38: Wichtige Wechselwirkungen im Komplex aus **8** und **10**. Das Carboxylat interagiert mit dem Rezeptor über H-Brücken (gestrichelte grüne Linie) und π -Stacking (schwarzer Pfeil). Beobachtete NOE Signale sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet.

Aufgrund dieser Rechnungen kann man den Rezeptor als Molekulare Fliegenfalle bezeichnen. In Abwesenheit eines Substrats zeigen die Rezeptorarme aufgrund von elektrostatischen Abstoßungen voneinander weg, wodurch eine offenere Form des Rezeptors entsteht. Bei Komplexierung eines Substrats kommen sich die Arme wieder näher und umschließen das Substrat.

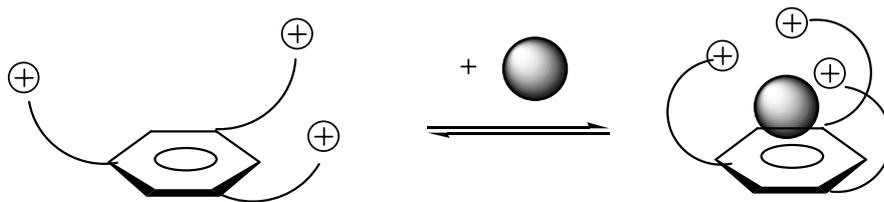


Abb. 4.39: Substratkomplexierung des Rezeptors **8** ähnelt einer Molekularen Fliegenfalle.

Die hohen Bindungskonstanten dieses System können durch drei Faktoren erklärt werden:

1. Die hervorragenden Eigenschaften des Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotives bei der Komplexierung von Carboxylaten im Vergleich zu normalen Guanidinium- und Ammonium-Salzen.

2. π -Stacking Wechselwirkungen zwischen dem elektronenreichen Aromaten des Rezeptors und dem elektronenarmen Aromaten der Trimesinsäure, die gerade in polaren Lösemitteln wie Wasser einen hohen Anteil an der Bindungskonstante haben sollten.

3. Die drei Bindungsarme des Rezeptors bilden ein hydrophobes Schild um das Substrat bei der Komplexbildung im Inneren des Rezeptors (siehe Abb. 4.40). Dadurch wird die Mikroumgebung um die Carboxylat-Bindungsstelle viel unpolarer als das sie umgebende Lösemittel (Siehe Lösemittel zugängliche Oberflächen Abb. 4.40), was die polaren Wechselwirkungen noch einmal erhöhen sollte, da diese in unpolaren Medien an Stärke zunehmen.

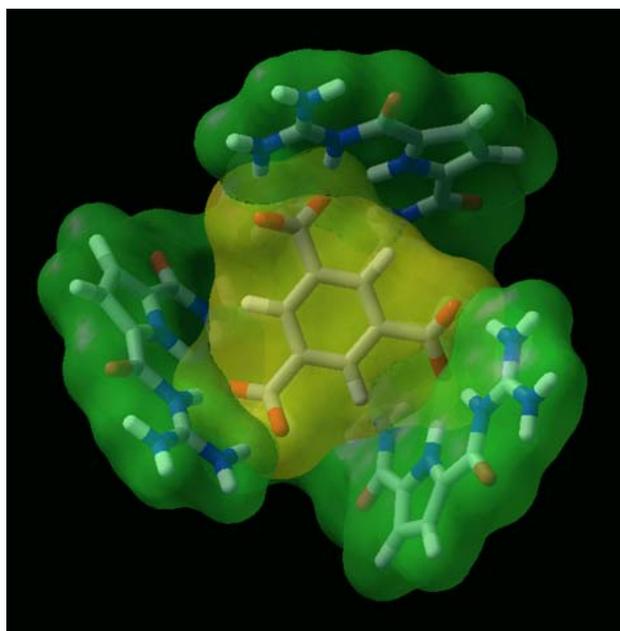


Abb. 4.40: Solvens zugängliche Oberflächen des Rezeptors **8** (grün) und des Substrats **10** (gelb) innerhalb des Komplexes.

Um nun noch mehr über die Komplexstruktur der verschiedenen Polycarboxylate und deren selektive Bindung an den Rezeptor herauszufinden, wurden weitere Molecular Modeling Rechnungen durchgeführt.^[99] Die gerechnete Struktur aus Rezeptor **8** und Kemp'scher Trisäure **83** ist in Abb. 4.41 gezeigt. Wenn man diese Strukturen nun mit den Rechnungen der Trimesinsäure (siehe Abb. 4.37) vergleicht, erkennt man eine sehr starke Ähnlichkeit. Die drei Carboxylate werden von jeweils einem Arm des Rezeptors gebunden. Dieses Bindungsmotiv entspricht wiederum dem, das für die Komplexbildung von Carboxylaten durch Guanidinio-

carbonylpyrrol-Rezeptoren schon beobachtet wurde. Der einzige Unterschied besteht also nur in dem aromatischen Ring der Trimesinsäure und damit verbunden den fehlenden hydrophoben Wechselwirkungen bei der Komplexierung der Kemp'schen Trisäure. Wie schon oben erwähnt macht diese fehlende Wechselwirkung einen Unterschied in der Bindungskonstante um den Faktor 3 aus.

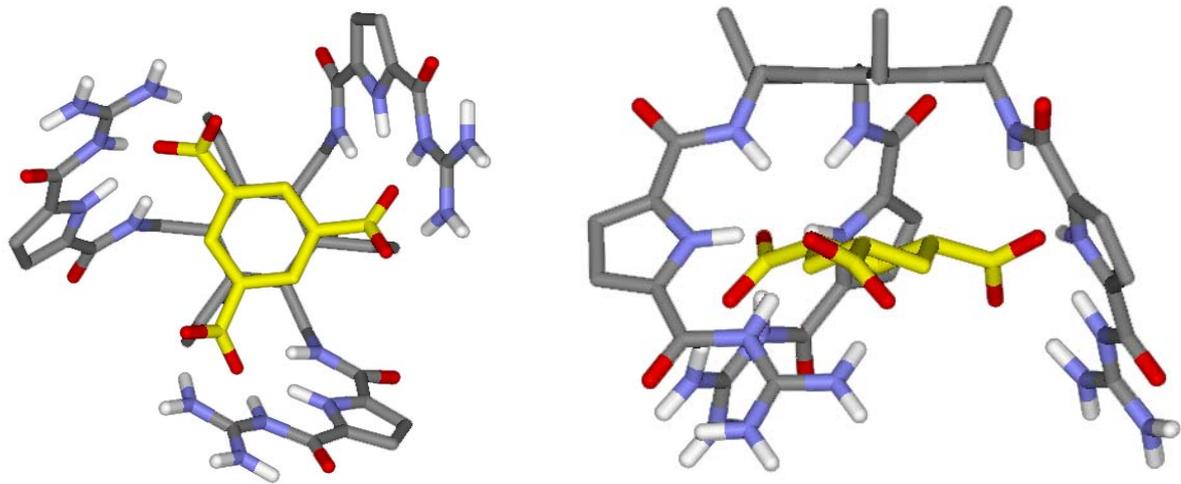


Abb. 4.41: Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von Rezeptor **8** (grau) und Kemp'sche Trisäure **83** (gelb). Unpolare Wasserstoffatome wurden zur besseren Übersicht entfernt.

Die Struktur des gerechneten Komplexes aus Rezeptor und Citrat (siehe Abb. 4.42) unterscheidet sich dagegen von den bisher gerechneten Strukturen. Das Bindungsmotiv entspricht nicht dem typischen eines Guanidiniocarbonylpyrrols, sondern die Carboxylate werden von mehreren Armen des Rezeptors gleichzeitig komplexiert. Außerdem bindet ein Arm des Rezeptors bevorzugt die Hydroxygruppe des Citrats, was wie schon erwähnt auch von *Anslyn* beobachtet wurde. Durch die größere Flexibilität des Substrats kann der Rezeptor das Citrat enger umschließen, so dass der Kontakt zum umgebenden Solvens minimiert wird. Dadurch sollten die polaren Wechselwirkungen, wie schon bei der Trimesinsäure erwähnt, enorm an Stärke gewinnen, da gerade nicht-kovalente Wechselwirkungen sehr stark von sie umgebenden Lösemittel abhängig sind. Diese beiden Faktoren, die zusätzliche Wechselwirkung mit der Hydroxygruppe und die größere hydrophobe Abschirmung, hervorgerufen durch die höhere

Flexibilität, könnten die Bindungskonstante von Citrat erklären, die etwas höher liegt als die der Kemp'schen Trisäure und nur um den Faktor 2 schlechter gebunden wird als die Trimesinsäure. Die Vermutungen, die anhand der gefundenen Bindungskonstanten angestellt wurden, konnten also durch die Molecular Modeling Studien bestätigt werden.

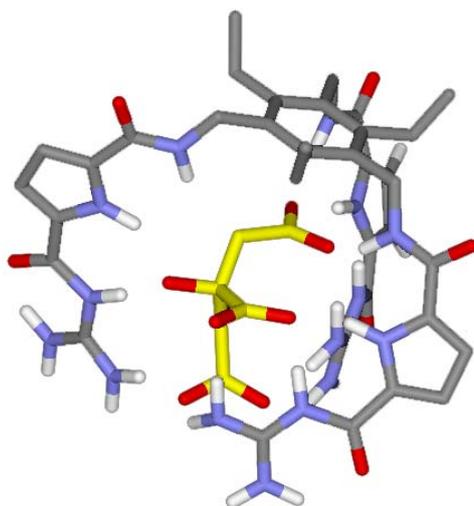


Abb. 4.42: Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von Rezeptor **8** (grau) und Citrat **1** (gelb). Unpolare Wasserstoffatome wurden zur besseren Übersicht entfernt.

Als nächstes sollten nun über Molecular Modeling Rechnungen die verschiedenen Selektivitäten bei der Komplexierung von aromatischen Dicarboxylaten hergeleitet werden. Dabei wurde die *i*-Phthalsäure mit $K_{\text{Ass}} = 3.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ besser gebunden als die Terephthalsäure mit $3.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ und die Phthalsäure mit $2.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Die gerechnete Struktur der *i*-Phthalsäure mit dem Rezeptor ist in Abb. 4.43 dargestellt. Man erkennt, dass die zwei Carboxylate jeweils von einem Bindungsarm des Rezeptors mit dem üblichen Bindungsmodus für Guanidiniocarbonylpyrrole komplexiert werden. Dabei wird ein Carboxylat noch zusätzlich durch den dritten Bindungsarm gebunden. Die drei Bindungsarme kommen sich dabei sehr nahe, was auf elektrostatische Abstoßungen schließen lässt und die schlechteren Bindungskonstanten im Vergleich zur Trimesinsäure erklären könnte. Sehr schön sieht man auch die π -Stacking Wechselwirkungen zwischen den beiden aromatischen Ringen, die genau übereinander liegen.

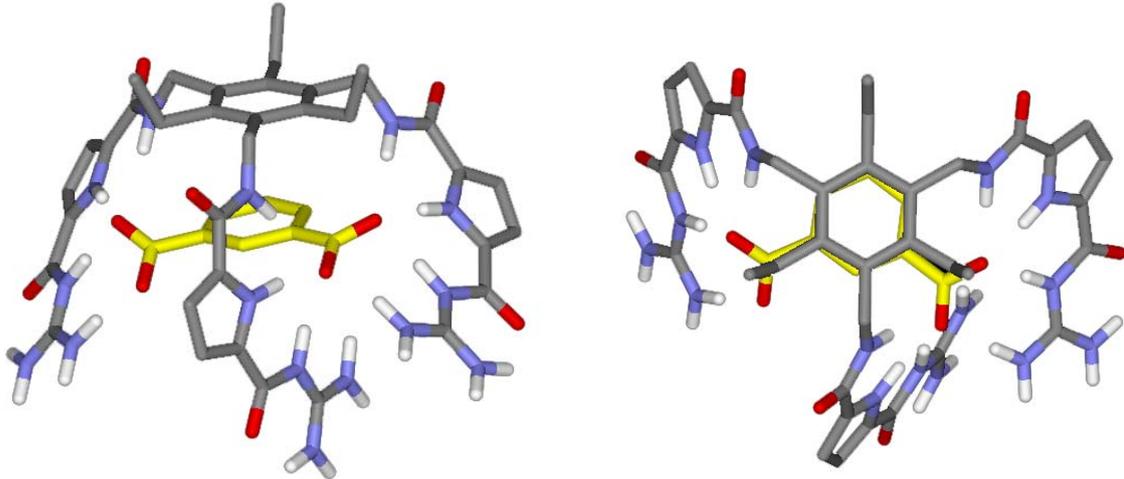


Abb. 4.43: Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von Rezeptor **8** (grau) und *i*-Phthalsäure **81** (gelb). Unpolare Wasserstoffatome wurden zur besseren Übersicht entfernt.

Der gerechnete Komplex aus Phthalsäure **80** und Rezeptor **8** (siehe Abb. 4.44) dagegen unterscheidet sich von dem der *i*-Phthalsäure. Ebenso wie bei der *i*-Phthalsäure komplexieren wiederum zwei Bindungsarme jeweils ein Carboxylat nach dem üblichen Bindungsmodus, wobei der dritte Arm diesmal allerdings Wasserstoffbrücken zu beiden Carboxylaten ausbildet, was zu einer Verzerrung des Bindungsmotives aus der typischen planaren Anordnung führt. Außerdem kommen sich die drei Bindungsarme des Rezeptors bei der Komplexierung noch näher als bei der *i*-Phthalsäure. Den ausschlaggebenden Unterschied zwischen den beiden gerechneten Strukturen sieht man allerdings erst, wenn man die Struktur von oben betrachtet. Durch die Komplexierung der beiden näher aneinander liegenden Carboxylate wird der Benzolring im Gegensatz zur *i*-Phthalsäure unter dem Benzolring des Rezeptors weggeschoben. Dadurch kommt es zu geringeren π -Stacking Wechselwirkungen, die neben den anderen schon genannten Faktoren wahrscheinlich ausschlaggebend für die geringere Bindungskonstante sein könnten.

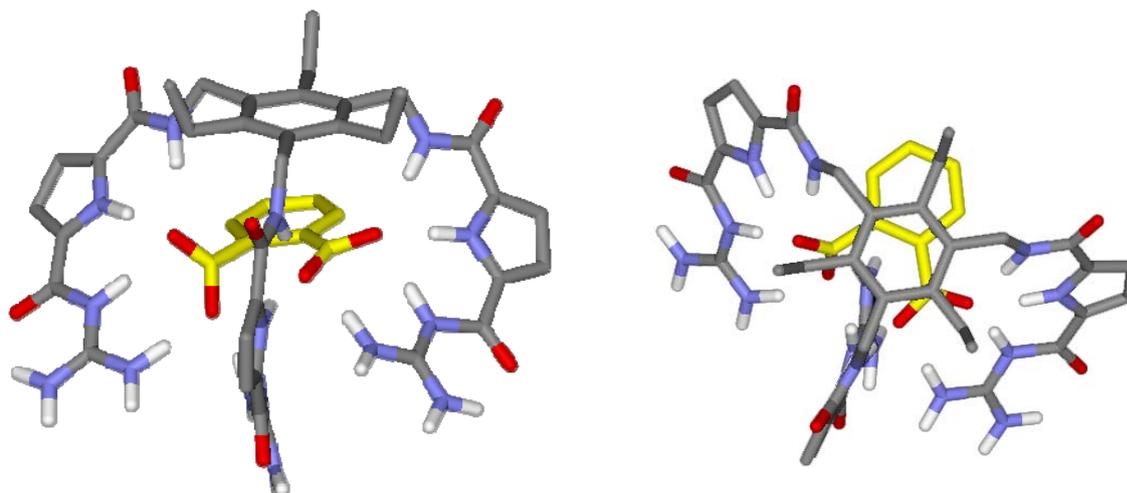


Abb. 4.44: Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von Rezeptor **8** (grau) und Phthalsäure **80** (gelb). Unpolare Wasserstoffatome wurden zur besseren Übersicht entfernt.

Dieser Effekt könnte auch der Grund für die geringere Bindungskonstante der Terephthalsäure sein. Die Rechnung (siehe Abb. 4.45) zeigt ebenso wie bei der Phthalsäure eine Verschiebung des Benzolrings. Allerdings werden die zwei Carboxylate analog zur *i*-Phthalsäure gebunden, d.h. zwei Arme des Rezeptors binden jeweils ein Carboxylat, während ein Carboxylat noch zusätzlich durch den dritten Arm gebunden wird. Im Gegensatz zu den beiden anderen Phthalaten liegen die drei Bindungsarme des Rezeptors bei der Komplexierung der Terephthalsäure weiter auseinander. Dies könnte damit der Grund sein, warum die Terephthalsäure besser gebunden wird als die Phthalsäure und nur geringfügig schlechter als die *i*-Phthalsäure, da es hier zu den geringsten elektrostatischen Abstoßungen kommen sollte. Auf diese Weise kann also anhand der drei Faktoren π -Stacking, elektrostatische Abstoßungen und Verzerrung des Rezeptors die Selektivität von *i*-Phthalsäure > Terephthalsäure > Phthalsäure erklärt werden.

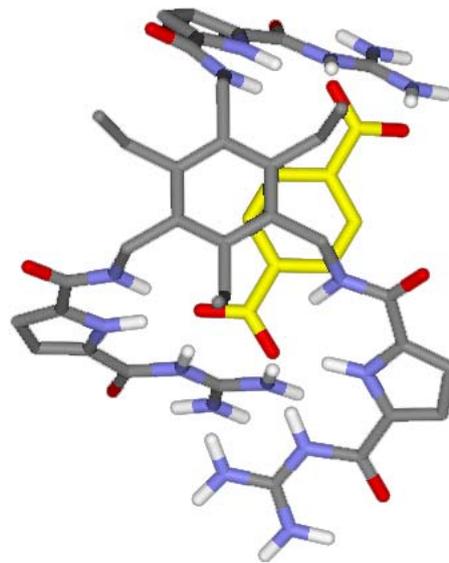


Abb. 4.45: Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von Rezeptor **8** (grau) und Terephthalsäure **82** (gelb). Unpolare Wasserstoffatome wurden zur besseren Übersicht entfernt.

In diesem Kapitel konnten somit möglich Gründe für die hohe Komplexstabilität des Rezeptors mit verschiedenen Polycarboxylaten mithilfe von NOESY-NMR-Spektroskopie und Molecular Modeling Rechnungen hergeleitet werden. Dabei ähnelt der Bindungsmodus des Rezeptors einer molekularen Fliegenfalle. Weiterhin konnten mit Molecular Modeling Rechnungen mögliche Erklärungen für die Selektivität des Rezeptors **8** gegenüber verschiedenen Polycarboxylaten bestimmt werden. Dabei scheinen gerade die unpolaren Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat sowohl einen großen Einfluss auf die Bindungskonstanten als auch auf die Selektivität zu haben.

Interessant sind aber nicht nur Rezeptoren, die ihre Substrate mit hohen Bindungskonstanten als auch großer Selektivität erkennen, sondern auch Sensoren oder Sensorsysteme, mit denen man mit dem bloßen Auge die Anwesenheit von bestimmten Analyten nachweisen kann. Der Versuch zur Entwicklung eines derartigen Systems wird im folgenden Teil der Arbeit vorgestellt.

4.2.3 "naked eye detection"

Ein selektive Erkennung von bestimmten Substraten, die mit dem bloßen Auge detektiert werden kann, bezeichnet man auch als "*naked eye detection*".^[87,88] Dies wurde unter anderem schon von *Anslyn* vorgeführt, der z.B. „test strips“ für Citrat oder andere Polycarboxylate entwickelt hat.^[100] Diese Sensorsysteme arbeiten nach dem Prinzip der *indicator displacement assays (IDA)*, d.h. wenn Sensoren kein eigenes Farbsignal liefern wird ein Indikator als Reporter verwendet, der bei Zugabe des Substrats zum Indikator/Rezeptor Komplex eine Farbänderung vorweist.^[78] Ein Beispiel für einen solchen Indikator ist das Carboxyfluorescein **52**, welches als Anion eine starke Fluoreszenz zeigt und auch deswegen von *Anslyn* für *IDAs* schon verwendet wurde.

In Abb. 4.46 ist der Ablauf eines solchen *IDAs* mit Rezeptor **8** schematisch aufgezeichnet. Das Carboxyfluorescein zeigt in Lösung eine starke Eigenfluoreszenz. Bei Zugabe des Rezeptors sollte sich nun die Fluoreszenz ändern und bestenfalls durch die Komplexbildung des Trianions komplett verschwinden. Durch Zugabe eines Liganden **L** sollte die Fluoreszenz dann wieder zunehmen und vielleicht wieder ganz hergestellt werden, was einer vollständigen Verdrängung des Indikators durch den Liganden entsprechen würde.

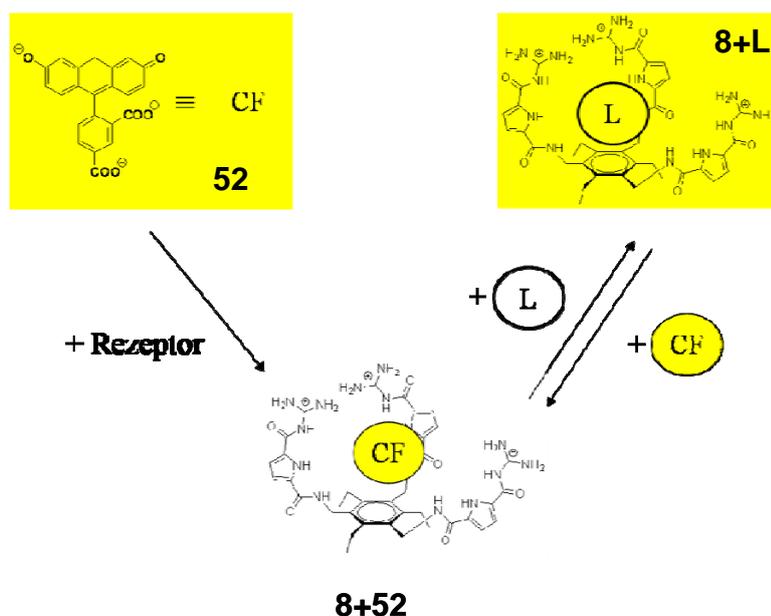


Abb. 4.46: Schematische Darstellung eines indicator displacement assays mit Rezeptor **8**, Carboxyfluorescein **52** und einem beliebigen Liganden **L**. Die gelbe Unterlegung deutet die Fluoreszenz des Carboxyfluoresceins an.

Für diesen Assay wurde nun eine Lösung von CF **52** (0.5 mM) in 90 % DMSO/Wasser hergestellt und die Fluoreszenz unter der UV-Lampe beobachtet. Bei Zugabe von einem Äquivalent Rezeptor kam es dann tatsächlich zu einer vollständigen Löschung der Fluoreszenz, was eine starke Komplexbildung des Carboxyfluoresceins durch den Rezeptor vermuten lässt (siehe Abb. 4.47). Danach wurden verschiedene Polycarboxylate untersucht. Dafür wurde der 1:1 Komplex aus Rezeptor und CF jeweils mit 20 Äquivalenten Polycarboxylat versetzt und unter der UV-Lampe beobachtet. Man erkennt, dass beim Citrat die Fluoreszenz wieder vollständig hergestellt wurde, während beim Malat nur eine geringe bzw. beim Acetat keine Wiederherstellung zu erkennen ist. Das würde bedeuten, dass die Bindungskonstante von CF stärker ist als die von Malat und Acetat, weswegen kein oder nur wenig CF aus dem Komplex mit dem Rezeptor verdrängt wird. Dagegen bindet Citrat ausreichend stark genug, um die Fluoreszenz wieder vollständig herzustellen.

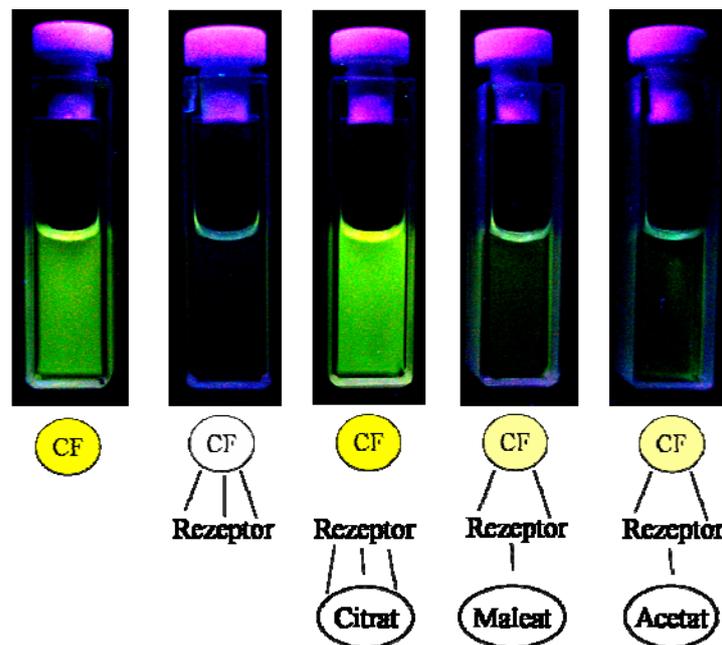


Abb. 4.47: Fluoreszenz der verschiedenen Lösungen aus Rezeptor **8** (0.5 mM), Carboxyfluorescein (1 Äq.) und den Substraten Citrat, Malat und Acetat (jeweils 20 Äq.) beobachtet unter einer UV-Lampe bei $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Da die Fluoreszenz des Carboxyfluoresceins durch den Rezeptor vollständig gelöscht wurde, was auf eine hohe Bindungskonstante schließen lässt, wurde mittels Fluoreszenz-Spektroskopie die genaue Bindungskonstante dieser Komplexbildung bestimmt. Die Titrations wurden aufgrund der schlechten

Löslichkeit von **52** in 10 % DMSO/Wasser mit Bis-tris Puffer (2 mM) und NaCl (10 mM) durchgeführt. So konnte eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 1.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ bestimmt werden. Diese hohe Bindungskonstante könnte damit ausschlaggebend für die vollständige Löschung der Fluoreszenz bei der *naked eye detection* sein.

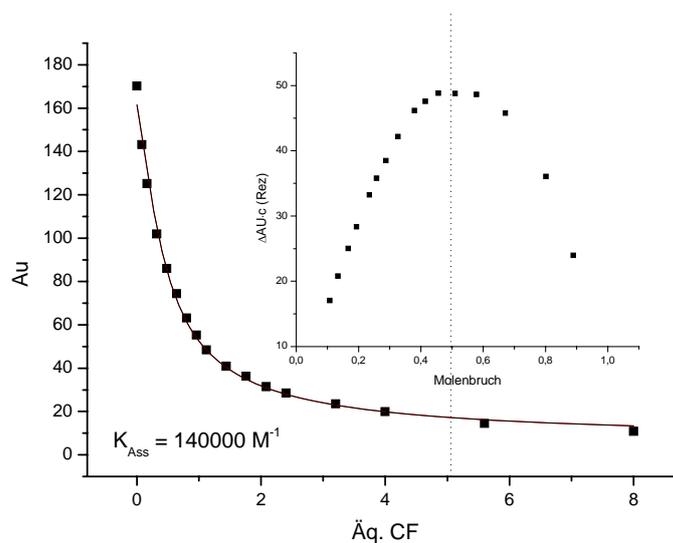


Abb. 4.48: Bindungsisotherme des Rezeptors **8** ($1.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) bei $\lambda = 335 \text{ nm}$ von der Fluoreszenz-Titration mit Carboxyfluorescein **52** ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) in 10 % DMSO/Wasser (2 mM Bis-Tris-Puffer, pH = 6.3, 10 mM NaCl). Die schwarze Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung an die experimentellen Daten (■). Die Konzentration des Rezeptors wurde während der Titration konstant gehalten. (oben rechts) Job Plot berechnet aus der UV-Titration zeigt eine klare 1:1 Stöchiometrie.

Zur Überprüfung des *IDA* in 90 % DMSO/Wasser wurden nun noch Titrations in 50 % DMSO/Wasser mit HEPES Puffer (20 mM; pH = 7.4) durchgeführt, um auszuschließen, dass allein pH Schwankungen für die Änderung der Fluoreszenz verantwortlich sind. Dazu wurde der Komplex aus Carboxyfluorescein und Rezeptor (beide $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) vorgelegt und mit verschiedenen Polycarboxylaten versetzt. Beobachtet wurde die Veränderung der Fluoreszenz von CF bei 520 nm, die sich durch die Verdrängung durch die Polycarboxylate ändert. Man erkennt, dass sich nach Zugabe von 100 Äquivalenten Citrat die Fluoreszenz nicht weiter ändert, während alle anderen Carboxylate bei 100 Äquivalenten nicht mehr als 50 % Komplex gebildet haben. Bei Zugabe von einem Äquivalent Substrat bindet der Rezeptor Citrat mindestens um den Faktor 10 stärker (Malat) als alle anderen Substrate. Sogar bei einem relativ großen Überschuss von 14 Äquivalenten Substrat komplexiert der Rezeptor Citrat immer noch mindestens um dem

Faktor 4 stärker als Malat oder Tartrat. Dies bestätigt die Ergebnisse, die in 90 % DMSO/Wasser durchgeführt wurden, und zeigt, dass nicht pH-Änderungen für die Änderung der Fluoreszenz verantwortlich sind, sondern die Effekte auf Bindungsprozessen beruhen.

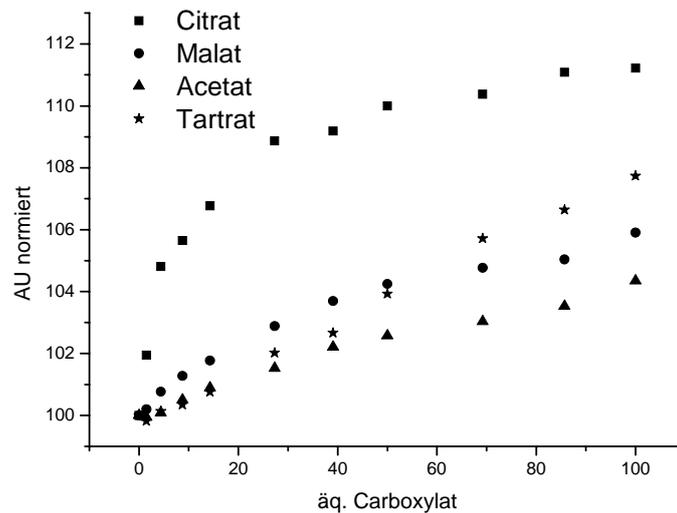


Abb. 4.49: Änderungen der Fluoreszenz des Komplexes aus Rezeptor **8** (10^{-5} M) und Carboxyfluorescein **52** (10^{-5} M) bei $\lambda = 520$ nm nach Zugabe von verschiedenen Carboxylaten ($3 \cdot 10^{-4}$ M) in 50 % DMSO/Wasser (20 mM HEPES Puffer, pH = 7.4) .

In diesem Kapitel konnte somit ein *naked eye* Sensor für die selektive Detektierung von Citrat gegenüber anderen biologisch relevanten Anionen entwickelt werden. Außerdem konnten diese Ergebnisse mit einem *IDA* bestätigt werden, der Selektivitäten für Citrat gegenüber anderen Anionen mit einem Faktor von bis zu 10 zeigte.

Neben den Polycarboxylaten sollte aber noch eine andere Substanzklasse, die anionischen Zucker, auf ihre Bindungseigenschaften für Rezeptor **8** untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Bindungsstudien werden in den nächsten Kapiteln vorgestellt

4.3 Bindungsstudien von Rezeptor 8 mit anionischen Zuckern

Seit der Entdeckung, dass Oligosaccharide nicht nur als Energiespeicher, sondern auch bei der Regulation biologischer Prozesse z. B. der Zell-Zell Erkennung eine wichtige Rolle spielen, ist diesem Zweig der Organischen Chemie ein reges Interesse zu Teil geworden.^[15] Während in den letzten Jahren viele Rezeptoren zur Komplexierung von kleinen Biomolekülen wie Aminosäuren und kleinen Peptiden entwickelt wurden,^[49,65] gibt es doch wenige Rezeptoren zur molekularen Erkennung von Zuckern oder Kohlenhydraten (siehe Kapitel 3.3).^[10,66] Die meisten dieser Systeme funktionieren allerdings nur in Lösemitteln wie Chloroform oder auch Methanol. Deswegen sollte nun der Rezeptor **8** auf seine Bindungseigenschaften für verschiedene Zucker überprüft werden. Da bei diesem System die Komplexierung aber nur auf Wasserstoffbrückenbindungen beruhen würde und deswegen wahrscheinlich keine Komplexierung in wässrigen Medien möglich ist, wurden als Substrate für erste Modelluntersuchungen verschiedene anionische Zucker gewählt (siehe Abb. 4.50). Hierbei handelt es sich um die Uronsäuren **11** und **12** sowie drei α -1-Zuckerphosphate **13**, **14** und **15** und Methylphosphat **16** zum Vergleich. Aufgrund der besonderen Bindungseigenschaften des Rezeptors **8** für Oxoanionen sollte vielleicht eine (selektive) Komplexierung dieser Zucker in Wasser möglich sein.

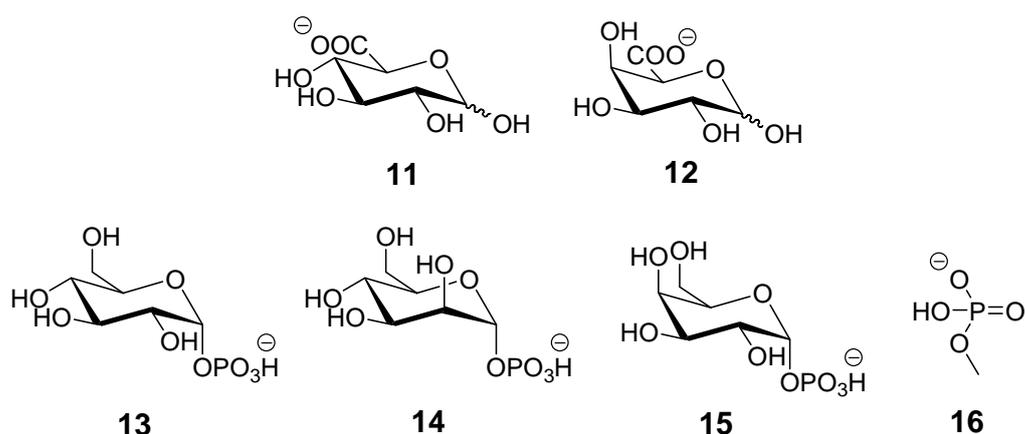


Abb. 4.50: Biologisch relevante anionische Zucker: Glucuronsäure **11**, Galacturonsäure **12**, α -Glucose-1-phosphat **13**, α -Mannose-1-phosphat **14** und α -Galactose-1-phosphat **15** und das Methyl-Phosphat **16**.

4.3.1 Uronsäuren

Die Uronsäuren sind nicht nur als Modellsysteme für Zucker interessant, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in der menschlichen Physiologie. So ist die Galacturonsäure **12** ein wichtiger Ballaststoff und Bestandteil von Pektin und Cellulose. Außerdem spielt sie eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Calcium.^[101] Bei vielen Organismen, aber nicht beim Menschen, ist sie außerdem beteiligt an der Ascorbinsäure-Biosynthese. Die Glucuronsäure **11** dagegen ist an der Entgiftung in der menschlichen Niere beteiligt.

Als erstes wurden NMR-Titrationsen mit dem Rezeptor **8** und Glucuronsäure **11** in verschiedenen Lösemittelgemischen durchgeführt. Während in reinem DMSO die Bindungsisotherme zu stark linear verlief, um sie mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse auswerten zu können, war sie in 50 % DMSO/Wasser (siehe Abb. 4.51) zu flach, um eine vernünftige Bindungskonstante bestimmen zu können.

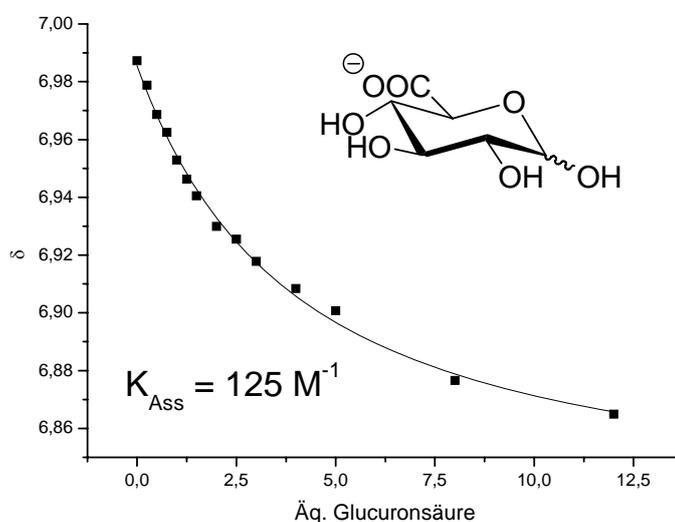


Abb. 4.51: NMR-Titration des Rezeptors **8** (1.7 mM) mit Glucuronsäure **11** (20 mM) in 50 % DMSO/Wasser. Die Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung mit einem 1:1 Modell an die experimentellen Daten (Rezeptor-Pyrrol-CH, ■).

Deswegen wurden die Titrationsen in 70 % DMSO/Wasser durchgeführt. In Abb. 4.52 ist als Beispiel die Titration der Glucuronsäure gezeigt. Hierzu wurden die durch die Komplexbildung hervorgerufenen Änderungen der NMR-Verschiebungen des Amid-NHs des Rezeptors **8** aufgezeichnet. Für die Galacturonsäure konnte so

mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse mit einem 1:1 Modell eine Bindungskonstante von $K_{\text{ASS}} = 1550 \text{ M}^{-1}$ bestimmt werden, während die Glucuronsäure nur eine Bindungskonstante von $K_{\text{ASS}} = 480 \text{ M}^{-1}$ aufweist. Die 1:1 Stöchiometrie wurde für beide Urnsäuren mit Job-Plots bestätigt (siehe Abb. 4.52). Somit bindet der Rezeptor **8** die Galacturonsäure um den Faktor 3 besser als die Glucuronsäure.

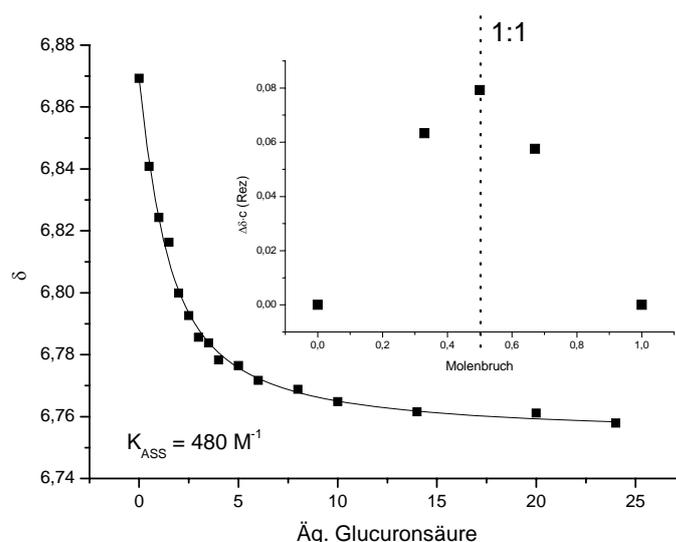


Abb. 4.52: NMR-Titration des Rezeptors **8** (1.7 mM) mit Glucuronsäure **11** (20 mM) in 70 % DMSO/Wasser. Die Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung mit einem 1:1 Modell an die experimentellen Daten (Rezeptor-Pyrrol-CH, ■). (oben rechts) Ein Job Plot in 70 % DMSO/Wasser bestätigt die 1:1 Stöchiometrie.

Die höhere Bindungsaffinität des Rezeptors **8** für die Galacturonsäure wurde unabhängig noch einmal mittels UV-Titrations bestätigt. Da allerdings in 70 % DMSO/Wasser mit Bis-Tris-Puffer (10 mM, pH = 6.0) keine Bindungskonstante bestimmt werden konnte, wurde der DMSO-Anteil auf 80 % erhöht. Dies lässt sich durch die niedrigeren Substratkonzentrationen und die höhere Ionenstärke der Lösung (Puffer) erklären, da bei höheren Ionenkonzentrationen die Stärke von polaren Wechselwirkungen abnimmt. Ein Beispiel ist in Abb. 4.53 für die Titration des Rezeptors **8** ($2.66 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) mit der Galacturonsäure ($4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) dargestellt. Dabei bindet unter diesen Bedingungen die Galacturonsäure mit einer Assoziationskonstante von $K_{\text{ASS}} = 6200 \text{ M}^{-1}$ noch um den Faktor 2 besser als die Glucuronsäure mit $K_{\text{ASS}} = 3200 \text{ M}^{-1}$, was die Ergebnisse der NMR-Studien bestätigt.

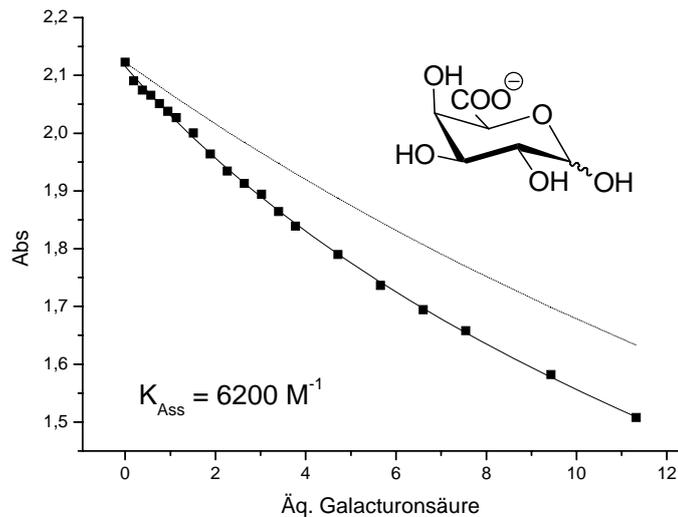


Abb. 4.53: Bindungsisotherme des Rezeptors **8** ($2.66 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) bei $\lambda = 300 \text{ nm}$ von der UV-Titration mit Galacturonsäure **12** (1 mM) in 80 % DMSO/Wasser (10 mM Bis-tris Puffer, $\text{pH} = 6.0$). Die schwarze Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung an die experimentellen Daten (■), während die gepunktete Linie die erwartete Änderung der Absorption durch die reine Verdünnung des Rezeptors bei der Titration beschreibt.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das C4-OH des Zuckers eine wichtige Rolle bei der Komplexierung spielt, da dies der einzige Unterschied zwischen den beiden Uronsäuren ist. Diese Hypothese wurde durch Molecular Modeling Rechnungen (siehe Abb. 4.54 am Beispiel der Galacturonsäure **12**) gestützt.^[99] Nach diesen Rechnungen werden bei beiden Zuckern die Carboxylate von allen drei kationischen Bindungsarmen simultan durch Wasserstoffbrückenbindungen komplexiert, während der Sauerstoff des Rings zu einem Arm zwei Wasserstoffbrückenbindungen aufbaut. Dass alle drei Arme für diese Komplexierung benötigt werden, wird dadurch bestätigt, dass bei $\text{pH} = 7$, bei dem der Rezeptor größtenteils als Monoanion vorliegt (siehe pH Profil des Rezeptors in Kapitel 4.3.2), durch NMR keine Komplexierung beobachtet werden konnte. Interessanterweise nimmt der Zucker laut Rechnung bei der Komplexierung eine Konformation ein, bei der die Carboxylate sowie die Hydroxy-Gruppen an Position 1 und 3, welche ihrerseits intramolekulare Wasserstoffbrücken zum Carboxylat ausrichten, axial sind. Allerdings liegt diese berechnete Struktur (Amber* force field, water GB/SA solvation model) nur 2.4 kJ/mol über der Konformation des Grundzustandes. Diese Konformation bringt die nun äquatoriale OH-Gruppe an C4 der Galacturonsäure in eine Position, die die Ausbildung von drei Wasserstoffbrücken zum Rezeptor ermöglicht. Im Komplex mit der Glucuronsäure

ist die OH-Gruppe an 4 Position axial und zeigt von den Wasserstoffbrückendonoren weg. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen erfordert nun die Verzerrung des Glucose Rings, was die schlechtere Bindungskonstante erklären könnte. Die beiden gerechneten Strukturen der Uronsäuren im Komplex sind in Abb. 4.54 gezeigt. Man erkennt hier sehr schön die Sessel-Konformation der Galacturonsäure, während die Glucuronsäure während der Komplexbildung eine twist-Boot-Konformation einnimmt, die energetisch oberhalb der Sessel-Konformation liegt. Dieser Bindungsmodus stimmt gut mit den Verschiebungen der NMR-Signale bei der Komplexbildung in DMSO überein. Die Verschiebungen der CH-Protonen an den Positionen C1 und C4 sind mit $\Delta\delta = 0.3$ und 0.11 viel größer als die von C2, C3 und C5 mit $\Delta\delta = 0.09$, 0.07 und 0.05 . Die großen Verschiebungen könnten durch die kationischen Wasserstoffbrücken mit dem Ringsauerstoff und der Hydroxyfunktion an Position C4 erklärt werden.

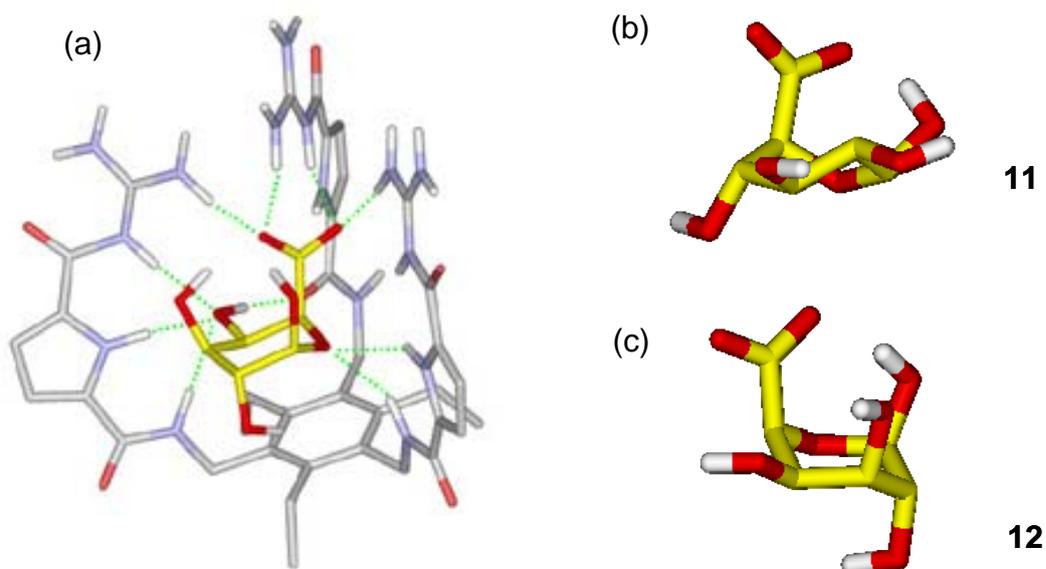


Abb. 4.54: (a) Berechnete energieminierte Struktur des Komplexes von Rezeptor **8** (grau) und Galacturonsäure **12** (gelb). (b) Berechnete energieminierte Struktur der Glucuronsäure **11** im Komplex mit **8**. (c) Berechnete energieminierte Struktur der Galacturonsäure **12** im Komplex mit **8**. Unpolare Wasserstoffatome wurden bei allen Grafiken zur besseren Übersicht entfernt. Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat sind mit grün gepunkteten Linien gekennzeichnet.

Die Bildung eines Komplexes zwischen Rezeptor **8** und der Glucuronsäure **11** konnte zusätzlich noch über NOESY Experimente (1:1 Mischung mit $c = 20$ mM in DMSO bei 25 °C) bestätigt werden. Leider konnten aufgrund der schlechten Qualität des Spektrums hervorgerufen durch die hohe Flexibilität des Systems und

durch Signalüberlappungen zwischen Rezeptor und Substrat keine Aussagen über die genaue Struktur des Komplexes gemacht werden. Allerdings konnten Cross Peaks zwischen dem CH1 und CH2 des Glucose Rings und dem Pyrrol-NH und den zwei Amid-NHs (Abb. 4.55 rot) beobachtet werden. Weitere Cross-Peaks zwischen den Amid-NHs und dem Pyrrol-NH des Rezeptors (Abb. 4.55 blau) bestätigen, dass die Rezeptorarme eine syn Position annehmen, die für eine effektive Komplexierung von Carboxylaten mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv nötig ist.

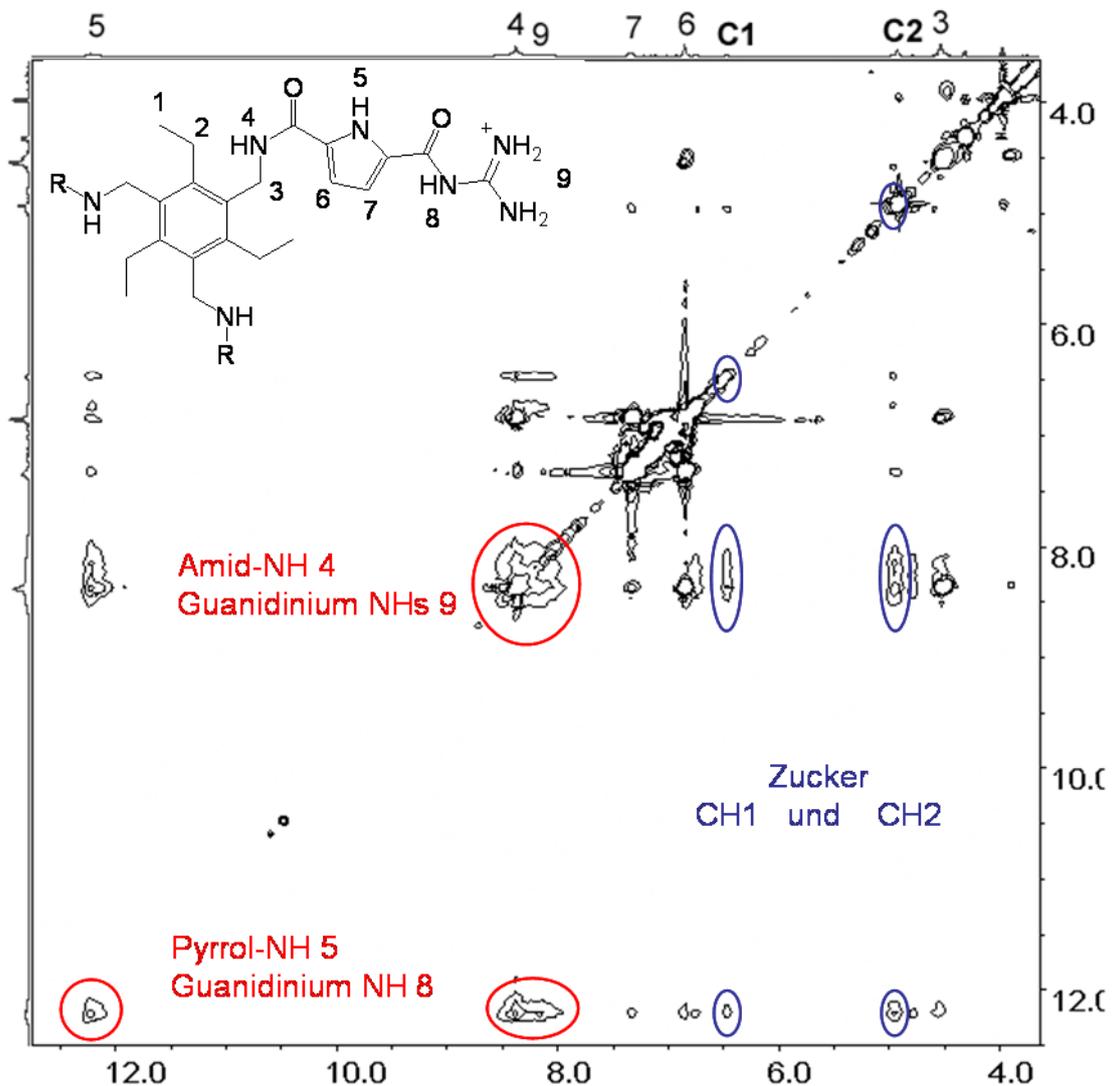


Abb. 4.55: Ausschnitt des NOE-Spektrums von Rezeptor **8** und Glucuronsäure **11** (1:1 Mischung mit $c = 20 \text{ mM}$ in DMSO bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Die intramolekularen NOE Kontakte des Rezeptors sind mit blauen Kreisen die intermolekularen Kontakte mit der Glucuronsäure mit roten Kreisen gekennzeichnet.

In diesem Kapitel konnte somit bestimmt werden, dass der Rezeptor **8** Uronsäuren mit guten Bindungskonstanten in wässrigen Medien erkennen kann. Dabei zeigt der **8** eine Selektivität um den Faktor 2 für die Galacturonsäure gegenüber der Glucuronsäure, obwohl diese sich nur um die Stellung einer Hydroxyfunktion unterscheiden. Mithilfe von Molecular Modeling Rechnungen konnten mögliche Gründe für die guten Bindungskonstante und die Selektivität des Rezeptors hergeleitet werden.

Im nächsten Kapitel werden nun die Bindungsstudien von Rezeptor **8** mit den Glucophosphaten vorgestellt.

4.3.2 Glucophosphate

Die Glucophosphate (siehe Abb. 4.50) wurden, genau wie die Uronsäuren, nicht nur als Modellsysteme für Zucker als Substrate ausgewählt, sondern auch weil sie eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen spielen. Zum Beispiel sind Galactose-1- und Glucose-1-Phosphat an der Glykolyse beteiligt, d.h. dem Aufbau und Abbau von Zuckerreserven.^[13]

Bei der Komplexierung von Phosphaten durch Acylguanidin-Rezeptoren wie **8** muss allerdings darauf geachtet werden, dass beide Substanzklassen ungefähr gleiche pK_S -Werte aufweisen. Deswegen wurde, bevor die ersten Bindungsstudien durchgeführt wurden, zunächst ein pH-Profil des Rezeptors **8** aufgenommen (siehe Abb. 4.56) und mit den Literaturdaten der Glucophosphate verglichen (siehe Tabelle 4.3).

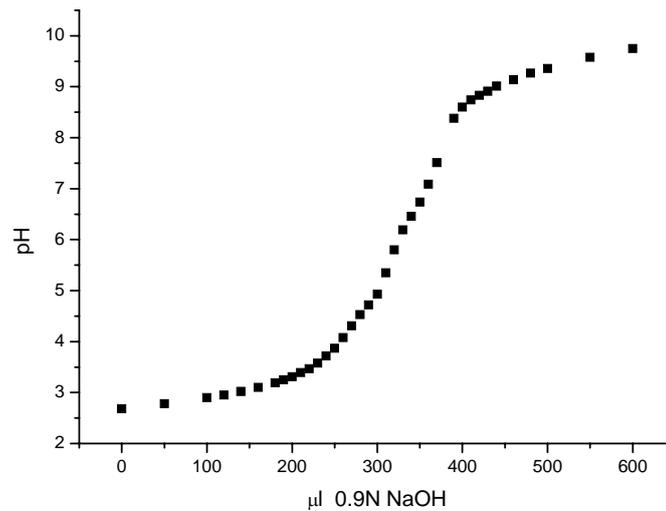


Abb. 4.56: pH-Titration des Rezeptors **8** (0.5 mM) in 10 % DMSO/Wasser.

Tabelle 4.3: pK_S -Werte verschiedener Glucophosphate.^[102,103]

| | Glucose-1-P | Galactose-1-P | Mannose-1-P | Methyl-P |
|--------|-------------|---------------|-------------|----------|
| pK_S | 6.26 | 6.5 | - | 6.7 |

Allerdings konnten bei der pH-Titration des Rezeptors keine genauen pK_S Werte der einzelnen Protonierungsstufen bestimmt werden, da sich diese gegenseitig überlagerten. Man sieht, dass alle drei pK_S Werte im Bereich zwischen ca. 5 und 8 liegen müssen. Der erste pK_S Wert kann also ungefähr auf $pK_S \geq 5$ abgeschätzt werden. Damit liegen der zweite und dritte pK_S -Wert des Rezeptors möglicherweise im gleichen Bereich wie die Phosphate, die pK_S -Werte von 6.2 - 6.7 aufweisen. Bei ungepuffertem Medien wird also höchstwahrscheinlich ebenfalls eine Deprotonierungsreaktion bei der Komplexierung der Phosphate durch Rezeptor **8** auftreten.

Diese Vermutungen konnten mit NMR-Bindungsstudien bestätigt werden. Dazu wurden Titrations mit verschiedenen Glucophosphaten und dem Methylphosphat in 10 % DMSO/Wasser durchgeführt. In Abb. 4.57 sind die Titrations vom Rezeptor **8** mit Galactose-1-Phosphat **15** und Glucose-1-Phosphat **13**, sowie die Titration mit Methylphosphat **16** abgebildet. Alle Bindungsisothermen zeigen einen sigmoiden Kurvenverlauf, der sowohl auf einen kooperativen Bindungsmodus mit

einer Stöchiometrie größer als 1:1, als auch auf eine Überlagerung von Komplexierung und Protonierungsreaktion hindeuten kann.

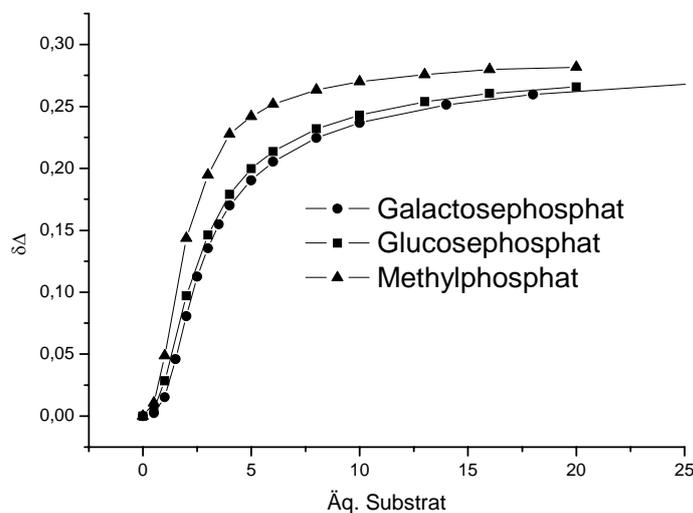


Abb. 4.57: NMR-Titrations des Rezeptors **8** (0.5 mM) mit Methylphosphat **16**, Galactosephosphat **15** und Glucosephosphat **13** (alle 10 mM) in 10 % DMSO/Wasser. Die experimentellen Daten von Methylphosphat (Rezeptor-Pyrrol-CH, ▲), Galactosephosphat (Rezeptor-Pyrrol-CH, ●) und Glucosephosphat (Rezeptor-Pyrrol-CH, ■) sind durch einen gleitenden Durchschnitt verbunden.

Deswegen wurden zur Überprüfung der Stöchiometrie für das einfache Phosphat **16** und Glucose-1-Phosphat **13** Job Plots in 10 % DMSO/Wasser durchgeführt (siehe Abb. 4.58). Der Job Plot der Glucose-Signale zeigte dabei einen sauberen 2:1 Komplex, während die Auswertung der Rezeptor-Signale keine eindeutige Stöchiometrie lieferte. Dies deutet wiederum auf eine Protonierungsreaktion hin, da bei den Phosphaten zwei einzelne Moleküle mit dem gleichen pK_S -Wert protoniert werden, während sich die beiden Deprotonierungsstufen des Rezeptors voneinander unterscheiden und so den unsymmetrischen Verlauf des Job Plots der Rezeptor-Signale erklären könnten. Außerdem würde dies auch den sigmoiden Verlauf der Bindungsisotherme der Rezeptor-Signale erklären (Abb. 4.57), da es sich hier um die Änderung der chemischen Verschiebung hervorgerufen durch zwei Deprotonierungsreaktionen mit verschiedenen pK_S -Werten handeln könnte (mit oder ohne einer möglichen Überlagerung mit einer Komplexierung).

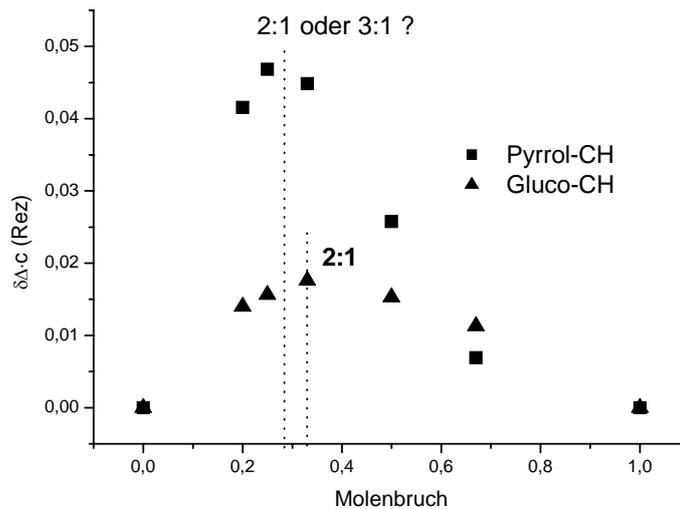


Abb. 4.58: Job Plot von Rezeptor **8** (0.5 mM) und Glucosephosphat **13** (0.5 mM) in 10 % DMSO/Wasser.

Zur Bestätigung, ob es sich bei den NMR-Bindungsstudien um eine reine Deprotonierungsreaktion oder um eine Überlagerung dieser mit einer Komplexierung handelte, wurde ein einfacher Versuch durchgeführt, der schon in Kapitel 3 vorgestellt wurde.^[81] Dazu wurde eine 1:1 Mischung von Rezeptor und Substrat sukzessive verdünnt und die Änderungen der chemischen Verschiebungen beobachtet. Die Ergebnisse dieses Versuches deuteten daraufhin, dass sowohl eine Protonierungsreaktion als auch eine Komplexierung stattfindet. Aufgrund der Überlagerung dieser beiden Prozesse konnte so keine Bindungskonstante für die Komplexierung der Phosphate durch Rezeptor **8** mit NMR-Bindungsstudien bestimmt werden.

Deswegen wurden weitere Bindungsstudien mit UV-Spektroskopie in gepuffertem Medien durchgeführt, um Protonierungsreaktionen vermeiden zu können. Um hier eine klare Protonierung des Rezeptors und vor allem eine eindeutige Protonierung der Zuckerphosphate gewährleisten zu können, wurden die Titrations bei einem pH-Wert von pH = 4 durchgeführt. Bei diesem pH-Wert sollte der Rezeptor **8** vollständig protoniert und die Phosphate als Monoanionen vorliegen.

Die Titrations wurden diesmal bei etwas höheren Konzentrationen durchgeführt als zuvor bei den Polycarboxylaten, aus welchem Grund 10 % DMSO zur besseren Löslichkeit hinzugefügt wurden. Als Puffer wurde Acetat gewählt, das zwar auch kompetitiv für den Rezeptor ist, aber bei pH = 4 ist die Auswahl an Puffern, die nicht kompetitiv sind, sehr klein. Die Titrations wurden also in

10 % DMSO/Wasser (4 mM Acetatpuffer) mit einer Rezeptorkonzentration von $c = 2 \cdot 10^{-5}$ M und Phosphat-Stammlösungen von $c = 2 \cdot 10^{-4}$ M durchgeführt. In Abb. 4.59 ist die Titration von Rezeptor **8** mit Glucosephosphat **13** bzw. mit dem Monomethylester **16** gezeigt. Zur Bestätigung der Stöchiometrie wurden exemplarisch für Glucose-1-Phosphat und den Monomethylester Job Plots durchgeführt. Diese zeigten (siehe Abb. 4.60) eine klare 1:1 Stöchiometrie. Glucose-1-Phosphat bindet den Rezeptor **8** mit $K_{\text{Ass}} = 26000 \text{ M}^{-1}$ um den Faktor 2 besser als der Monomethylester mit $K_{\text{Ass}} = 12000 \text{ M}^{-1}$. Die Ergebnisse der Titrations mit den Phosphaten **13** - **16** sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Dabei werden alle Zuckerphosphate vom Rezeptor **8** ungefähr um den Faktor zwei besser gebunden als der Monomethylester **16**. Das lässt darauf schließen, dass der Zuckerrest einen signifikanten Anteil an der Bindung hat. Interessant ist auch noch, dass Galactose-1-Phosphat mit $K_{\text{Ass}} = 21000 \text{ M}^{-1}$ etwas schwächer gebunden wird als die beiden anderen Zuckerphosphate mit $K_{\text{Ass}} = 26000 \text{ M}^{-1}$. Die Unterschiede in den Bindungskonstanten liegen zwar innerhalb der Fehlergrenze von 20 % bei den optischen Methoden, könnten aber auf eine Selektivität von Rezeptor **8** für die beiden anderen Glucophosphate hindeuten. Dies würde bedeuten, dass die Änderung einer anomeren Hydroxyfunktion des Zuckers – nämlich die C4 Position - zu einer Erhöhung der Bindungskonstante führen könnte.

*Tabelle 4.4: Bindungskonstanten der UV-Titrations von Rezeptor **8** ($2 \cdot 10^{-5}$ M) und den Phosphaten **13-16** ($2 \cdot 10^{-4}$ M) in 10 % DMSO/Wasser mit Acetatpuffer (pH = 4; 4 mM). Die Bindungskonstanten wurden nach einem 1:1 Modell bestimmt.*

| | Glucose-1- Phosphat 13 | Galactose-1- Phosphat 15 | Mannose-1- Phosphat 14 | Methyl- Phosphat 16 |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| $K_{\text{Ass}} [\text{M}^{-1}]$ | 26000 | 21000 | 26000 | 12000 |

4 Durchführung und Diskussion

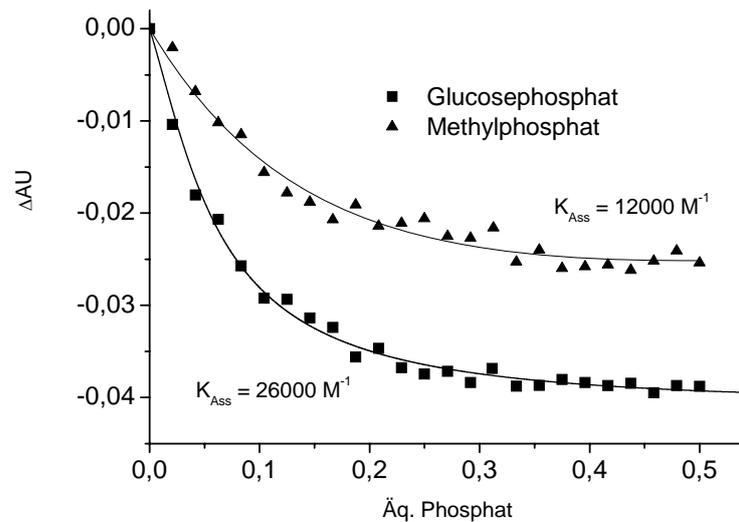


Abb. 4.59: Änderungen der UV-Absorption des Rezeptors **8** ($2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) bei $\lambda = 300 \text{ nm}$ von den Titrations mit den Phosphaten **13** und **16** (beide $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) nach Abzug der Verdünnung in 10 % DMSO/Wasser (4 mM Acetatpuffer, pH = 4). Die schwarzen Linien zeigen die berechneten Kurvenanpassungen an die experimentellen Daten von Glucosephosphat (■) und Methylphosphat (▲).

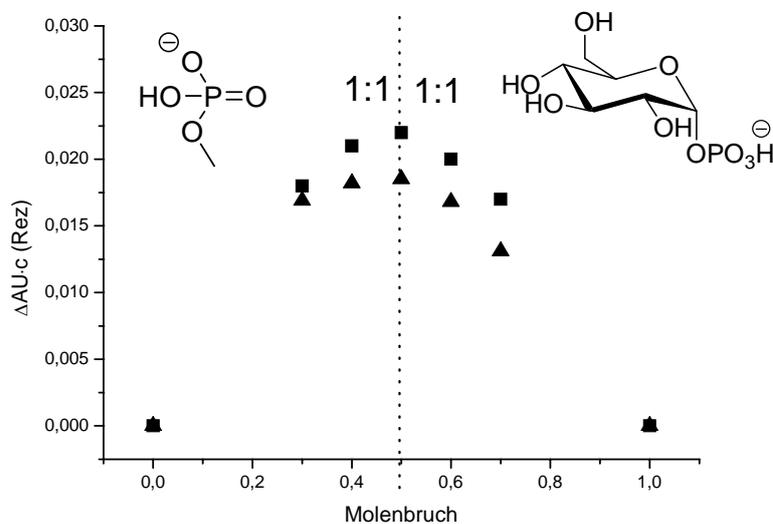


Abb. 4.60: Job Plots von Rezeptor **8** mit Glucosephosphat **13** (■) und Methylphosphat **16** (▲) in Wasser (4 mM Acetatpuffer, pH = 4). Beide Job Plots zeigen eine deutliche 1:1 Stöchiometrie.

Zur Herleitung von möglichen Gründen für die hohen Bindungskonstanten und eine mögliche Selektivität des Rezeptors **8** für bestimmte Glucophosphate wurden Molecular Modeling Studien durchgeführt.^[99] Die Rechnungen zeigen, dass die Phosphatgruppe sowohl bei den Zuckerphosphaten als auch bei dem Monomethylester von zwei der drei kationischen Arme des Rezeptors gebunden

wird (Siehe Abb. 4.61). Die zwei Guanidinium-Funktionen formen jeweils eine zweizählige Ionenbindung mit den Oxoanionen des Phosphats, wie es für eine Komplexierung der Guanidine von Oxoanionen erwartet wird. Der dritte Arm des Rezeptors bildet Wasserstoffbrücken mit den Hydroxy-Gruppen an Position C3, C4 und C6, wobei zur C3 Position neutrale und zur C4 und C6 Position ionische Wasserstoffbrücken aufgebaut werden. Ähnliche Wasserstoffbrücken zwischen Guanidinen, in diesem Fall der Aminosäure Arginin, das „natürliche Guanidin“, und Hydroxy-Funktionen von Zuckern können auch in der Natur beobachtet werden. Arginin spielt zum Beispiel in Zucker bindenden Proteinen sehr oft eine wichtige Rolle.^[32,33] Der dritte Bindungsarm des Rezeptors hat allerdings keinen großen Anteil an der Komplexierung des Methylesters. Aufgrund der räumlichen Enge in der Bindungstasche und der sterischen Hinderung durch die Methylgruppe, kann der dritte Bindungsarm nur eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zum Phosphat aufbauen. Der Unterschied in den Bindungskonstanten zwischen den Zuckerphosphaten und dem Methylester kann also nur über die zusätzlichen Wasserstoffbrücken zum Zuckergerüst erklärt werden.

Die gerechneten Strukturen geben aber nicht nur eine Erklärung für die bessere Komplexierung von Zuckerphosphaten gegenüber dem Monomethylester, sondern liefern auch eine mögliche Erklärung für die schlechtere Bindungskonstante von Galactosephosphat. Die Hydroxyfunktion an Position C2 ist nicht an der Bindung des Zuckers beteiligt. Deswegen sollte bei der Komplexierung von Mannose und Glucose, die sich durch diese Position unterscheiden, kein Unterschied bestehen, wie auch bei den UV-Titrationen beobachtet werden konnte. Die Hydroxyfunktion an Position C4 wird allerdings durch den dritten Arm des Rezeptors gebunden. Die Änderung der Konfiguration an dieser Stelle, wie es bei der Galactose der Fall ist, könnte also einen Einfluss auf die Bindungskonstante haben, wie auch experimentell beobachtet werden konnte. Diese zusätzlichen Wasserstoffbrücken zu den Hydroxy-Funktionen erklären die stärkeren Bindungen der negativen Zucker im Gegensatz zu einfachem Acetat oder Phosphat. Auch wenn die zusätzlichen Wasserstoffbrücken in wässrigen Medien sehr klein sind, vor allem weil die Bindungsstellen dem Lösemittel gut zugänglich sind, wie man in Abb. 4.61 gut erkennt, führen die Wasserstoffbrücken in Verbindung mit den ionischen Wechselwirkungen zu einer signifikanten Steigerung der Komplexstabilität.

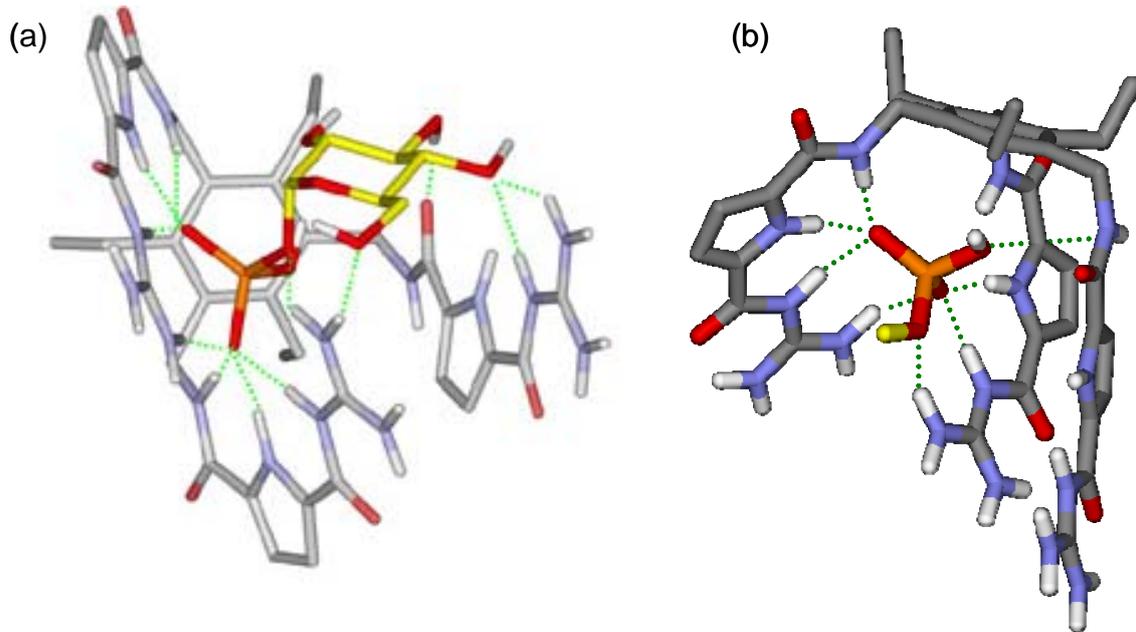


Abb. 4.61: Berechnete energieminierte Strukturen des Komplexes von Rezeptor **8** (grau) und (a) Glucose-1-Phosphat **13** (gelb/orange) und (b) Monomethylphosphat **16** (gelb/orange). Unpolare Wasserstoffatome wurden zur besseren Übersicht entfernt. Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat sind mit grün gepunkteten Linien gekennzeichnet.

Mit weiteren UV-Bindungsstudien sollte nun noch herausgefunden werden, ob der Rezeptor **8** auch bei physiologischem pH, d.h. $\text{pH} = 7.4$, die verschiedenen Zuckerphosphate erkennen kann. Bei diesem pH-Wert kann sowohl der Rezeptor als auch die verschiedenen Phosphate als Gemisch unterschiedlich protonierter Species vorliegen. Da aber in gepufferten Medien (HEPES Puffer) titriert wurde, sollten Protonierungsreaktion nicht auftreten können.

Allerdings konnten bei hohen Wasseranteilen (10 % DMSO/Wasser analog zu den Titrations bei pH 4) keine Bindungskonstanten bestimmt werden. Dies ist auch leicht zu erklären, da der Rezeptor bei diesem pH-Wert größtenteils nur noch als Monokation vorliegt. Da die ionischen Wechselwirkungen, wie schon vorher hergeleitet, den größten Anteil der Komplexierung ausmachen, fehlen hier die zusätzlichen Wechselwirkungen für eine ausreichende Komplexierung in hohen Wasseranteilen. Allerdings sollten diese dadurch ein wenig ausgeglichen werden, dass die Phosphate bei diesem pH-Wert größtenteils als Dianion vorliegen und deswegen weitere ionische Wechselwirkungen ausbauen können. Die Titrations wurden in 70 % DMSO/Wasser mit 10 mM HEPES Puffer durchgeführt. Die Titration des Rezeptors **8** mit Glucose-1-Phosphat **13** ist in Abb. 4.62 gezeigt. Die Ergebnisse aller Titration sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Bindungskonstanten der UV-Titration von Rezeptor **8** ($2.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) und den Phosphaten **13-16** ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) in 70 % DMSO/Wasser mit HEPES Puffer (pH = 7.4; 10 mM). Die Bindungskonstanten wurden nach einem 1:1 Modell bestimmt.

| | Glucose-1- Phosphat 13 | Galactose-1- Phosphat 15 | Mannose-1- Phosphat 14 | Methyl- Phosphat 16 |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| $K_{\text{Ass}} [\text{M}^{-1}]$ | 13000 | 12000 | 14000 | 5000 |

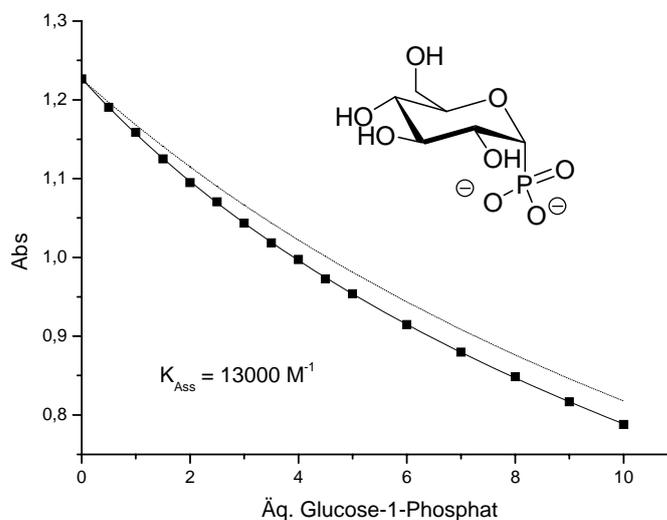


Abb. 4.62: Bindungsisotherme des Rezeptors **8** ($2.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) bei $\lambda = 300 \text{ nm}$ von der UV-Titration mit Glucosephosphat **13** ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) in 70 % DMSO/Wasser (10 mM HEPES Puffer, pH = 7.4). Die schwarze Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung an die experimentellen Daten (■), während die gepunktete Linie die erwartete Änderung der Absorption durch die Verdünnung des Rezeptors bei der Titration beschreibt.

Die Zuckerphosphate binden, genau wie bei pH = 4 zuvor, den Rezeptor mit Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} = 12000 - 14000 \text{ M}^{-1}$ um mindestens den Faktor zwei besser als das einfache Phosphat **16** mit $K_{\text{Ass}} = 5000 \text{ M}^{-1}$. Die schlechteren Bindungskonstanten lassen sich im Vergleich zu den Messungen bei pH = 4 durch den geringeren Protonierungsgrad des Rezeptors erklären, der bei diesem pH-Wert größtenteils als Monokation vorliegen sollte. Trotzdem bindet der Rezeptor die Phosphate immer noch mit guten Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} \sim 10000 \text{ M}^{-1}$, was wiederum bestätigt, dass die Komplexstärke nicht nur durch die ionischen Wechselwirkungen, die bei diesem pH-Wert aufgrund der geringeren Protonierung des Rezeptors im Vergleich zum Triskation an Stärke verlieren sollten, sondern

auch durch zusätzliche ionische und neutrale Wasserstoffbrücken zustande kommt.

Somit konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass der Rezeptor eine Komplexierung von Zuckerphosphaten in wässrigen Medien bei verschiedenen pH-Werten gewährleisten kann. Dabei bindet der Rezeptor **8** Zuckerphosphate mindestens um den Faktor 2 besser als das einfache Methylphosphat **16**. Dies lässt darauf schließen, dass zusätzliche Wechselwirkungen zum Zuckergerüst ausgebildet werden, die die Komplexierung des Phosphats weiter stabilisieren. Diese These konnte mit Molecular Modeling Rechnungen unterstützt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollten noch weitere multivalente Rezeptoren auf Basis von Guanidiniocarbonylpyrrolen hergestellt werden, die mit einem Linker wie eine Aminosäure verlängert werden sollten, um zusätzliche Wasserstoffbrückendungsmotive einzuführen. Mit diesen könnte dann vielleicht eine Erkennung von reinen Zuckern wie Glucose in wässrigen Medien möglich sein. Die Synthesen der Rezeptoren werden im nächsten Kapitel vorgestellt.

4.4 Synthese der Rezeptoren 17 und 18

Analog zur Synthese des Rezeptors **8** sollten in diesem Teil der Arbeit zwei Rezeptoren hergestellt werden, die durch einen Linker erweitert werden sollten. Hierzu wurden die Aminosäuren Glycin und Serin gewählt, die die Bindungskavität des Rezeptors vergrößern sollten. Außerdem könnten die Bindungskonstanten für die Gäste durch die zusätzlichen Möglichkeiten (die zusätzlich Amidbindungen und die Hydroxygruppe des Serins) zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen erhöht werden. Diese beiden Rezeptoren **17** und **18** sollen aus 4 Modulen aufgebaut werden:

1. Triamin-Templat **6**
2. Spacer (Ser **20** oder Gly **19**)
3. Pyrrol-Baustein **33**
4. Guanidin-Baustein **34**

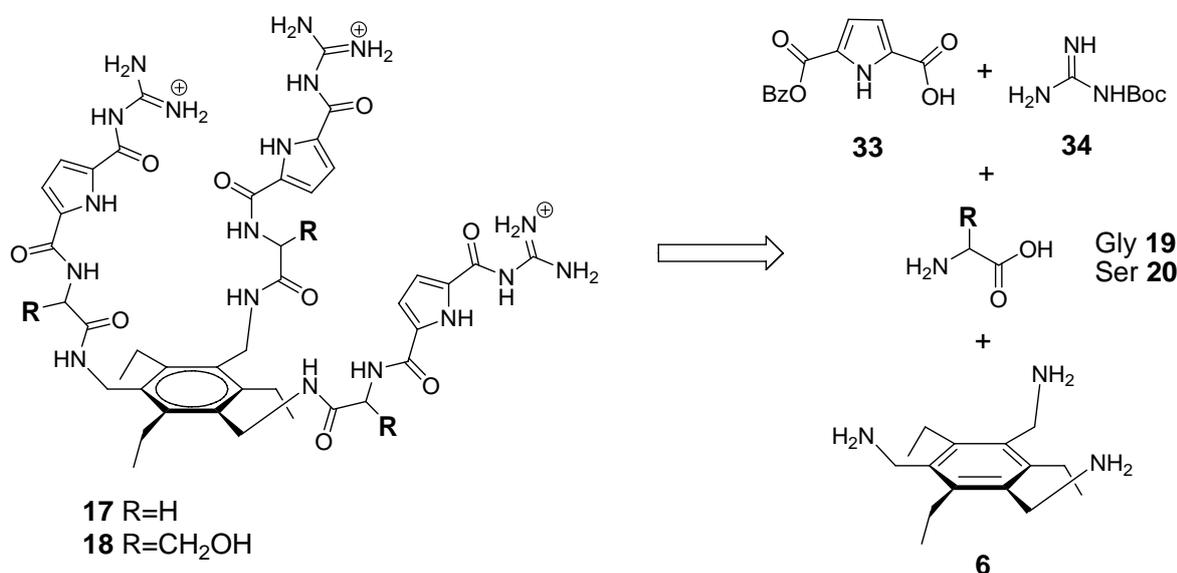


Abb. 4.63: Retrosynthese der beiden multivalenten Rezeptoren **17** und **18** mit Serin- bzw. Glycin-Spacer.

Analog zur Synthese des Rezeptors **8** wurden zwei Routen zur Darstellung der beiden Rezeptoren **17** und **18** ausgewählt. Bei Route 1 sollte erst der Pyrrol-Baustein mit Aminosäure-Baustein an das Templat **8** gekuppelt werden und zuletzt das säurelabile Guanidin **34** eingefügt werden. Bei Route 2 sollten die

Rezeptoren schrittweise ausgehend vom Templat **6** aufgebaut werden. Die Versuche zu den Synthesen werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.4.1 Synthese der Rezeptoren **17** und **18** (Route 1)

Nach Route 1 sollte zunächst der Pyrrol-Baustein an die Aminosäure-Einheit gekuppelt werden. Da das Pyrrol als Benzylester vorliegt, musste für die Aminosäure eine orthogonale Schutzgruppe gewählt werden. Deswegen wurden als erstes die Methylester der beiden Aminosäuren Serin und Glycin hergestellt, die neben dem Pyrrol-Benzylester selektiv basisch entschützt werden können. Diese Selektivität wird dadurch hervorgerufen, dass Ester von Pyrrolcarbonsäuren viel basenstabiler sind als z.B. Benzylester von Aminosäuren, die unter basischen Bedingungen auch entschützt werden können.^[94]

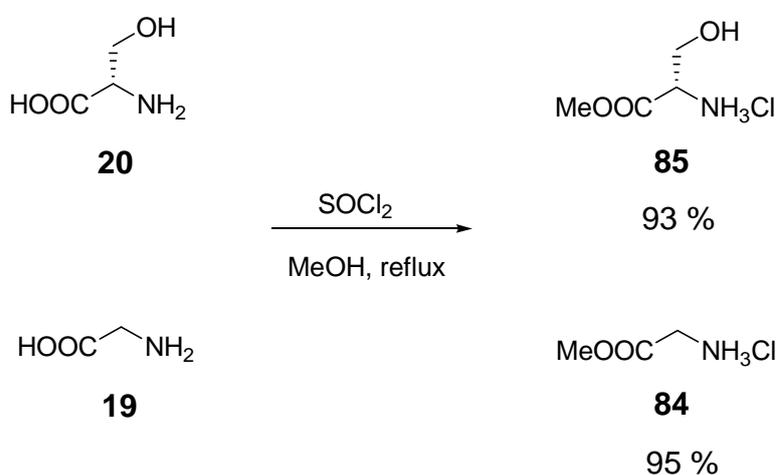


Abb. 4.64: Synthese der Methylester **85** und **84** von Serin und Glycin über das Säurechlorid.

So wurden die Aminosäuren mit Thionylchlorid in Methanol umgesetzt und man erhielt die Methylester mit Ausbeuten von 93 % für Serin und 95 % für Glycin.^[104] Diese sollten dann im nächsten Schritt mit der Pyrrolcarbonsäure **33** gekuppelt werden. Dazu wurde das Säurechlorid der Pyrrolcarbonsäure **79** mit Oxalylchlorid und katalytischen Mengen DMF in THF hergestellt. Dieses wurde dann weiter in

THF und TEA mit den beiden Aminosäure umgesetzt. Allerdings konnten die Produkte **94** und **95** nur mit Ausbeuten von 40 % für Glycin und 42 % für Serin erhalten werden. Da die beiden Edukte nicht gut in THF löslich waren, wurde angenommen, dass vielleicht Löslichkeitsprobleme ausschlaggebend für die schlechten Ausbeuten sein könnten. Aus diesem Grund wurden die Reaktionen noch einmal in DMF durchgeführt. Durch die Änderung des Lösemittels konnten so die Ausbeuten auf 69 % für Serin und 71 % für Glycin gesteigert werden.

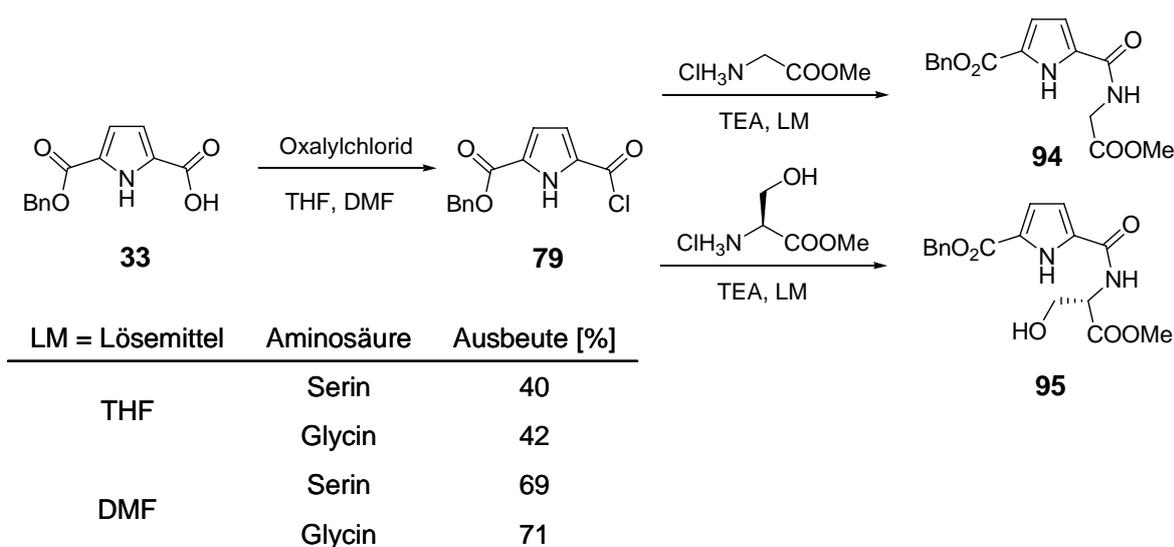


Abb. 4.65: Syntheschema der Darstellung der Methylester **94** und **95** über das Säurechlorid **79** des Benzylesters in verschiedenen Lösemitteln (LM).

Da die Ausbeuten mit ca. 70 % für einfache Amid-Kupplungen nicht zufrieden stellend waren, wurden die Umsetzungen noch einmal mit dem Kupplungsreagenz PyBOP durchgeführt. Dafür wurden die Methylester der Aminosäuren mit PyBOP und der Pyrrolcarbonsäure **33** in DMF und NMM umgesetzt. Die Ausbeuten konnten so mit 91 % für Glycin und 86 % für Serin noch einmal um mehr als 15 % gesteigert werden.

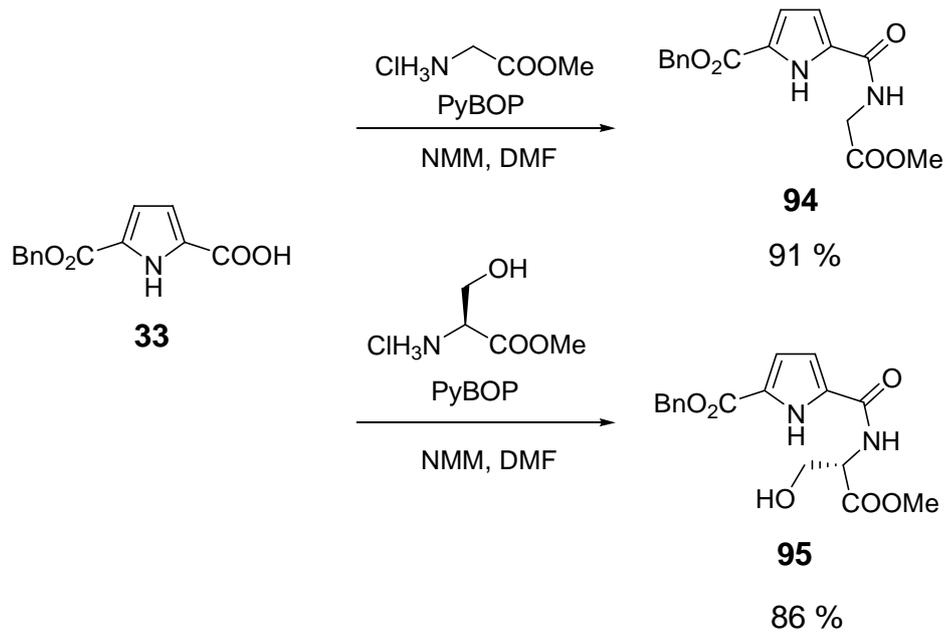


Abb. 4.66: Syntheschema der Darstellung der Methylester **94** und **95** mit PyBOP.

Die Methylester **94** und **95** wurden nun im nächsten Schritt mit Lithiumhydroxid in THF/Wasser-Mischungen entschützt und man erhielt die Carbonsäuren mit Ausbeuten von 83 % für Serin und 79 % für Glycin.

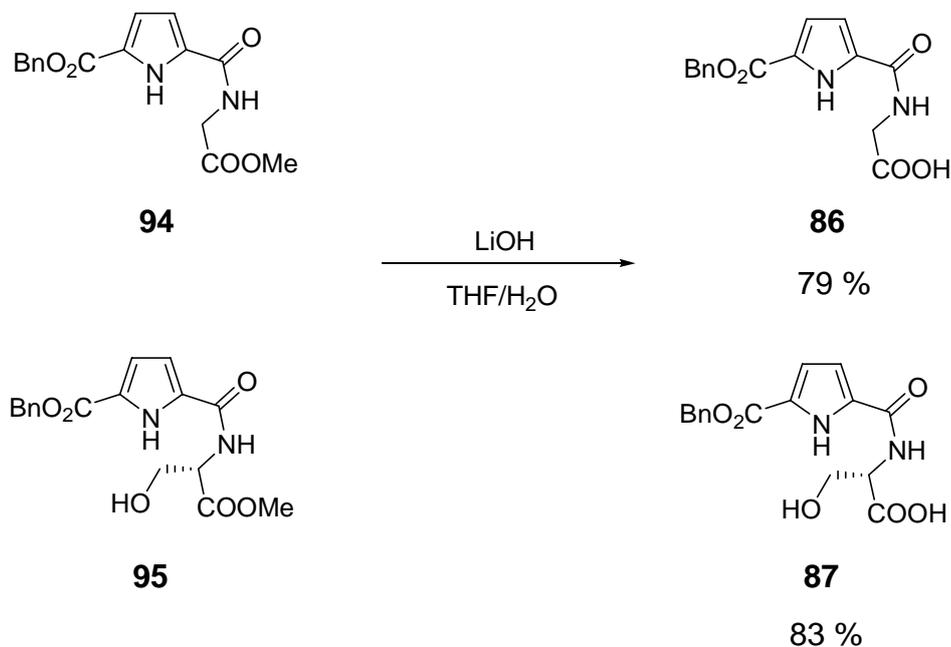


Abb. 4.67: Entschützung der Methylester **86** und **87** mit Lithiumhydroxid.

Mit diesen beiden Zwischenstufen **86** und **87** sollten nun die ersten Kupplungsversuche mit dem Triamin-Templet **6** durchgeführt werden. Zuerst wurde versucht,

die Carbonsäure **86** über das entsprechende Säurechlorid an das Triamin-Templat **6** zu koppeln. Dabei konnte das gewünschte Produkt **97** nicht isoliert werden.

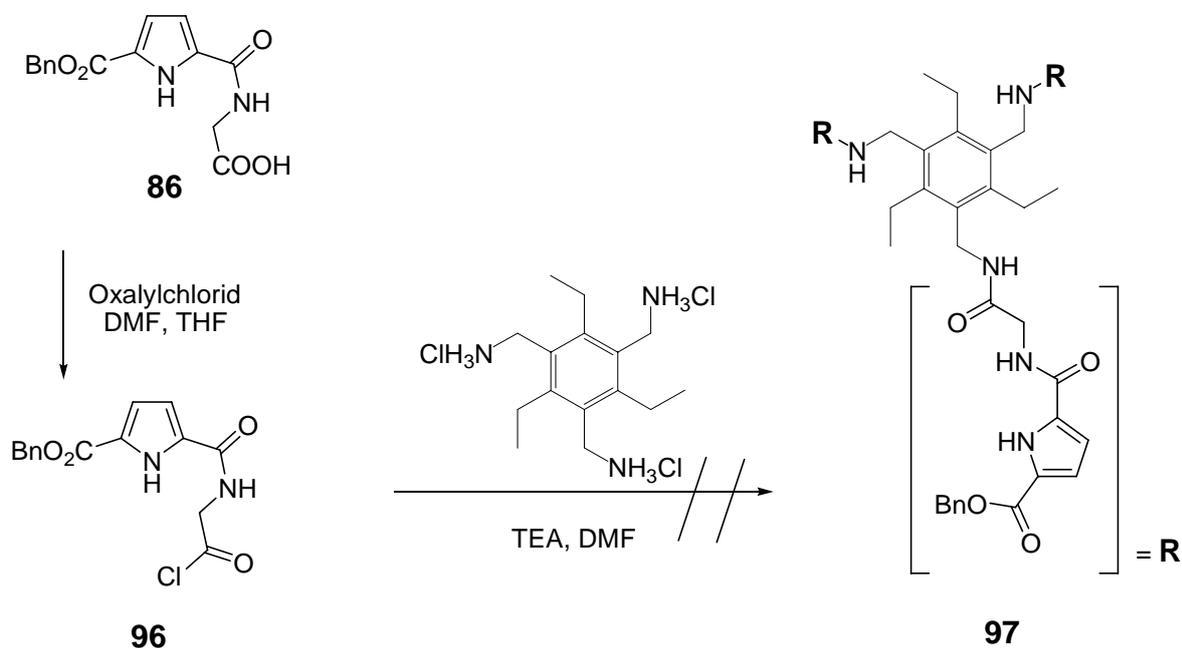


Abb. 4.68: Versuch zur Synthese der Zwischenstufe **97** über das Säurechlorid **96**.

Stattdessen konnte als Hauptprodukt nur das Oxazolone **99** erhalten werden, dass durch eine Cyclisierung des Säurechlorids entsteht. Cyclisierungen dieses Typs konnten auch in der Literatur gefunden werden.^[105,106] Zunächst entsteht dabei das Oxazolone **98**, welches dann mit DMF über eine Aldol-Reaktion und anschließende Kondensation zum Oxazolone umgesetzt wird. Das NMR-Spektrum des Oxazolons **99** ist Abb. 4.69 gezeigt. Die Struktur konnte ebenfalls noch über Massenspektrometrie bestätigt werden.

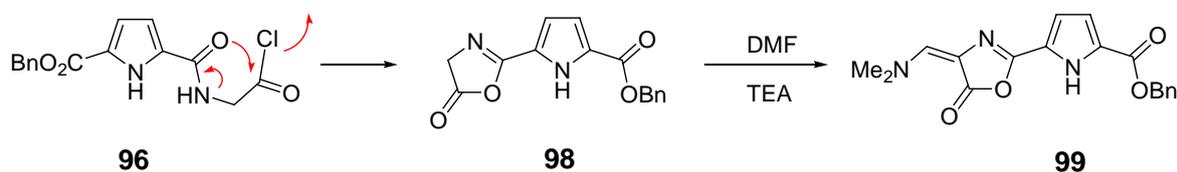


Abb. 4.69: Cyclisierung des Säurechlorids **96** zum Oxazolone **98** und weitere Reaktion über eine Aldol-Reaktion und -kondensation zum Oxazolone **99**.

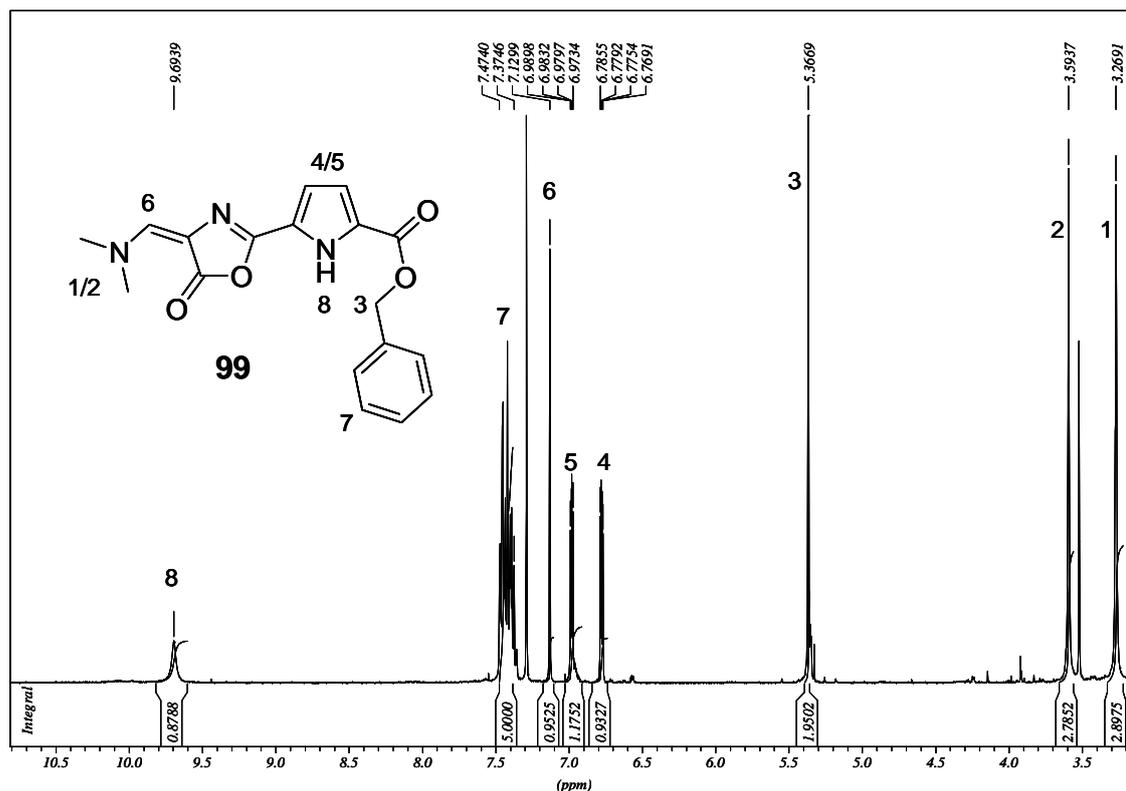


Abb. 4.70: NMR-Spektrum (CDCl₃) und Zuordnung der Signale des Oxazolons **99**.

Dass bevorzugt das Oxazolone gebildet wird, obwohl die Amine des Templats eigentlich eine höhere Nucleophilie aufweisen als der Sauerstoff, lässt sich deswegen nur dadurch erklären, dass Triethylamin keine ausreichend starke Base ist, um das Ammonium-Salz des Templats zu deprotonieren. Ähnliche Erfahrungen konnten auch schon bei der Synthese des einfachen Rezeptors **8** gemacht werden. Hier war der Einsatz von NaOH als Base nötig, um das gewünschte Produkt darstellen zu können. Deswegen wurden die Reaktionen noch einmal unter den Bedingungen durchgeführt, die zuvor schon bei der Synthese des Rezeptors **8** zum Erfolg geführt hatten. Dazu wurde das Triamin-Templat **6** erst mit NaOH in DMF/Wasser (10/1) deprotoniert, bevor die restlichen Edukte hinzugegeben wurden. So konnten tatsächlich die beiden Zwischenprodukte **97** und **100** mit Ausbeuten von 30 % für Glycin und 35 % für Serin erhalten werden.

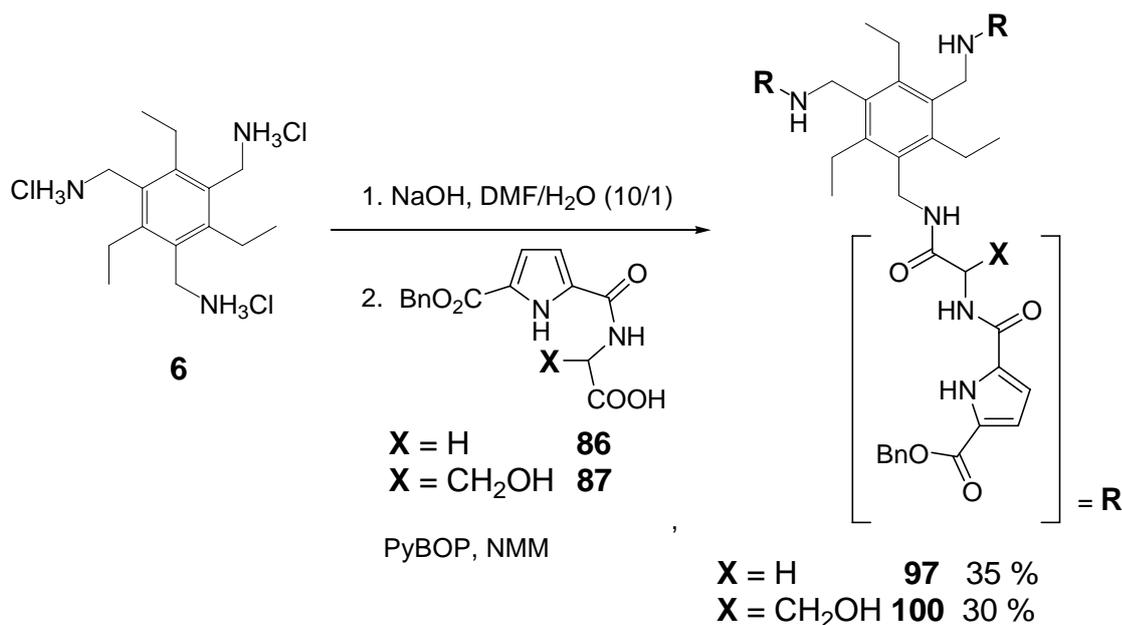


Abb. 4.71: Synthese der Serin- und Glycin-Zwischenstufen **97** und **100**.

Aufgrund der schlechten Ausbeuten bei dieser Reaktion, die wahrscheinlich durch Aufarbeitungsprobleme hervorgerufen wurden, wurde als nächstes versucht, die Rezeptoren **17** und **18** über Route 2 herzustellen.

4.4.2 Synthese der Rezeptoren **17** und **18** (Route 2)

Nach Route 2 sollten die Rezeptoren schrittweise ausgehend vom Templat aufgebaut werden. Deswegen wurde versucht, die Aminosäuren Serin und Glycin an das Templat anzubringen. Hierzu wurden die jeweiligen Boc-geschützten Aminosäuren **90** und **91** verwendet, die kommerziell erwerblich sind. Die Reaktionen wurden mit HCTU in DCM durchgeführt, da unpolare Lösemittel die Bildung der unpolaren Aktivester aus den polaren Carboxylaten bevorzugen sollten. In der Tat konnte die Glycin-Zwischenstufe **101** mit dieser Methode mit einer guten Ausbeute von 72 % erhalten werden. Anscheinend ist die Reaktivität des Triamins in DCM höher als in DMF, da in diesem Fall keine Deprotonierung mit NaOH benötigt wurde und NMM als Base ausreichend war. Dies lässt sich wieder über die Polarität des Lösemittels erklären, da das protonierte Triamin in

DMF besser stabilisiert wird als in dem relativ unpolaren Lösemittel DCM und das Triamin deswegen in DCM größtenteils deprotoniert vorliegen sollte.

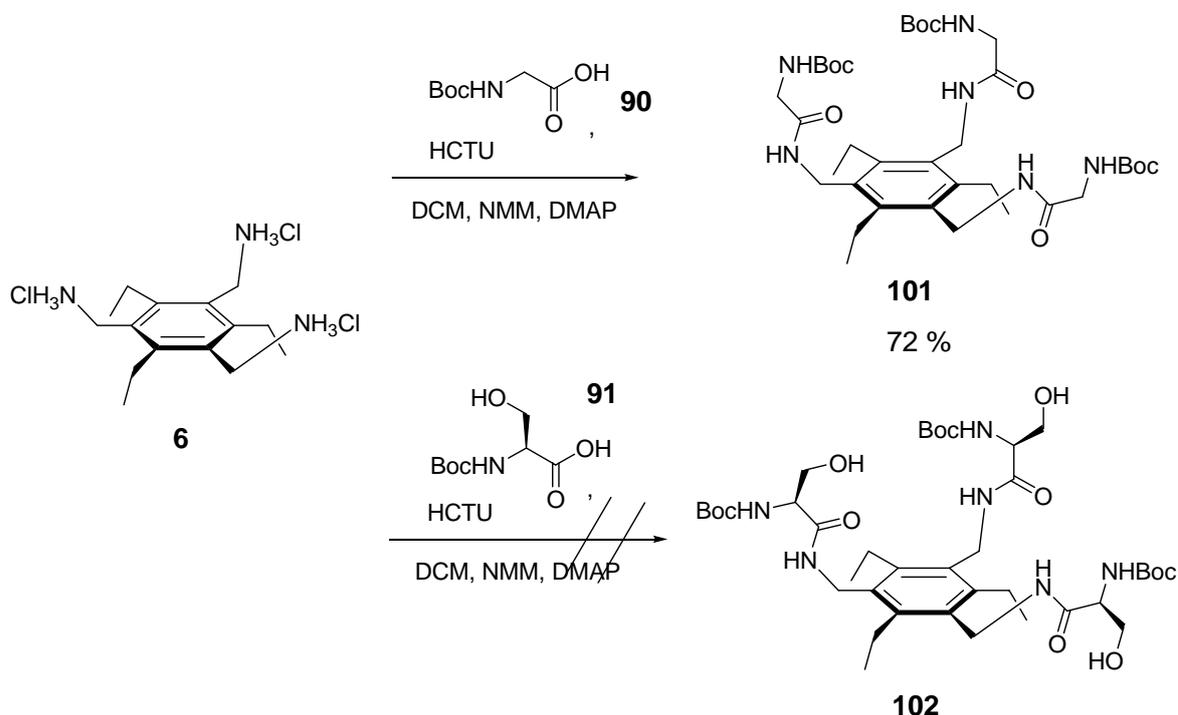


Abb. 4.72: Synthese der geschützten Glycin-Zwischenverbindung **101** und Versuch zur Synthese der analogen Serin-Verbindung **102**.

Allerdings führte die Umsetzung des Templates **6** mit Boc-Serin **91** nicht zum gewünschten Produkt. Dies könnte z.B. an der schlechten Löslichkeit der polareren Aminosäure in DCM liegen. Der Grund könnte aber auch in Aufarbeitungsproblemen liegen, da im Rahmen dieser Arbeit Erfahrungen gesammelt werden konnten, dass Strukturen mit Serin sehr gut in wässrigen Lösemitteln löslich sind und somit beim Extrahieren teilweise in die wässrige Phase übergehen. Außerdem könnte es sein, dass die Produkte bei chromatographischer Reinigung auf Silicagel aufgrund der Affinität zur stationären Phase nicht mehr von der Säule eluiert werden konnten. Deswegen wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Polarität des Serin-Bausteins zu erniedrigen. Eine Möglichkeit ist die Schützung der freien Hydroxygruppe als Silylether.^[94] Deshalb wurde Boc-Serin **91** mit TBDMS-Cl und Imidazol in DMF umgesetzt und man erhielt die TBDMS-geschützte Aminosäure **103** mit einer Ausbeute von 80 %.^[107]

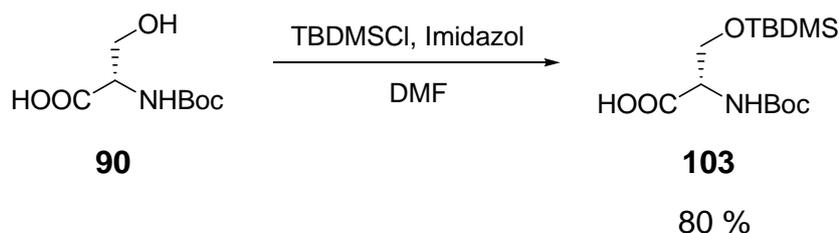


Abb. 4.73: Darstellung von Boc-L-Ser(TBDMS)-OH **103**.

Die Reaktion der TBDMS-geschützten Aminosäure mit dem Templat **6** wurde nun unter den gleichen Bedingungen wie zuvor durchgeführt. Diesmal konnte das gewünschte Produkt **104** mit einer guten Ausbeute von 68 % erhalten werden. Aufgrund der nun sehr unpolaren Verbindung **104** gab es diesmal keine Probleme bei der säulenchromatographischen Reinigung des Produkts.

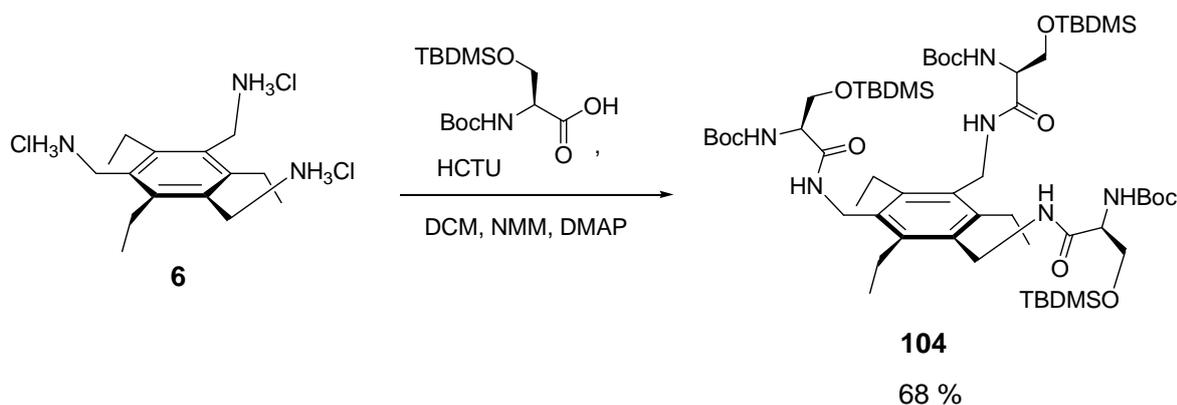


Abb. 4.74: Synthese der doppelt geschützten Serin-Zwischenstufe **104**.

Die beiden Boc-geschützten Zwischenstufen wurde dann im nächsten Schritt entschützt. Dazu wurde der Glycin-Baustein mit TFA in DCM umgesetzt und man erhielt nach Umsalzen des TFA-Salzes das Chlorid Salz **94** mit einer quantitativen Umsetzung. Der Serin-Baustein wurde mit konzentrierter Salsäure in MeOH umgesetzt, wobei nicht nur die Boc- sondern auch die TBDMS-Schutzgruppe entfernt wurde. So erhielt man ebenfalls in quantitativer Ausbeute das Chlorid Salz des Serin-Bausteins **93**.

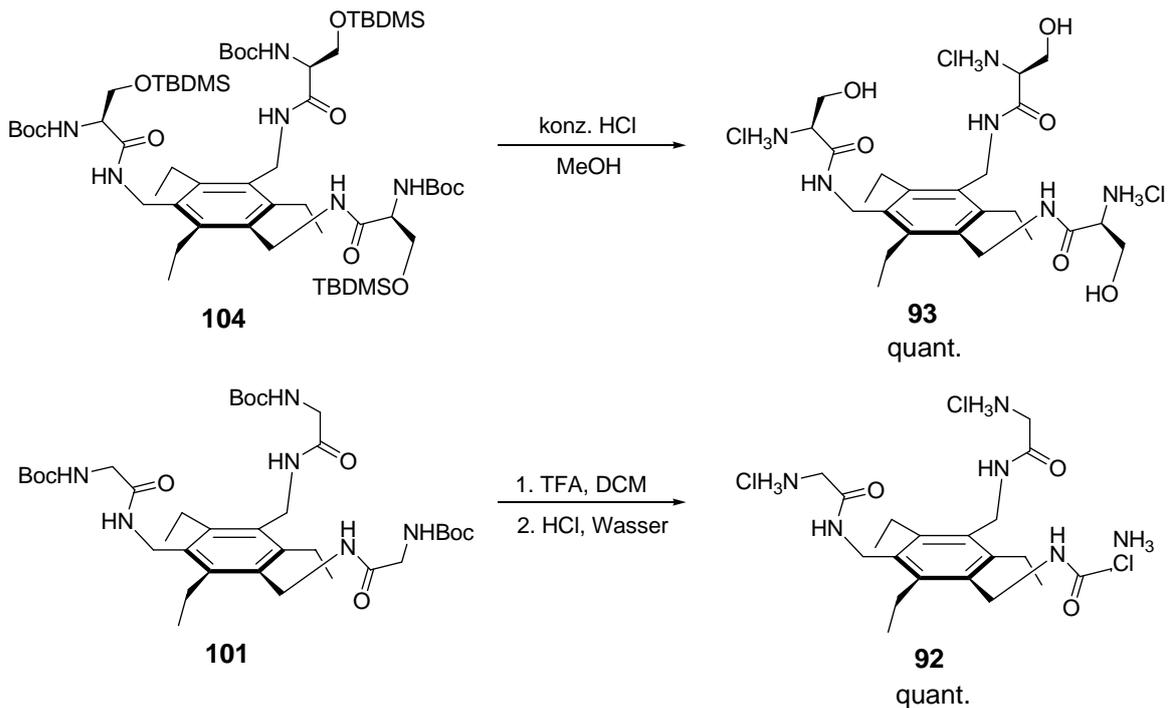


Abb. 4.75: Entschützung der beiden Zwischenstufen **101** und **104**.

Die beiden Triamine **101** und **104** wurden im nächsten Schritt mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Baustein **9** mit PyBOP in DMF und NMM umgesetzt. Da allerdings die säulenchromatographische Reinigung der Rohprodukte nicht zur Isolierung der gewünschten Produkte führte, obwohl das Produkt nach Zugabe von Wasser zu der Reaktionslösung leicht verunreinigt ausgefallen war, wurde dieses nur aus Methanol/Diethylether umgefällt und anschließend direkt weiter umgesetzt. Die beiden leicht verunreinigten, noch Boc-geschützten Zwischenstufen wurden mit TFA in DCM entschützt und anschließen mittels RP-MPLC gereinigt. So erhielt man die beiden Rezeptoren **17** und **18** mit Ausbeuten von 59 % für Glycin und 51 % für Serin. Das NMR-Spektrum des Glycin-Rezeptors **17** ist in Abb. 4.77 gezeigt.

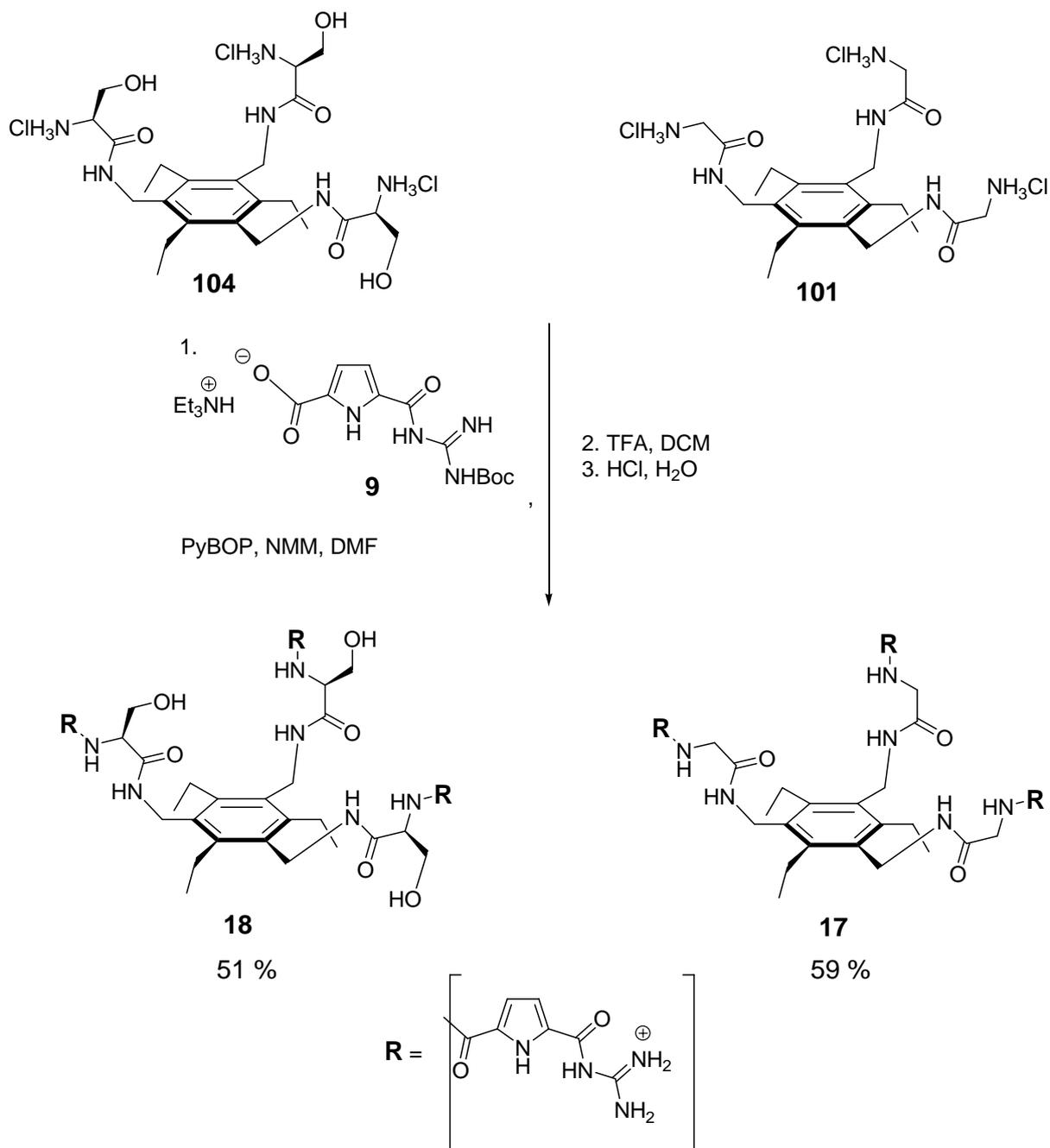


Abb. 4.76: Synthese der beiden Rezeptoren **17** und **18**.

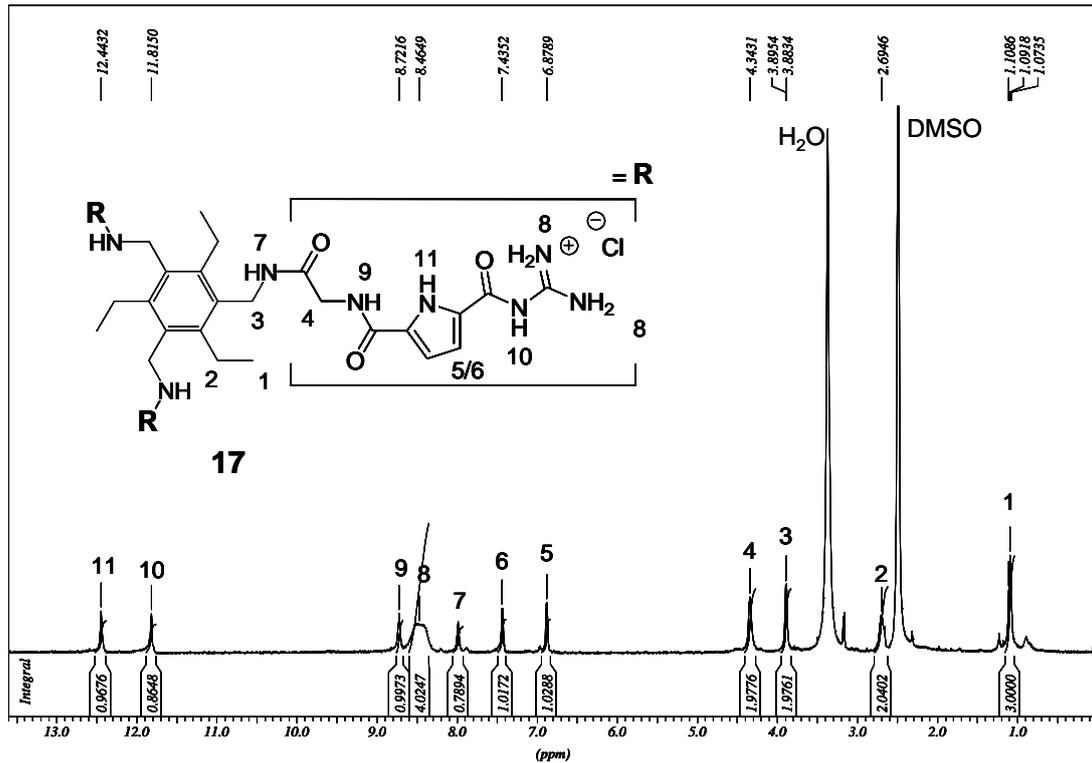


Abb. 4.77: NMR-Spektrum (DMSO-d₆) des Glycin-Rezeptors **17**.

Somit konnten die beiden Rezeptoren **17** und **18** mit Gesamtausbeuten von 42 % und 35 % über 4 Stufen erhalten werden. Mit diesen Rezeptoren sollten als nächstes noch Bindungsstudien durchgeführt werden. Diese werden ausführlich im folgenden Kapitel beschrieben.

4.5 Bindungsstudien mit den multivalenten Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren **17** und **18**

Analog zu den Untersuchungen an Rezeptor **8** wurden nun zunächst exemplarisch für den Rezeptor **18** Bindungsstudien mit verschiedenen Zuckerderivaten durchgeführt. Als erstes wurden die Bindungseigenschaften für die Uronsäuren **11** und **12** untersucht, um zu zeigen welchen Einfluss zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungsmotive und die größere Bindungskavität auf die Komplexierung haben.

Dazu wurden NMR-Bindungsstudien in 70 % DMSO/Wasser durchgeführt. Die Bindungsisotherme der Titration des Rezeptors **18** mit Galacturonsäure ist in Abb. 4.78 dargestellt. Interessanterweise wird die Galacturonsäure mit einer Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 1200 \text{ M}^{-1}$ von Rezeptor **18** schlechter gebunden als von Rezeptor **8** mit $K_{\text{Ass}} = 1550 \text{ M}^{-1}$ (siehe Tabelle 4.6). Die zusätzlichen möglichen Wasserstoffbrücken scheinen also hier nicht zu einer Verbesserung der Bindungskonstante zu führen oder können durch den höheren Entropieverlust des Rezeptors bei der Komplexierung kompensiert werden. Bei der Glucuronsäure dagegen kommt es im Vergleich zu Rezeptor **8** zu einer Erhöhung der Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 480 \text{ M}^{-1}$ auf $K_{\text{Ass}} = 880 \text{ M}^{-1}$. Dabei wird die Selektivität zwischen den beiden Uronsäuren bei Rezeptor **8** mit dem Faktor 4 auf den Faktor 1.5 für **18** gesenkt. Wahrscheinlich spielen hier die höhere Flexibilität und die höhere sterische Beanspruchung des Rezeptors **18** durch den Serin-Linker eine Rolle bei der Komplexierung der verschiedenen Uronsäuren. Es könnte sein, dass durch die sterisch anspruchsvolleren Bindungsarme im Vergleich zu Rezeptor **8** der Rezeptor nicht mehr so vorliegt, dass alle drei Bindungsarme auf einer Seite des Templates fixiert sind. Deswegen könnten die schlechteren Bindungskonstanten trotz der größeren Möglichkeiten zur Ausbildung von H-Brücken durch die Reorganisation des Rezeptors bei der Komplexierung erklärt werden. Ein anderer Grund könnte eine intramolekulare Selbstassoziation des Rezeptors aufgrund von unpolaren oder auch polaren Wechselwirkungen zwischen den Bindungsarmen sein.

Welche Gründe nun ausschlaggebend für die geringere Selektivität des Rezeptors **18** sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden. Weitere Informationen über den Einfluss zusätzlicher H-Brückenmotive und der größeren

Bindungskavität bei der Komplexierung von Zuckern könnten noch die Bindungsstudien mit dem Glycin-Rezeptor **17** liefern. Diese wurden aus Zeitgründen allerdings nicht mehr durchgeführt.

Tabelle 4.6: Bindungskonstanten der NMR-Titrationen von Rezeptor **8** und **18** mit Glucuron- und Galacturonsäure in 70 % DMSO/Wasser.

| | 8 K_{Ass} [M^{-1}] | 18 K_{Ass} [M^{-1}] |
|---------------------------|---|--|
| Galacturonsäure 12 | 1550 | 1200 |
| Glucuronsäure 11 | 480 | 880 |

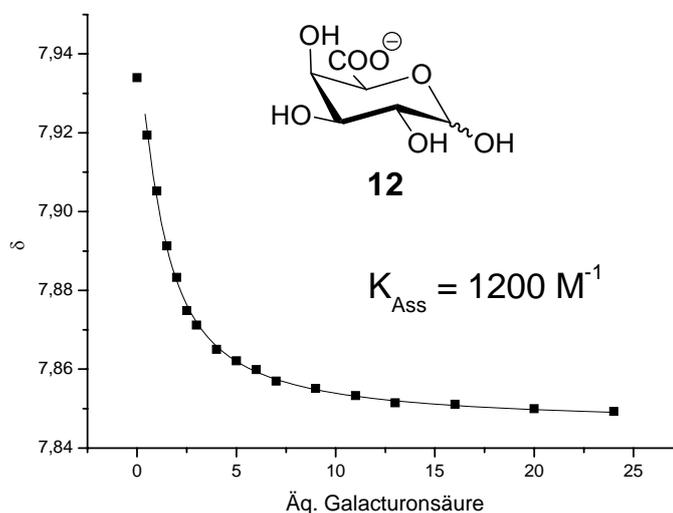


Abb. 4.78: NMR-Titration des Rezeptors **18** (1mM) mit Glucuronsäure **11** (20 mM) in 70 % DMSO/Wasser. Die schwarze Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung mit einem 1:1 Modell an die experimentellen Daten (Rezeptor-Amid-NH, ■).

Um herauszufinden, ob mit Rezeptor **18** eine molekulare Erkennung von Zuckern wie Glucose **105** möglich ist, wurden weitere NMR-Bindungsstudien durchgeführt. Die Bindungsisotherme der Titration von Rezeptor **18** mit Glucose **105** ist in Abb. 4.79 dargestellt. Dazu wurde eine 10 mM Lösung des Rezeptors hergestellt und sukzessive mit einer 2 M Lösung Glucose versetzt. Man erkennt, dass es zu einer deutlichen Verschiebung des Guanidinium-Amid-Signals von 11.9 nach 11.3 bei einer Zugabe von 300 Äq. kommt. Allerdings wird bei dieser Zugabe noch kein Plateau erreicht, was nicht zu einer exakten Bestimmung der Bindungskonstante führt. So konnte nur eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} < 1 \text{ M}^{-1}$ bestimmt werden. Eine höhere Menge an Glucose konnte nicht zugegeben werden, da höhere

Konzentrationen an Glucose in DMSO aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht hergestellt werden konnten. Wahrscheinlich reichen die Wasserstoffbrücken, die in polaren Medien an Stärke verlieren, nicht aus, um eine Komplexierung des Zuckers in DMSO zu gewährleisten. Weitere Untersuchungen in unpolaren Lösemittel-Gemischen konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit der Rezeptoren **17** und **18** in unpolaren Lösemitteln nicht durchgeführt werden.

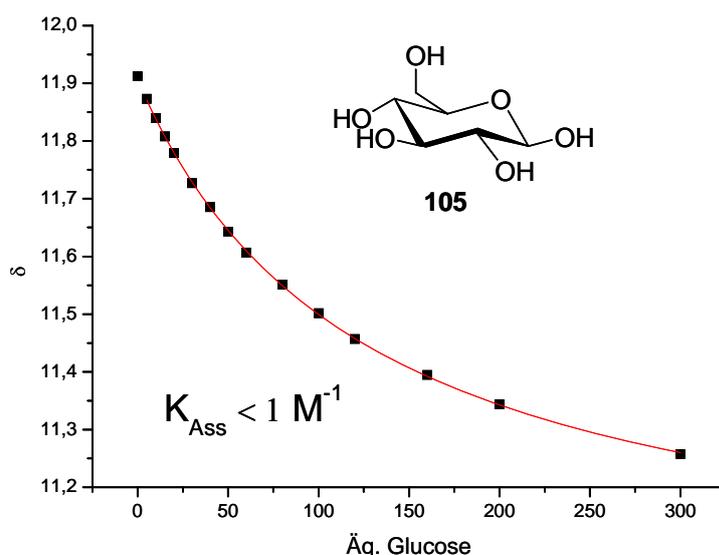


Abb. 4.79: NMR-Titration des Rezeptors **18** (10 mM) mit Glucose **105** (2 M) in DMSO. Die schwarze Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung mit einem 1:1 Modell an die experimentellen Daten (Rezeptor Guanidinium-Amid-NH, ■).

Zur Bestätigung der NMR-Bindungsstudien wurden UV- und Fluoreszenz-Titrations mit den beiden Rezeptoren **17** und **18** durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Bedingungen für die Titrations getestet. Es wurden sowohl Titrations bei pH 4 mit Acetat-Puffer als auch bei pH 7.4 mit HEPES-Puffer in verschiedenen Wasser/DMSO-Mischungen durchgeführt. Die Titrations bestätigten eine Komplexierung der Uronsäuren durch die beiden Rezeptoren **17** und **18**. Allerdings waren die Änderungen der UV-Absorption bzw. der Fluoreszenz bei der Zugabe der Uronsäuren als auch der Phosphate zu den Rezeptoren so gering, dass keine exakten Bindungskonstanten bestimmt werden konnten. Deswegen wurden keine weiteren Untersuchungen mittels UV- und Fluoreszenzspektroskopie mit den beiden Rezeptoren **17** und **18** durchgeführt.

Somit konnte in diesem Kapitel anhand von NMR-Bindungstitrationen gezeigt werden, dass der Rezeptor **18** vergleichbar gute Bindungskontanten wie Rezeptor **8** für die Komplexierung von Uronsäuren in wässrigem DMSO liefert. Außerdem konnte mit NMR-Methoden gezeigt werden, dass Rezeptor **18** eine Affinität für Glucose in DMSO aufweist. Es wurden erste Bindungsstudien mit optischen Methoden für die Rezeptoren **17** und **18** durchgeführt. Diese bestätigten ebenfalls eine Komplexierung der Uronsäuren durch die beiden Rezeptoren. Aufgrund zu geringer Änderungen der UV-Absorption bzw. Fluoreszenz bei der Komplexierung konnten allerdings keine exakten Bindungskonstanten bestimmt werden.

4.6 Synthese des cyclischen Acylguanidins **21**

In diesem Teil der Arbeit sollte eine Synthese für eine chirale cyclische Acylguanidin-Kopfgruppe **21** entwickelt werden, die durch ihre chirale Information eine stereochemische Diskriminierung von (Aminosäure-)Carboxylaten ermöglichen soll (siehe Kapitel 2.3). Als Zielstruktur wurde das cyclische Acylguanidin **21** identifiziert, das sowohl wegen seiner strukturellen Merkmale als auch wegen der vermutlich synthetisch leichten Zugänglichkeit ausgewählt wurde.^[34] Die Retrosynthese von **21** ist in Abb. 4.80 dargestellt. Als Edukte wurden die Mono-Benzylester der „chiral pool“ Carbonsäuren Asparaginsäure **22** und Äpfelsäure **23** gewählt, die mit einem Guanidinbaustein **24** cyclisiert werden sollten. Die Synthese des Acylguanidins besteht somit aus zwei Schlüsselschritten:

1. die Alkylierung des Guanidins mit dem Amin oder dem Alkohol der α -Carbonsäure-Einheit,
2. sowie die Amidbindung zwischen der Carbonsäure und der Guanidineinheit.

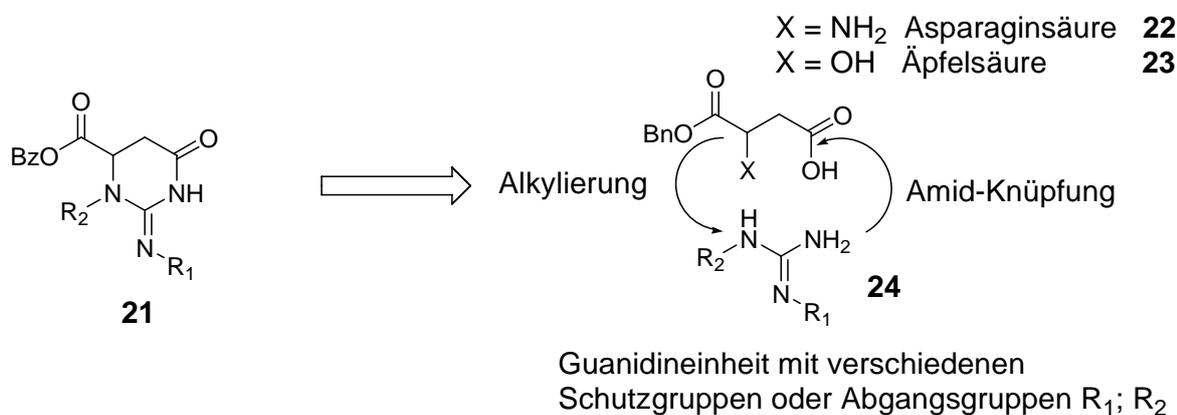


Abb. 4.80: Retrosynthese zur Darstellung der cyclischen Acylguanidin-Kopfgruppe **21**.

Dabei können zwei verschiedene Routen zur Darstellung gewählt werden (siehe Abb. 4.81). Bei der ersten Route wird zunächst die α -Carbonsäure mit einem Guanidinbaustein alkyliert und anschließend über eine Amid-Bindung cyclisiert. Die zweite mögliche Route besteht aus der Ausbildung einer Amid-Bindung zwischen dem Guanidin und der α -Carbonsäure und der anschließenden Cyclisierung über eine Alkylierung des Guanidins.

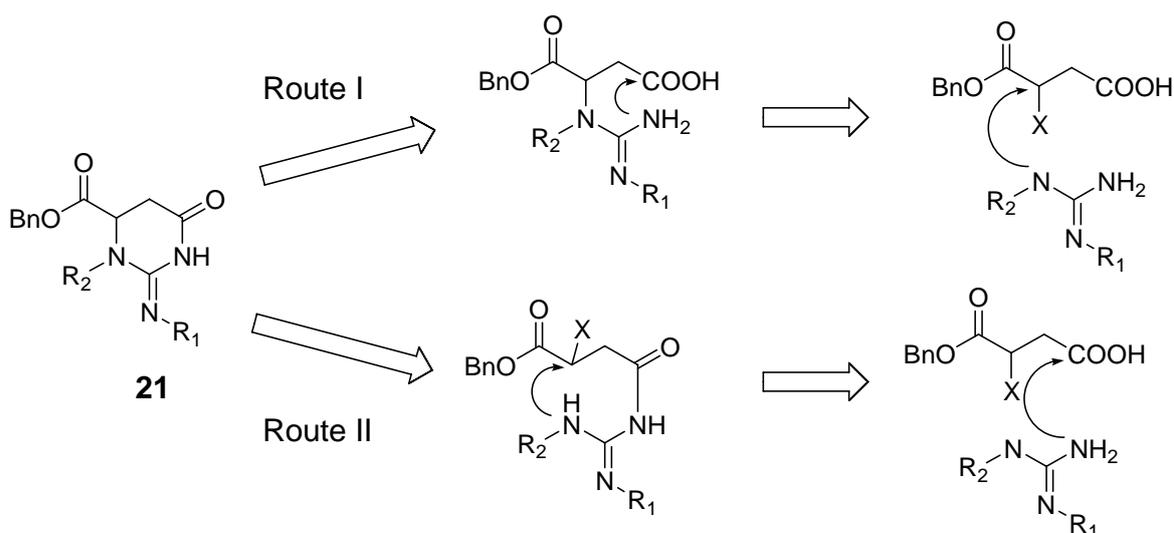


Abb. 4.81: Darstellung von 2 möglichen Routen zur Acylguanidin-Kopfgruppe **21**.

Zunächst wurde Route I gewählt, da für derartige Alkylierungen von Guanidinen viele Literaturvorschriften gefunden werden konnten. Bei der Reaktion muss allerdings beachtet werden, dass die Guanidinylierung am α -Kohlenstoff stereospezifisch erfolgen sollte, damit eine aufwendige Trennung der ansonsten dabei entstehenden Enantiomere vermieden werden kann. Deswegen wurde nach Reaktionen gesucht, mit denen diese Umsetzung stereospezifisch durchgeführt werden sollte.

Eine Möglichkeit zur enantioselektiven Guanidinylierung ist die Verwendung des Guanidinylierungs-Reagenzes **106**, das kommerziell erwerblich ist und für das mehrere Literaturanwendungen gefunden werden konnten.^[108-110] Außerdem kann das Guanidin **107** eingesetzt werden, das über eine einstufige Synthese aus Guanidinhydrochlorid hergestellt werden kann.^[111,112] Bei beiden Reagenzien greift das Amin der Asparaginsäure am Guanidin-Kohlenstoff an, wobei das Imidazol bzw. das Sulfonamid als Abgangsgruppen fungieren. Dazu wurde der kommerziell erwerbliche Asparaginsäurebenzylester **22** analog zur Literatur mit den Guanidinen **106** oder **107** in DMF mit TEA umgesetzt, allerdings konnten bei beiden Synthesen jeweils nur die Edukte reisoliert werden. Ein Grund hierfür könnte die Anwesenheit der freien Carbonsäure sein, die ebenfalls als Nucleophil mit den Guanidinylierungsreagenzien **106** und **107** abreagieren kann. Deswegen könnte die Reaktion nach Schützung der freien Carbonsäure erfolgreich verlaufen.

Dies wurde allerdings nicht mehr durchgeführt, sondern andere Guanidinylierungsreaktionen getestet.

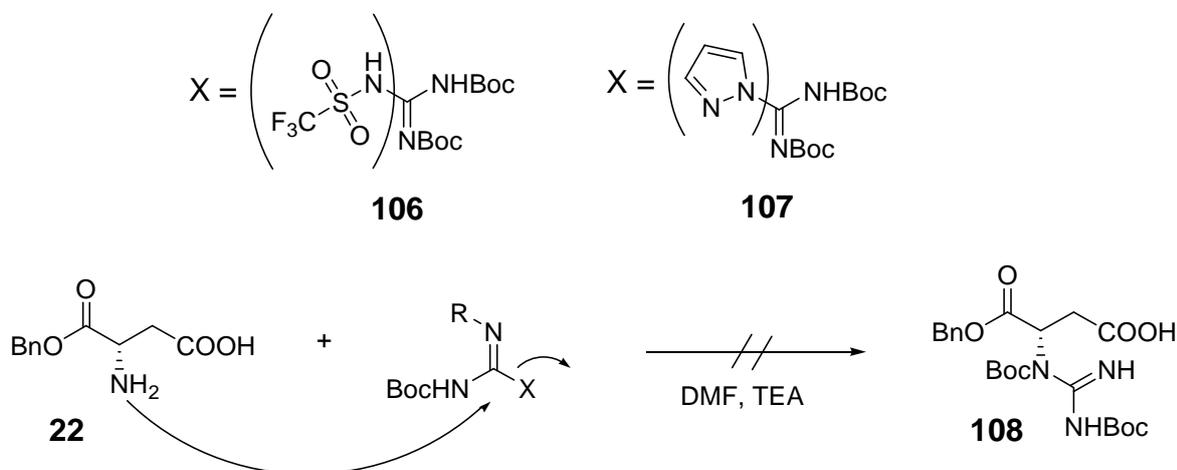


Abb. 4.82: Versuche zur Synthese des Acylguanidins **108** ausgehend vom Benzylester **22** und den Guanidinylierungsreagenzien **106** und **107**.

Eine alternative Möglichkeit für die Alkylierung von Guanidinen ist die Mitsunobu-Reaktion.^[113] Dabei wird der Alkohol des Äpfelsäurebenzylesters **23** mit DIAD und Triphenylphosphan in eine Abgangsgruppe umgewandelt, die nun selektiv mit einem geschütztem Acylguanidin umgesetzt werden kann. Da der 1-Äpfelsäurebenzylester **22** allerdings nicht kommerziell erwerblich ist, musste dieser erst noch aus Äpfelsäure **109** hergestellt werden. Analog zu einer Literaturvorschrift wurde dazu Äpfelsäure mit Trifluoressigsäureanhydrid und Benzylalkohol umgesetzt und der Benzylester **23** konnte so quantitativ erhalten werden.^[114]

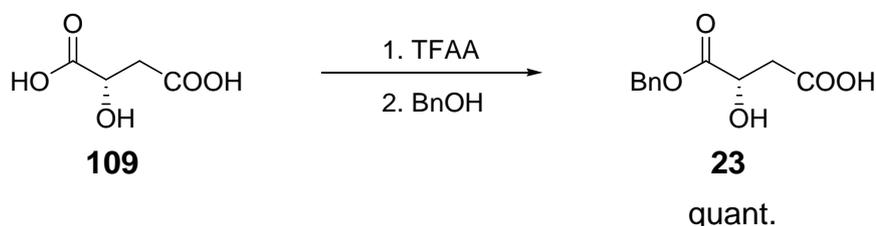


Abb. 4.83: Synthese des α -Benzylesters **23** ausgehend von L-Äpfelsäure.

Für die Mitsunobu-Reaktion konnten in der Literatur verschiedene Vorschriften gefunden werden.^[112,115] Die Reaktion wurde analog zur Literatur mit DIAD und PPh₃ in DCM sowohl mit dem einfach als auch dem zweifach geschützten

Guanidin **34** und **110** durchgeführt, allerdings konnte in beiden Fällen kein Produkt, sondern nur die Edukte isoliert werden.

In der Literatur konnten aber auch keine Beispiele für diesen Typ der Mitsunobu-Reaktion in Gegenwart von freien Carbonsäuren gefunden werden. Vielleicht fungiert die Carbonsäure unter diesen Bedingungen ebenfalls als Nucleophil und reagiert intramolekular ab. Bei der Aufarbeitung könnte dann das cyclische Lacton wieder geöffnet worden sein, weswegen nur die Edukte isoliert wurden. Diese Hypothese wurde aber nicht weiter verfolgt, sondern die zweite Route für die weitere Synthese verwendet.

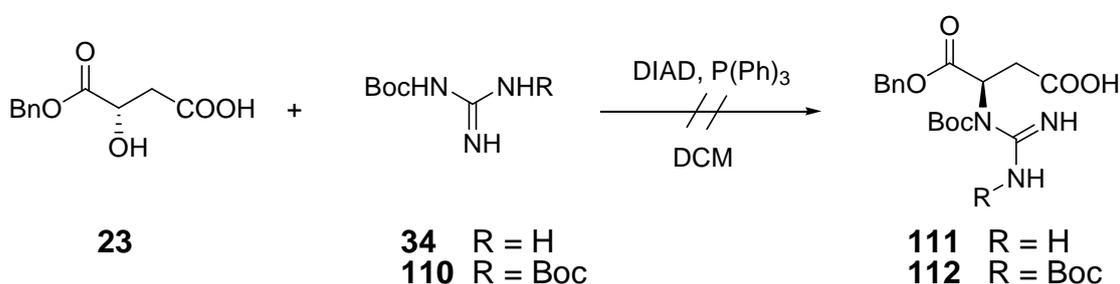


Abb. 4.84: Versuche zur Synthese der Acylguanidine **111** und **112** ausgehend von **23** und **34** oder **110**.

Dazu muss als erstes die Guanidineinheit über eine Amidbindung an die Carbonsäure-Einheit gebunden werden. Zunächst wurde nun versucht, das doppelt geschützte Guanidin **110** an die Carbonsäure **23** über eine Amid-Bindung zu verknüpfen, da für die spätere Alkylierung nur Reaktionen mit doppelt geschützten Guanidinen gefunden werden konnten. Die Reaktion wurde analog zu den schon durchgeführten Reaktionen mit PyBOP in DMF und NMM durchgeführt. Bei der Reaktion konnten allerdings nur die Edukte isoliert werden. Dies liegt wahrscheinlich an der schlechten Nucleophilie des doppelt geschützten Guanidins. Ähnliche Erfahrungen konnten bereits von *Geiger* gemacht werden, der ebenfalls das Guanidin **110** nicht an Pyrrolcarbonsäuren wie **36** kuppeln konnte.^[41] Deswegen wurde als nächstes versucht, das einfach geschützte Guanidin **34** mit **23** zu kuppeln. Die Reaktion wurde wiederum mit PyBOP in DMF und NMM durchgeführt und das Acylguanidin **113** konnte so mit einer guten Ausbeute von 63 % erhalten werden.

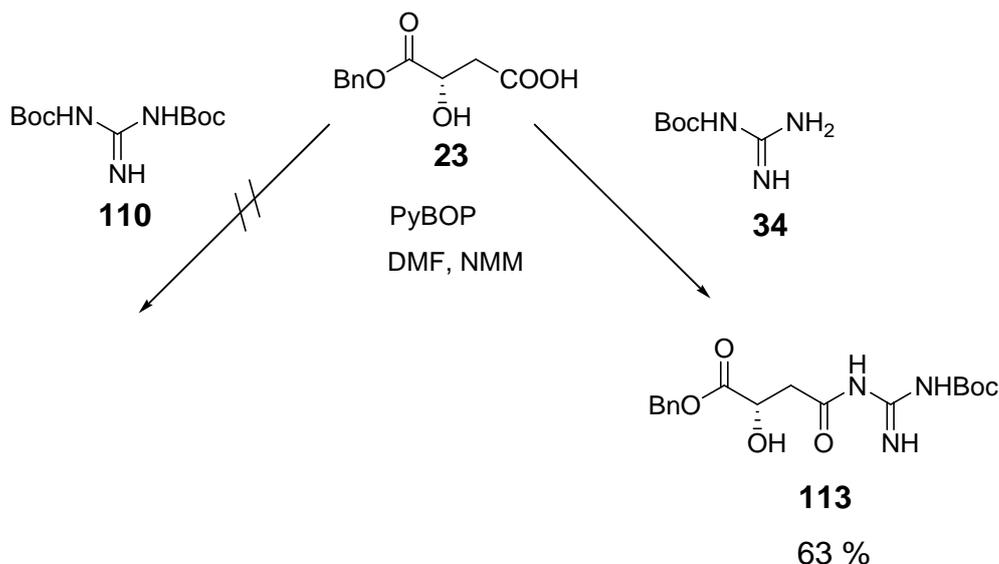


Abb. 4.85: Synthese des Acylguanidins **113** ausgehend von **23** und **34**.

Mit diesem Zwischenprodukt sollten nun die ersten Cyclisierungsversuche durchgeführt werden. Dazu wurde **113** mit DIAD und Triphenylphosphan in DCM mit hoher Verdünnung umgesetzt, um eine intramolekulare Alkylierung zu bevorzugen. Da sich Produkt und Edukt strukturell nur gering unterscheiden, wurden zunächst die Kopplungskonstanten und dann die ^{13}C -Spektren des Edukts und der isolierten Substanz verglichen. Dabei konnte eine Änderung der Kopplungskonstante von $^3J = 6.2 \text{ Hz}$ auf $^3J = 4.8 \text{ Hz}$ beobachtet werden, was die Synthese des Produkts bestätigt. Auch im ^{13}C -Spektrum konnten Änderungen beobachtet werden. Die Signale der CH_2 -Gruppe änderten sich von $\delta = 41.8$ nach $\delta = 35.5$ und die der CH -Gruppe von $\delta = 66.2$ nach $\delta = 59.7$. Dies deutet ebenfalls auf eine Substitution des Sauerstoffs durch einen Stickstoff hin, da der Sauerstoff den höheren EN-Wert hat und deshalb die höheren ppm-Werte am Kohlenstoff induzieren sollte.

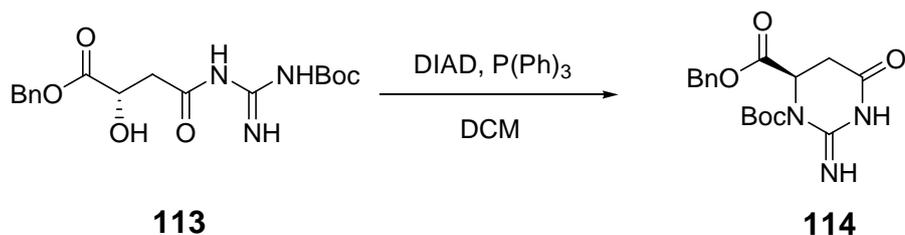


Abb. 4.86: Cyclisierung des acyclischen Acylguanidins **113** zum cyclischen Acylguanidin **114**.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der isolierten Substanz ist in Abb. 4.87 gezeigt. Allerdings konnten die Signale im aromatischen Bereich dem Produkt nicht zugeordnet werden. Da es sich bei der Integration genau um 3 Phenylringe handeln könnte, wurde angenommen, dass das gewünschte Produkt mit Triphenylphosphanoxid verunreinigt ist, das während der Mitsunobu Reaktion entsteht.

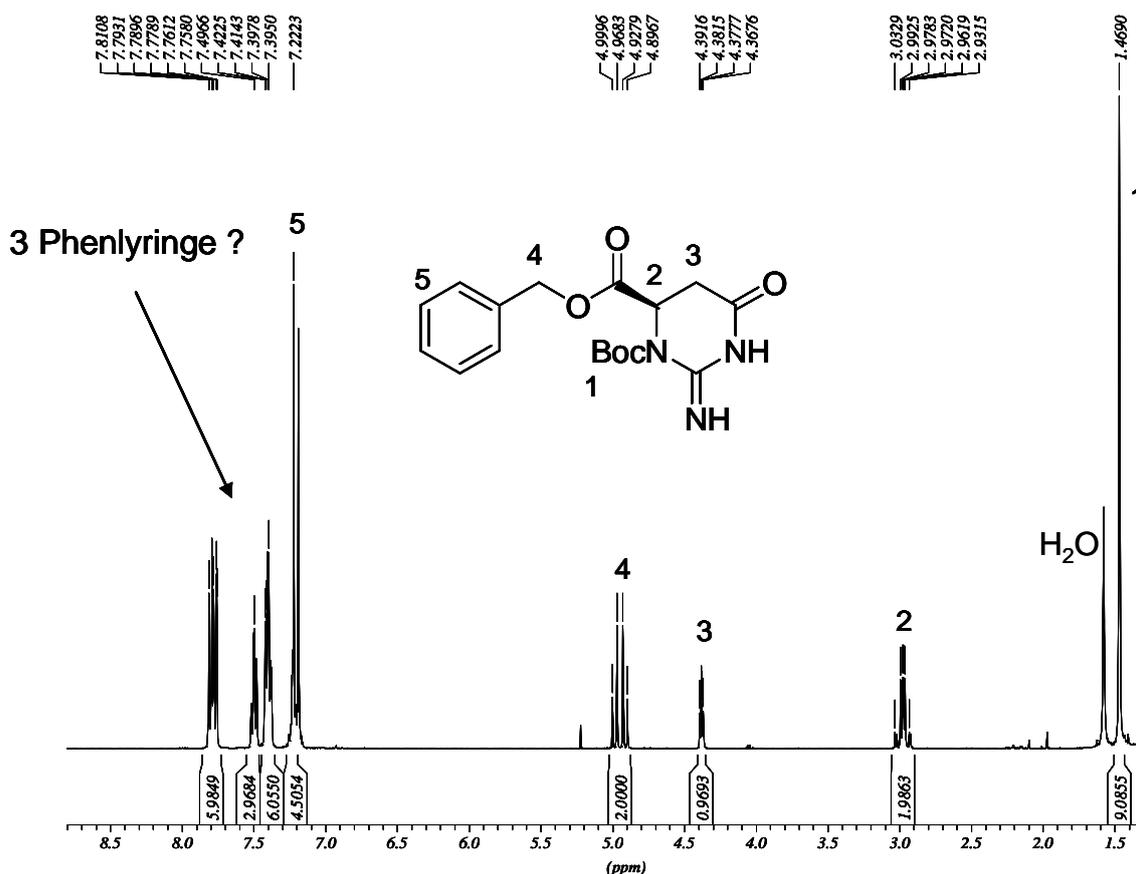


Abb. 4.87: NMR (CDCl_3) und Zuordnung der vermutlichen Produkts **114**.

Sowohl mit Silicagel- als auch RP-Chromatographie konnte das vermutlich entstandene Triphenylphosphanoxid **115** aber nicht vom Produkt getrennt werden. Allerdings konnten in der Literatur Reaktionen gefunden werden, bei denen Amine, Guanidine oder Amidine unter Mitsunobu Bedingungen als Iminophosphorane geschützt werden (siehe Abb. 4.88).^[116-118] Diese können mit HCl in Ethanol unter Rückflussbedingungen entschützt werden.^[119] Nach Durchführung der Synthese unter diesen Bedingungen (siehe Abb. 4.88) wurden dann zwei Produkte mittels DC detektiert, von denen einer als Triphenylphosphanoxid und einer als **116** identifiziert werden konnte. Dies lässt

(siehe Abb. 4.90) des entschützten Guanidins **116** bestätigt die vermutete Struktur.

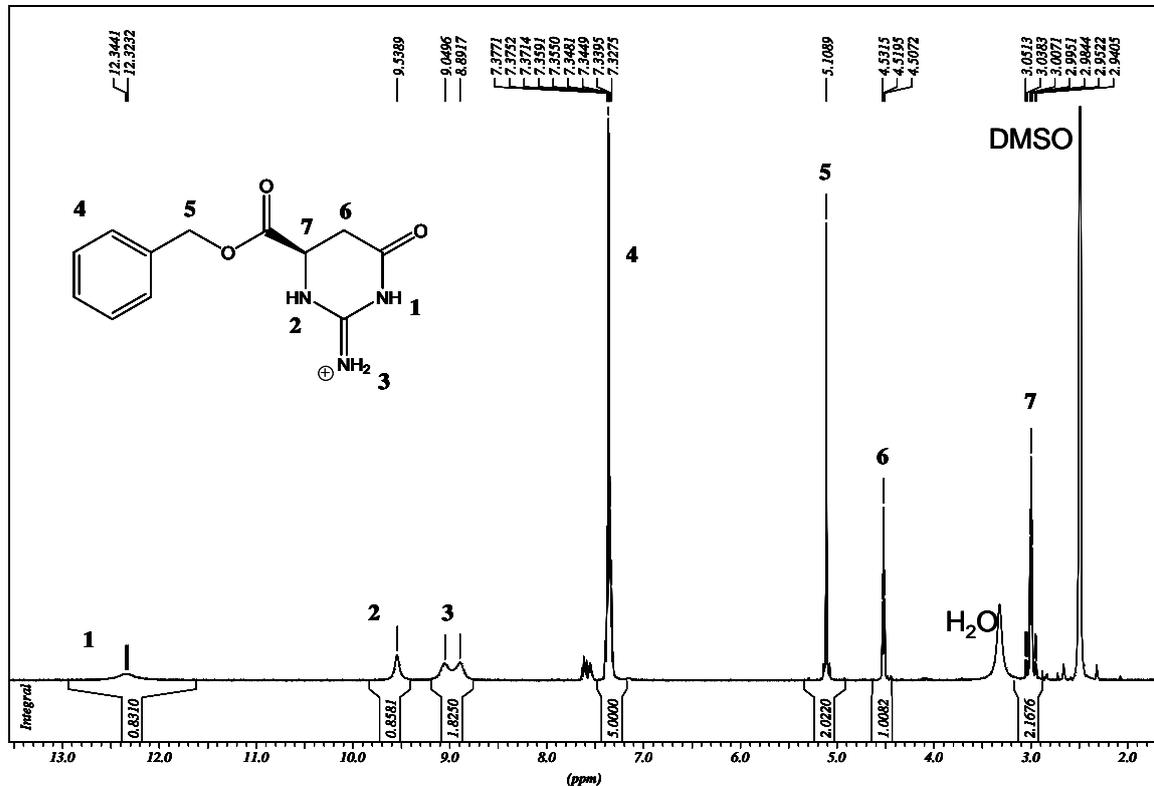


Abb. 4.90: NMR-Spektrum (DMSO-d₆) mit Zuordnung des entschützten Acylguanidins **116**.

Nachdem nun die Struktur des bei der Mitsunobu Reaktion entstandenen Produkts **120** bestätigt werden konnte, konnte die Ausbeute für diese Reaktion (s.u.) auf 55 % bestimmt werden. Die Position der Boc-Gruppe bei **120** konnte dabei über die NOE-Signale zum Benzylester und zur Triphenylphosphan-Gruppe im NOESY-Spektrum bestimmt werden.

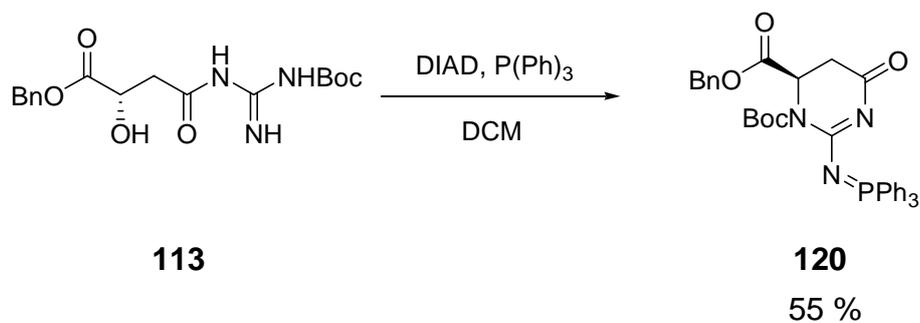


Abb. 4.91: Mitsunobu-Reaktion von **113** zum Iminophosphoran **120**.

Im nächsten Schritt der Synthese wurde der Benzylester mit Wasserstoff und Palladium/Kohle quantitativ zur freien Carbonsäure **121** umgesetzt.

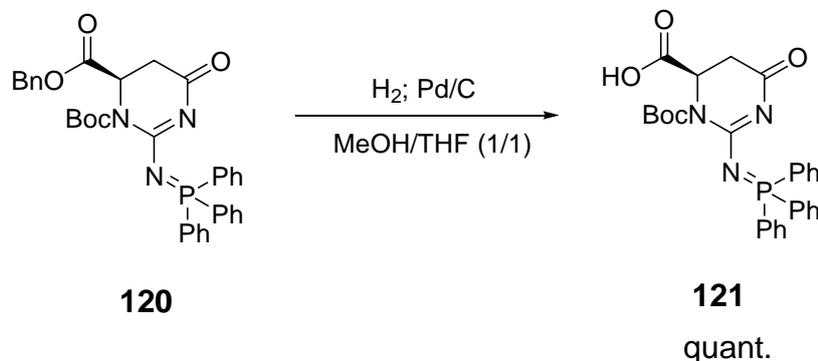


Abb. 4.92: Entschützung des Benzylesters **120** zur Carbonsäure **121**.

Somit konnte das cyclische Acylguanidin **121** in geschützter Form über eine vierstufige Synthese mit einer guten Ausbeute von 35 % hergestellt werden.

Um zu testen, wie gut dieses neuartige Bindungsmotiv Carboxylate erkennen kann, sollte nun noch ein einfacher Rezeptor in Lösung hergestellt werden. Dazu wurde die Carbonsäure **121** mit Valinamid **123** mit HCTU und Cl-HOBt in DCM/NMM umgesetzt. Die Aminosäure Valin wurde deswegen gewählt, da sie durch die räumlich anspruchsvolle *i*-Propyl-Gruppe vielleicht eine enantioselektive Erkennung von Aminosäuren mit diesem sehr einfachen Bindungsmotiv ermöglichen könnte.

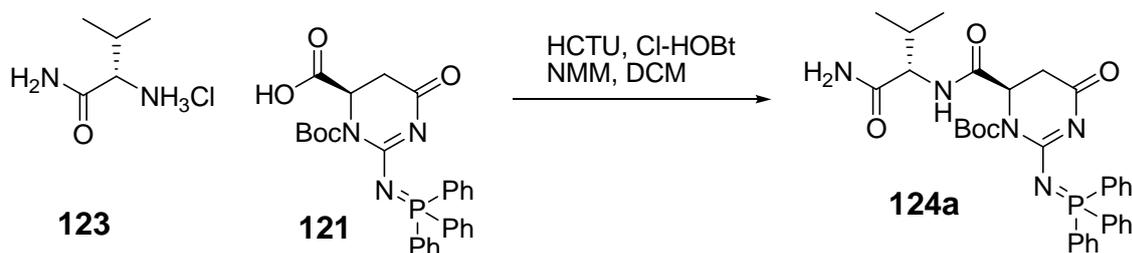


Abb. 4.93: Synthese des Rezeptors **124a** ausgehend von Valinamid **123** und **121**.

Bei der chromatographischen Aufarbeitung des geschützten Rezeptors **124a** wurden allerdings 2 Substanzen isoliert, die nahezu gleiche NMR-Spektren aufwiesen. Beide konnten mittels Massenspektrometrie als Isomere des Rezeptors **124a** identifiziert werden. Ein Grund hierfür könnte die Entstehung von Diastereomeren sein. Das würde bedeuten, dass z.B. während der Mitsunobu-

Reaktion zu **120** eine Racemisierung stattgefunden haben könnte. Diese Hypothese konnte aber dadurch widerlegt werden, dass nach Entfernen der beiden Schutzgruppen mit HCl (siehe Abb. 4.94) die beiden Isomere identische NMR-Spektren aufwiesen. Falls es sich hier um Diastereomere handeln sollte, wäre dies sehr unwahrscheinlich.

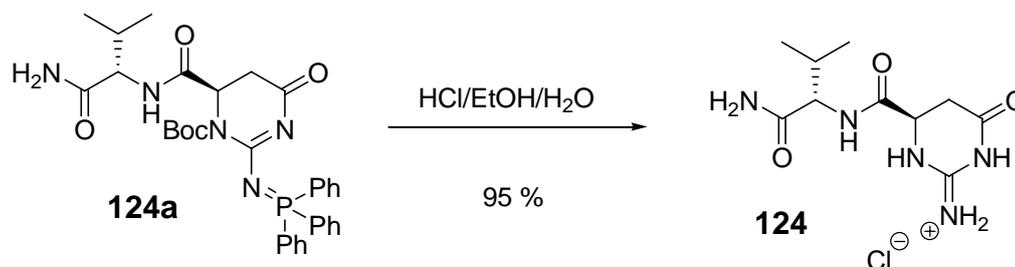


Abb. 4.94: Entschützung von **124a** zum Rezeptor **124**.

Eine andere Erklärung könnte die relative Stellung der Triphenylphosphan-Schutzgruppe zum Ring. Da es sich hier um eine sterisch sehr anspruchsvolle Gruppe handelt, könnte es sein, dass diese ober- bzw. unterhalb des Rings aufgrund sterischer Abstoßungen mit der Boc-Gruppe fixiert wird (siehe Abb. 4.97). Nach dem Entfernen der beiden Schutzgruppen kann dieser Effekt nicht mehr auftreten. Dies würde erklären, warum bei der Entschützung der beiden Isomere von **124a** nur ein Produkt **124** erhalten wurde.

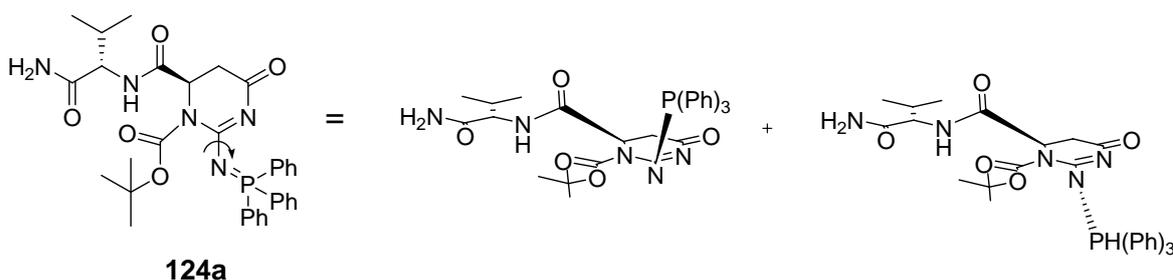


Abb. 4.95: Mögliche Konformere zur Erklärung der Entstehung von zwei Isomeren bei der Bildung von **124a**.

In diesem Kapitel konnte somit eine Synthese für ein neuartiges Acylguanidin **120** über eine vierstufige Synthese mit einer Ausbeute von 35 % entwickelt werden. Dabei wurde herausgefunden, dass während der Mitsunobu-Reaktion das Guanidin als Triphenylphosphanimin geschützt wird, das aber mit Salzsäure wieder leicht zum freien Guanidin entschützt werden kann. Allerdings konnte nicht

mehr gezeigt, ob die Mitsunobu-Reaktion stereospezifisch abläuft, weswegen hier noch weitere Untersuchungen notwendig sind. Mit dem Acylguanidin **120** wurde dann noch ein Rezeptor **124** mit Valinamid hergestellt, mit die ersten Bindungsstudien durchgeführt werden sollten, um zu zeigen, ob dieses neuartige Bindungsmotiv eine effektive Komplexierung von einfachen Aminosäuren ermöglicht. Diese Untersuchungen werden im nächsten Kapitel vorgestellt.

4.7 Bindungsstudien mit dem cyclischen Rezeptor 124

Das cyclische Acylguanidin wurde entworfen, um eine enantioselektive Erkennung von C-terminalen Peptiden in wässrigen Medien gewährleisten zu können. Zunächst sollte aber unabhängig von der Enantioselektivität untersucht werden, ob das cyclische Acylguanidin überhaupt Aminosäurecarboxylate in wässrigen Medien mit ausreichend hohen Bindungskonstanten erkennen kann, da es sich hier um ein neuartiges Bindungsmotiv handelt.

Deswegen wurden NMR-Bindungsstudien mit dem Rezeptor **124** gegen einfache Aminosäuren und Acetat durchgeführt. Die ersten Bindungsstudien wurden in 80 % DMSO/Wasser durchgeführt. Dazu wurde Acetyl-L-Alanincarboxylat **125** (1 mM) vorgelegt und sukzessive mit dem Rezeptor **124** versetzt. Der Verlauf der Titration ist in Abb. 4.96 bzw. Abb. 4.97 gezeigt. Das Amid der Aminosäure weist eine starke Tieffeld-Verschiebung von $\delta = 7.3$ nach 8.3 um fast ein ppm auf. Außerdem erkennt man, dass der Verlauf bis zu einem Äquivalent Zugabe an Rezeptor linear verläuft und dann direkt ins Plateau übergeht, was auf eine sehr hohe Bindungskonstante hindeutet. In der Tat ist die Bindungskonstante so hoch, dass sie mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse nicht bestimmt werden konnte.

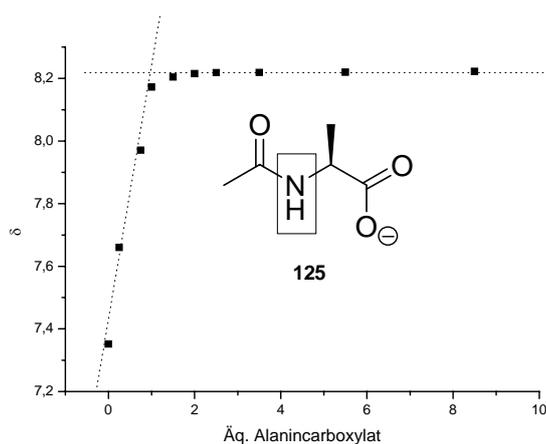


Abb. 4.96: NMR-Titration von L-Alanincaroxylat **125** (1mM) mit Rezeptor **124** (10 mM) in 80 % DMSO/Wasser. Die gepunktet Linie verdeutlicht den linearen Verlauf der experimentellen Daten (Ala-Amid-NH, ■).

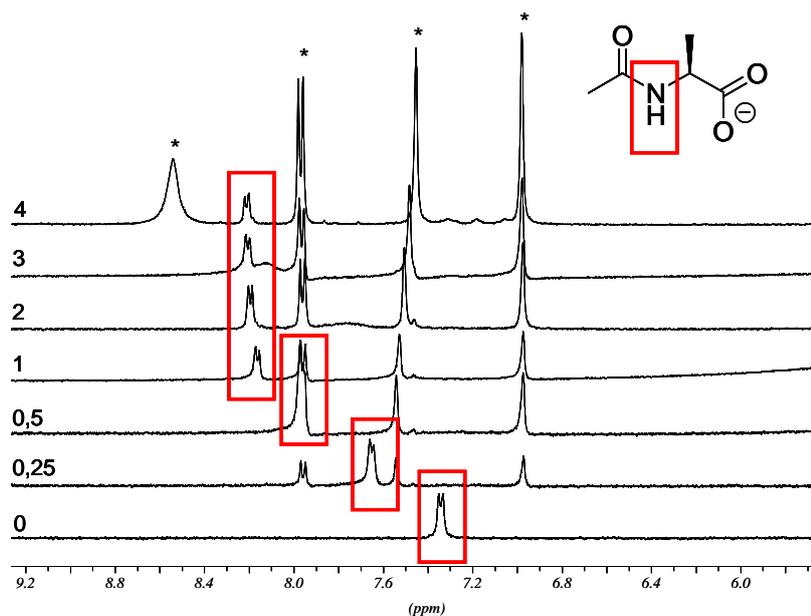


Abb. 4.97: Verlauf der NMR-Titration von L-Alanincarboxylat **125** (1 mM) mit Rezeptor **124** (10 mM) in 80 % DMSO/Wasser. Die Signale des Rezeptors sind mit einem (*) markiert.

Aus diesem Grund wurden Bindungsstudien in 60 % DMSO/Wasser durchgeführt. Dies hat auch den Vorteil, dass sie direkt mit den Ergebnissen des Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptors **45** (siehe Tabelle 4.7) bei der Komplexierung von Aminosäuren verglichen werden können, die ebenfalls in diesem Lösemittelgemisch durchgeführt wurden (siehe Kapitel 3.1.2). Wiederum wurde die Aminosäure Alanincarboxylat **125** vorgelegt und mit dem Rezeptor **124** versetzt. Die Bindungsisotherme der Titration ist in Abb. 4.98 gezeigt. Da die Titration diesmal allerdings in D₂O durchgeführt wurde, wurden die durch die Komplexierung hervorgerufenen chemischen Verschiebungen der Methyl-Gruppe beobachtet, die eine geringere Tieffeld-Verschiebung von ca. 0.1 ppm aufweisen. Mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse konnte so eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 5200 \text{ M}^{-1}$ bestimmt werden. Somit bindet der Rezeptor **124** Alanincarboxylat um mehr als den Faktor 3 besser als der von Schmuck entwickelte Rezeptor **45** mit $K_{\text{Ass}} = 1600 \text{ M}^{-1}$, der ebenfalls eine Valinamid-Gruppe enthält. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass die Messungen für **45** in 40 % Wasser und für **124** in 40 % D₂O durchgeführt wurden, weswegen die Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden können.

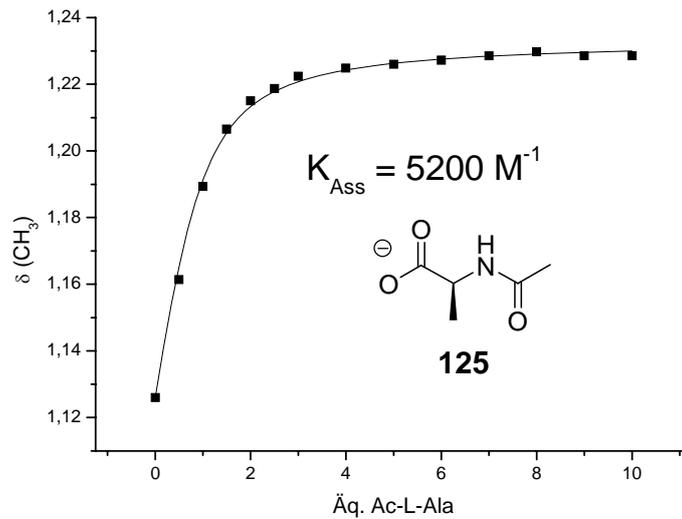
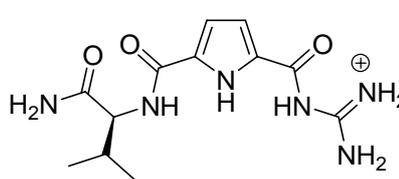
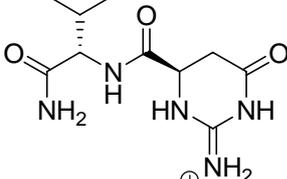
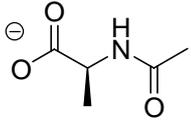


Abb. 4.98: NMR-Titration von L-Alanincarboxylat **125** (1 mM) mit Rezeptor **124** (5 M) in 60 % DMSO/D₂O. Die Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung mit einem 1:1 Modell an die experimentellen Daten (Ala-CH₃, ■).

Tabelle 4.7: Bindungskonstanten für die Komplexbildung von L-Alanincarboxylat **125** durch den Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **45** in 60 % DMSO/Wasser und den cyclischen Rezeptor **124** in 60 % DMSO/D₂O.^[25]

| $K_{\text{Ass}} [M^{-1}]$ |  45 |  124 |
|---|--|---|
|  125 | 1610 | 5200 |

Um herauszufinden bei welchem Wassergehalt noch eine effektive Komplexbildung des Rezeptors **124** von Aminosäure-Carboxylaten möglich ist, wurden Bindungsstudien in 70 % Wasser/DMSO durchgeführt. In Abb. 4.99 ist wiederum die Titration von L-Alanincarboxylat **125** mit Rezeptor **124** gezeigt. In diesem sehr polaren Lösemittelgemisch konnte immer noch eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 394 M^{-1}$ für L-Ala bestimmt werden.

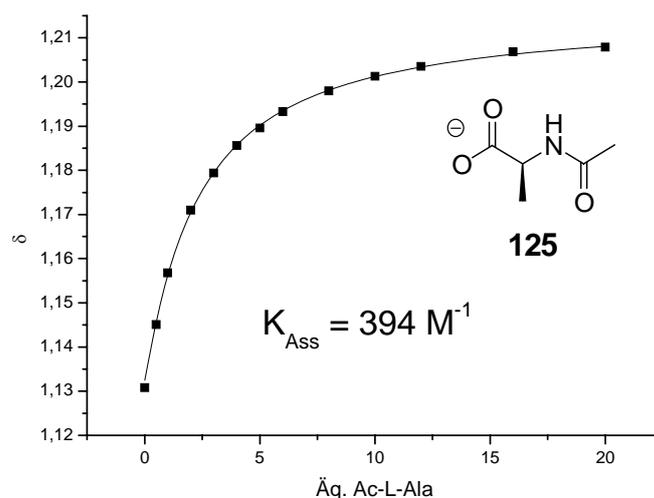


Abb. 4.99: NMR-Titration von L-Alaninocarboxylat **125** (1 mM) mit Rezeptor **124** (10 M) in 70 % Wasser/DMSO. Die Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung mit einem 1:1 Modell an die experimentellen Daten (Ala-CH₃, ■).

Unter diesen Bedingungen wurden nun verschiedene *L*- und *D*-Aminosäuren auf ihre Selektivität für den Rezeptor **124** getestet. Zum Vergleich, welchen Einfluss der sterische Anspruch der Aminosäuren auf die Komplexbildung hat, wurde zusätzlich noch Natriumacetat auf seine Bindungseigenschaften geprüft. Die Bindungskonstanten der verschiedenen Titrations sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst. Zur Überprüfung der Stöchiometrie wurden exemplarisch für 2 Aminosäuren und Natriumacetat Job-Plots (siehe als Beispiel Abb. 4.100) durchgeführt, die alle eine 1:1 Stöchiometrie bestätigten.

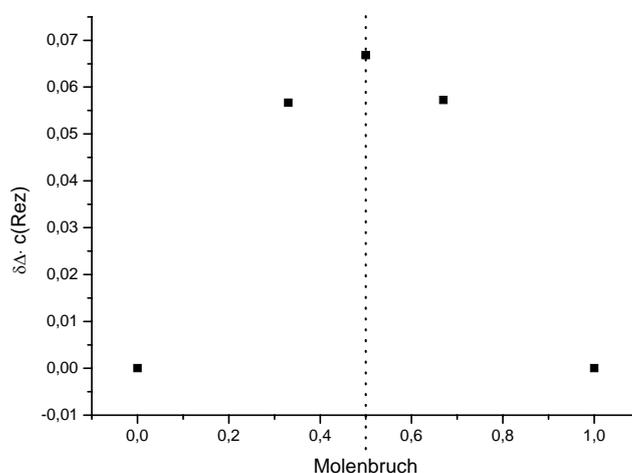


Abb. 4.100: Job Plot von Natriumacetat und Rezeptor **124** (beide 1 mM) in 70 % Wasser/DMSO.

Tabelle 4.8: Bindungskonstanten für die Komplexierung verschiedener *D*- und *L*-Aminosäuren durch den Rezeptor **124** in 70 % Wasser/DMSO.

| Carboxylat | Signal | $K_{\text{Ass}} [\text{M}^{-1}]$ |
|---------------|-----------------|----------------------------------|
| Acetat | CH ₃ | 3300 |
| <i>L</i> -Ala | CH ₃ | 394 |
| <i>D</i> -Ala | CH ₃ | 518 |
| <i>L</i> -Val | Amid-NH | 432 |
| <i>D</i> -Val | Amid-NH | 529 |
| <i>L</i> -Trp | Amid-NH | 323 |
| <i>D</i> -Trp | Amid-NH | 414 |
| <i>L</i> -Phe | Amid-NH | 270 |
| <i>D</i> -Phe | Amid-NH | 392 |

Man erkennt, dass Acetat mit $K_{\text{Ass}} = 3300 \text{ M}^{-1}$ um mehr als den Faktor 6 besser gebunden wird als die Aminosäuren, die Bindungskonstanten zwischen $K_{\text{Ass}} = 300$ und 500 M^{-1} aufweisen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der sterische Anspruch einen Einfluss auf die Bindungskonstanten hat und dass so vielleicht eine Differenzierung von enantiomeren Aminosäuren möglich ist. Vergleicht man zunächst die Bindungskonstanten der verschiedenen *L*-Aminosäuren, erkennt man, dass die aliphatischen Aminosäuren Ala und Val mit $K_{\text{Ass}} = 400\text{-}500 \text{ M}^{-1}$ etwas besser gebunden werden als die sterisch anspruchsvolleren Aminosäuren Phe und Trp mit $K_{\text{Ass}} = 300\text{-}400 \text{ M}^{-1}$. Dieser Unterschied ist zwar sehr gering, bestätigt aber die Hypothese, dass der Rezeptor die Aminosäuren aufgrund des sterischen Anspruchs differenzieren kann. Vergleicht man die Ergebnisse der enantiomeren Aminosäuren untereinander, erkennt man, dass alle *D*-Aminosäuren um einen kleinen Faktor besser gebunden werden als ihre enantiomeren Analoga. Während der Unterschied bei den aliphatischen Aminosäuren bei ca. 20 % liegt, steigt er bereits bei den aromatischen Aminosäuren für *D*-Phe auf fast 50 % an, die auch die geringeren Bindungskonstanten für den Rezeptor **124** aufwiesen. Sowohl die Selektivität des Rezeptors für aliphatische Aminosäuren als auch die höhere Enantioselektivität der aromatischen enantiomeren Aminosäuren deuten auf einen wichtigen Einfluss der sterischen Ansprüche der Aminosäure hin. Somit könnte eine Erhöhung des sterischen Anspruchs des Rezeptors vielleicht noch

eine Erhöhung der Selektivität sowohl für verschiedene Aminosäuren als auch deren Enantiomere hervorrufen.

Zur Bestätigung der Komplex-Bildung wurde ein NOESY-Spektrum für die Komplexierung von *L*-Ala mit Rezeptor **124** aufgenommen (siehe Abb. 4.101). Hier sieht man Cross-Peaks zwischen dem Ala-Amid und der CH- bzw. CH₃-Gruppe des Rezeptors (rote Kreise bzw. Pfeile), die die Komplexierung bestätigen. Die räumliche Nähe der aliphatischen Gruppen des Rezeptors und des Amids der Aminosäuren deuten wiederum auf eine Abhängigkeit der Bindungskonstante von dem sterischen Anspruch der Aminosäure hin, was die Selektivität des Rezeptors erklären könnte. Aufgrund der Überlagerung der Signale der beiden Aminosäure-CHs des Rezeptors und von Alanin konnte nicht genau bestimmt werden, ob es sich bei den blau markierten Cross-Peaks um intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen handelt.

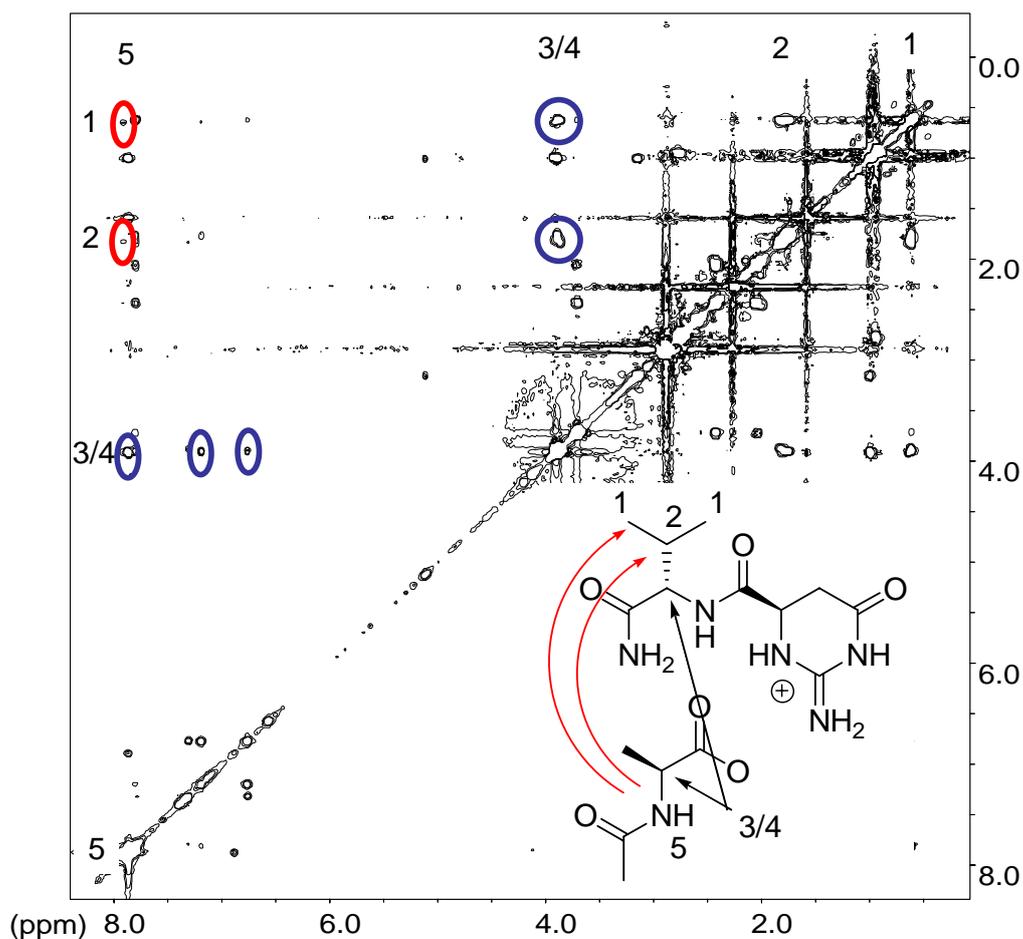


Abb. 4.101: NOE-Spektrum des Rezeptors **124** und Alanincarboxylat **125** (beide 40 mM) in DMSO.

Somit konnte gezeigt werden, dass das neuartige cyclische Acylguanidin-Bindungsmotiv hohe Bindungskonstanten für Aminosäurecarboxylate in sehr polaren Medien wie 70 % Wasser/DMSO aufweist und in 40 % DMSO/Wasser um den Faktor 3 besser bindet als der Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptor **45**. Es konnten sowohl Selektivitäten zwischen den aliphatischen und aromatischen Aminosäuren als auch deren Enantiomeren beobachtet werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein multivalenter Rezeptor **8** auf Basis von Guanidiniocarbonylpyrrolen zur Komplexierung von biologisch relevanten (poly)-anionischen Substraten wie Citrat, Malat und Tatrat über eine vierstufige Synthese mit einer guten Ausbeute von 60 % dargestellt werden.

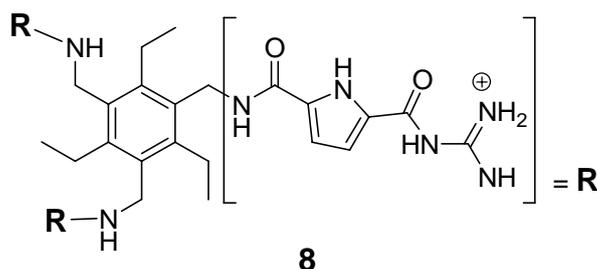


Abb. 5.1: Multivalenter Rezeptor **8** zur Komplexierung von biologisch relevanten Anionen.

Außerdem konnte im Laufe der Arbeit eine neue Synthese für das Triamin-Templat **6** entwickelt werden, mit der große Mengen in hoher Reinheit hergestellt werden konnten. Dies war erforderlich, da bei den Literatur-Synthesen häufig nur schlechte Ausbeuten aufgrund von Reinigungsproblemen erhalten wurden.

Mit NMR Bindungsstudien von Rezeptor **8** mit den Tricarboxylaten konnte aufgrund der sehr hohen Affinität keine exakte Bindungskonstante bestimmt werden. Deswegen wurden UV Bindungsstudien mit verschiedenen Polycarboxylaten durchgeführt. Neben den schon oben erwähnten Substraten, wurden zum Vergleich noch drei aromatischen Dicarboxylate und die Kemp'sche Trisäure untersucht, um festzustellen, welchen Anteil die verschiedenen nicht-kovalenten Wechselwirkungen an der gesamten Komplexierung haben.

Der Rezeptor **8** bindet Citrat selbst in Gegenwart eines 1000fachen Überschusses an NaCl und einem 10fachen Überschuss an Bis-tris Puffer mit einer hohen Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 86000 \text{ M}^{-1}$ in Wasser. Damit zeigt der Rezeptor **8** eine um mehr als den Faktor 100 stärkere Bindung von Citrat als *Anslyns* Rezeptor **7**, der auf Wechselwirkungen des Citrats mit einfachen Guanidinium-Kationen beruht. Wenn man Rezeptoren auf Metall- und Boronsäurebasis nicht berücksichtigt, handelt es sich nach meinem Wissen um den besten Citrat-Rezeptor, der in der Literatur bisher publiziert ist. Außerdem zeigt der Rezeptor **8** mit einem Faktor von mindestens 8 eine

hohe Selektivität für Citrat gegenüber anderen biologisch relevanten Dicarboxylaten wie Malat und Tatrat.

Mithilfe dieser Bindungsstudien und Molecular Modeling Rechnungen^[99] konnte hergeleitet werden, welchen Einfluss die verschiedenen nicht-kovalenten Wechselwirkungen auf die Bindungskonstante haben. Dabei konnte gezeigt werden, dass Flexibilität, Hydroxy-Funktionen, π -Stacking und Symmetrie bei den Substraten Einfluss auf die Bindungskonstanten zeigen, wobei vor allem die unpolaren Wechselwirkungen und die zusätzliche Hydroxy-Funktionen einen hohen Anteil an der Bindung zu haben scheinen.

Die hohen Bindungskonstanten von Rezeptor **8** für die Polycarboxylate können dabei durch 3 Faktoren erklärt werden:

1. Die hervorragenden Eigenschaften des Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotives bei der Komplexierung von Carboxylaten im Vergleich zu normalen Guanidinium- und Ammonium-Salzen.
2. π -Stacking Wechselwirkungen zwischen dem elektronenreichen Aromaten des Rezeptors und dem elektronenarmen Aromaten der Trimesinsäure, die gerade in polaren Lösemitteln wie Wasser einen hohen Anteil an der Bindungskonstante haben sollten.
3. Die drei Bindungsarme des Rezeptors bilden ein hydrophobes Schild um das Substrat bei der Komplexierung im Inneren des Rezeptors. Dadurch wird die Mikroumgebung um die Carboxylat-Bindungsstelle viel unpolarer als das sie umgebende Lösemittel (Siehe Lösemittel zugänglichen Oberflächen Abb. 4.41), was die polaren Wechselwirkungen noch einmal erhöhen sollte, da diese in unpolaren Medien an Stärke zunehmen.

Aufgrund dieser Faktoren kann man den Rezeptor als Molekulare Fliegenfalle bezeichnen. In Abwesenheit eines Substrats zeigen die Rezeptorarme aufgrund von elektrostatischen Abstoßungen voneinander weg, wodurch eine offenere Form des Rezeptors entsteht. Bei Komplexierung eines Substrats kommen sich die Arme wieder näher und umschließen das Substrat.

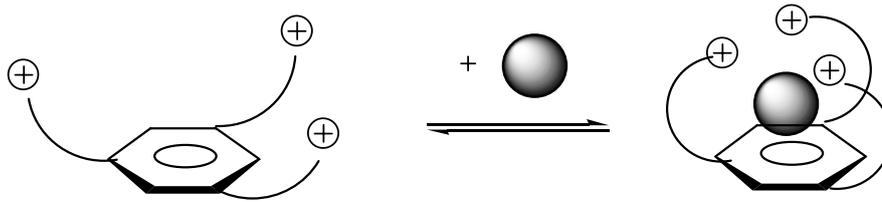


Abb. 5.2: Substrat Komplexierung des Rezeptors **8** ähnelt einer Molekularen Fliegenfalle.

Neben der selektiven Erkennung von Citrat durch den Rezeptor **8** konnte zusätzlich ein Sensorsystem mit Carboxyfluorescein auf Basis eines *indicator displacement assays* entwickelt werden, mit dem die Anwesenheit von Citrat im Gegensatz zu anderen Carboxylaten mit dem bloßen Auge (*naked eye*) erkannt werden kann.

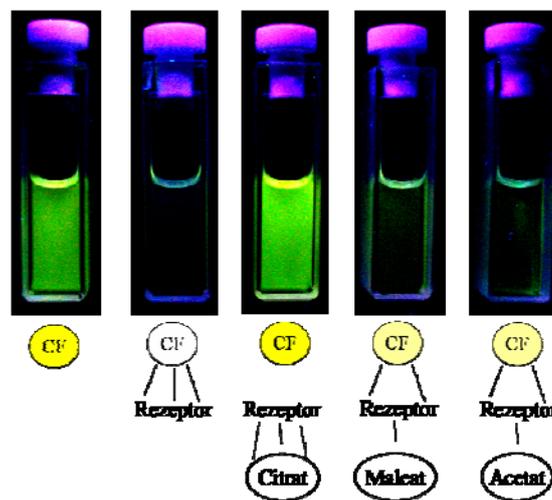


Abb. 5.3: Fluoreszenz der verschiedenen Lösungen aus Rezeptor **8** (0.5 mM), Carboxyfluorescein (1 Åq.) und den Substraten Citrat, Malat und Acetat (jeweils 20 Åq.) beobachtet unter einer UV-Lampe bei $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Außerdem zeigte Rezeptor **8** hohe Bindungskonstanten für anionische Zucker. Dabei konnten für Glucuronsäure und Galacturonsäure guten Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ in 70 % DMSO/Wasser (NMR) und $K_{\text{Ass}} \sim 5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ in 70 % DMSO/Wasser (UV, pH = 6) bestimmt werden. Für die Komplexierung der Glucophosphate durch Rezeptor **8** konnten noch höhere Bindungskonstanten als bei den Uronsäuren ermittelt werden. Mit UV-Spektroskopie konnten Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} \sim 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ in dem sehr polaren Lösemittelgemisch 10 % DMSO/Wasser (pH = 4, Acetat-Puffer) gefunden werden. Außerdem zeigte der Rezeptor auch noch gute Bindungskonstante bei biologischem pH (7.4). Wieder konnten mit UV-Spektroskopie Bindungskonstanten von $K_{\text{Ass}} \sim 10^4 \text{ M}^{-1}$ in einem

etwas unpolarerem Lösemittelgemisch von 70 % DMSO/Wasser (pH = 7.4, HEPES-Puffer) bestimmt werden.

Mit den Messungen konnte gezeigt werden, dass sowohl der Zucker einen signifikanten Anteil an der Bindungskonstante aufweist (Vergleich von Methylphosphat **16** mit den Glucophosphaten **13-15** Faktor > 2), als auch die verschiedenen Zucker durch den Rezeptor **8** differenziert werden können (Vergleich z.B. Glucuronsäure **11** und Galacturonsäure **12** Faktor > 3). Mögliche Gründe für diese Unterschiede in den Bindungskonstanten konnten mit Hilfe von Molecular Modeling Rechnungen hergeleitet werden.

Neben dem Rezeptor **8** wurden noch zwei weitere Rezeptoren **17** und **18** dargestellt, die aufgrund ihrer größeren Kavität als auch der zusätzlichen Wasserstoffbrücken-Motive eine Erkennung von Zuckern ermöglichen sollten. Die beiden Rezeptoren konnten durch eine vierstufige Synthese ausgehend von dem Triamin-Templat **6**, der jeweiligen Aminosäure **19** bzw. **20** und dem Bindungsmotiv **9** mit guten Ausbeuten von 42 % für **17** und 35 % für **18** dargestellt werden.

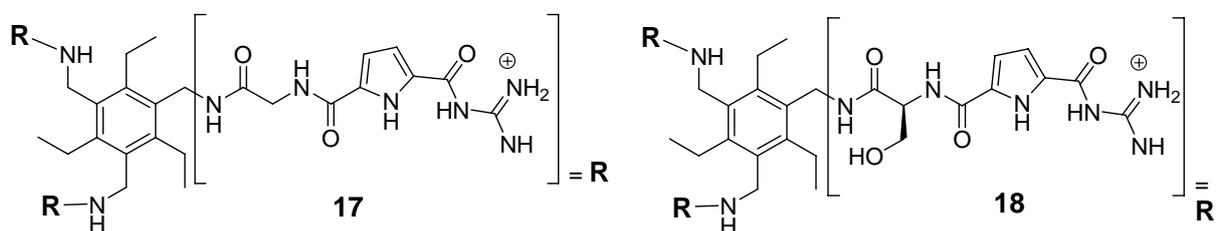


Abb. 5.4: Rezeptoren **17** und **18** zur Komplexierung von (anionischen) Zuckern.

Für diese beiden Rezeptoren wurden erste Bindungsstudien durchgeführt. Dabei zeigten UV-Titrationen eine Komplexierung der Uronsäuren durch Rezeptor **18**. Allerdings konnten keine genauen Bindungskonstanten bestimmt werden, da die durch die Komplexierung hervorgerufenen Änderungen der Absorption zu gering waren. Mit NMR-Bindungsstudien konnten vergleichbare Bindungskonstanten für Rezeptor **18** für die Uronsäuren wie bei der Komplexierung durch Rezeptor **8** gefunden werden.

In einem weiteren Projekt wurde eine Synthese für eine neuartige Acylguanidinium-Kopfgruppe **121** entwickelt, mit der eine enantioselektive Erkennung von (Aminosäure-)carboxylaten erreicht werden soll. Ausgehend von Äpfelsäure **109** wurde das geschützte cyclische Acylguanidin in einer vierstufigen Synthese mit einer Ausbeute von 35 % dargestellt.

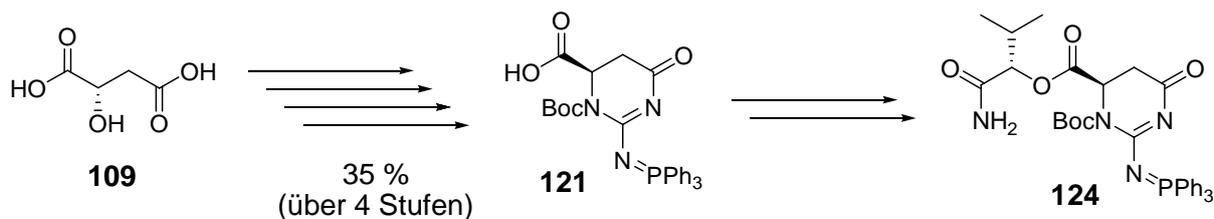


Abb. 5.5: Synthese des cyclischen Acylguanidin-Bausteins **121** über eine vierstufige Synthese ausgehend von Äpfelsäure **109** und Synthese des Rezeptors **124**.

Mit diesem Baustein und Valinamid wurde der Rezeptor **124** hergestellt, mit dem die ersten Bindungsstudien durchgeführt wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor **124** in 60 % DMSO/D₂O mit $K_{\text{Ass}} = 5200 \text{ M}^{-1}$ eine um den Faktor 3 höhere Bindungskonstante als das Guanidiniocarbonylpyrrol **45** ($K_{\text{Ass}} = 1610 \text{ M}^{-1}$) bei der Komplexbildung von Alanincarboxylat aufweist.

Selbst bei einem Wasseranteil von 70 % in Wasser/DMSO zeigt der Rezeptor **124** für *L*-Ala noch eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 394 \text{ M}^{-1}$. Außerdem erkennt man, dass der Rezeptor zwischen verschiedenen Aminosäuren differenziert. Die aliphatischen Aminosäuren Valin und Alanin werden mit $K_{\text{Ass}} = 400\text{-}500 \text{ M}^{-1}$ besser gebunden als die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan mit $K_{\text{Ass}} = 300\text{-}400 \text{ M}^{-1}$. Dies lässt darauf schließen, dass der sterische Anspruch der Aminosäuren einen Einfluss auf die Bindung zu haben scheint. Zusätzlich werden die *D*-Aminosäuren mit einer geringen Selektivität bevorzugt vor den *L*-Aminosäuren gebunden. Dieser Faktor liegt bei den aliphatischen Aminosäuren zwar nur bei ca. 20 %, steigt für die aromatischen Aminosäuren aber auf fast 50 % für Phe an. Dies bestätigt die Hypothese, dass der sterische Anspruch der Aminosäuren einen Einfluss auf die Selektivität bei der Komplexbildung hat.

Somit konnte gezeigt werden, dass das neuartige cyclische Acylguanidin-Bindungsmotiv eine effektive, teils selektive Komplexbildung von verschiedenen (enantiomeren) Aminosäuren in sehr polaren Lösemittelgemischen ermöglichen kann.

6 Ausblick

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten verschiedene multivalente Rezeptoren zur Komplexierung von biologisch relevanten (poly-)anionischen Substraten hergestellt werden. Während die physikalischen Untersuchungen an Polycarboxylaten und anionischen Zuckern mit Rezeptor **8** erfolgreich durchgeführt wurden, konnten für die größeren Rezeptoren **17** und **18** mit Aminosäurelinkern keine Bindungskonstanten aufgrund zu geringer spektroskopischer Änderungen durch die Komplexierung für anionische Zucker bestimmt werden. Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung der Bindungskonstanten bei derartigen Systemen sind die *indicator displacement assays* (Siehe Kapitel 3.4.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits verschiedene Indikatoren **52** und **126-128** (siehe Abb. 6.1) auf ihre Wirksamkeit bei der Komplexierung von multivalenten Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren getestet, es konnte aber kein wirksames System zur Bestimmung von Bindungskonstanten nach dieser Methode entwickelt werden. Ein Indikator, mit dem ein *IDA* erfolgreich durchgeführt werden kann, könnte auch bei den oben beschriebenen spektroskopischen Eigenschaften die Bestimmung von Bindungskonstanten ermöglichen

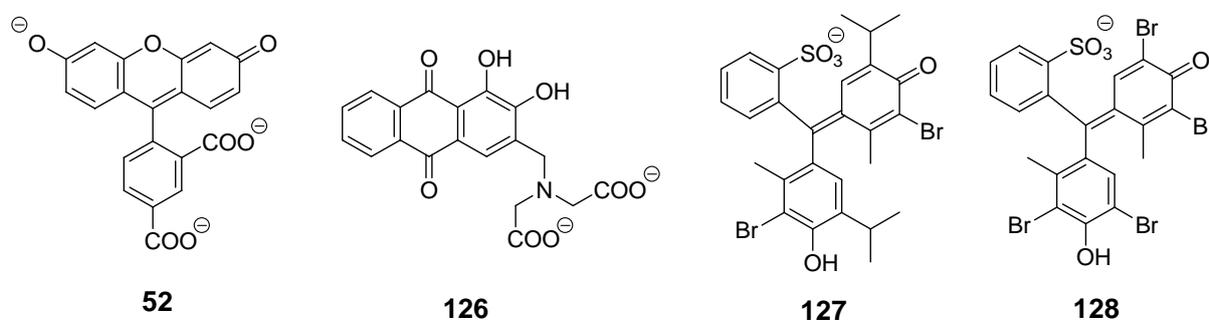


Abb. 6.1: Verschiedene Indikatoren, die bereits auf ihre Wirksamkeit für *indicator displacement assays* für multivalente Guanidiniocarbonylpyrrole untersucht wurden.

Da im Rahmen dieser Arbeit herausgefunden wurde, dass die multivalenten Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren sensibel auf die Konzentration von einfachen Anionen wie Chlorid reagieren, könnte eine Entwicklung eines Assays mit diesen Rezeptoren zur Bestimmung von verschiedenen einfachen Anionen möglich sein. Deswegen wurden erste Versuche unternommen, den Rezeptor **18** als Anionensensor einzusetzen. In Lösemitteln wie DMSO, Methanol oder Wasser konnten aber aufgrund der zu geringen Änderungen in den UV- und Fluoreszenz-

Spektren keine Bindungskonstanten bestimmt werden. In Acetonitril konnten allerdings große Quenching-Effekte der Fluoreszenz des Rezeptors für verschiedene Anionen beobachtet werden. Die Bindungsisotherme der Titration von Rezeptor **18** mit K_2HPO_4 in 90 % Acetonitril/Wasser ist in Abb. 6.2 gezeigt. Hier konnte eine sehr hohe Bindungskonstante von $K_{Ass} = 66000 M^{-1}$ bestimmt werden. Als nächstes müssten dann verschiedenen Anionen wie Sulfat, Acetat, Nitrat oder verschiedene Halogenide auf ihre Wirksamkeit bei der Komplexbildung durch Rezeptor **18** getestet werden, um zu zeigen, ob es eine Selektivität für verschiedene Anionen gibt. Aufgrund der sehr hohen Bindungskonstante für Phosphat ist dieses System sehr Erfolg versprechend im Einsatz als Anionensensor.

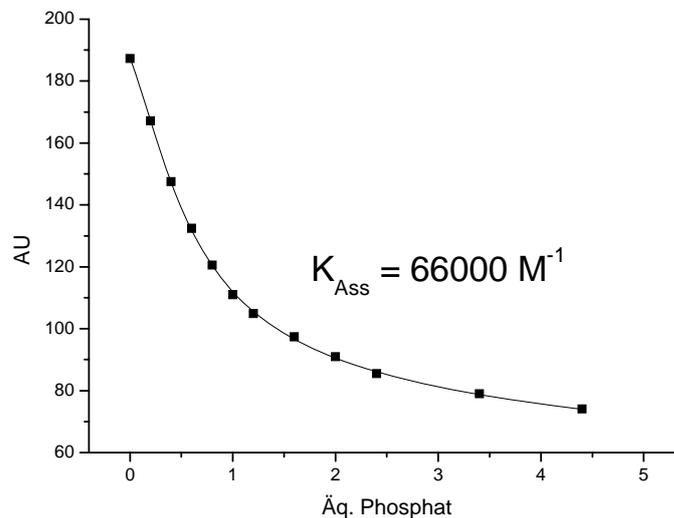


Abb. 6.2: Bindungsisotherme des Rezeptors **18** ($3 \cdot 10^{-5} M$) bei $\lambda = 340 nm$ von der Fluoreszenz-Titration mit Dikaliumhydrogenphosphat ($1.2 mM$) in 90 % Acetonitril/Wasser. Die Linie zeigt die berechnete Kurvenanpassung an die experimentellen Daten (■).

Da erste Bindungsstudien mit den hier entwickelten multivalenten Rezeptoren eine Komplexierung von Zuckern in DMSO zeigten, könnte ein kombinatorischer Ansatz zur Herstellung einer großen Menge an Rezeptoren verwendet werden. Mit dieser Methode können in kurzer Zeit viele Rezeptoren dargestellt und auf ihre Wirksamkeit gegenüber Zuckern getestet werden. In Anlehnung an die Natur, in der Lectine, die größtenteils aus Aminosäuren bestehen, die Komplexierung von Zuckern ermöglichen, sollten diese Rezeptoren nicht nur aus Guanidiniocarbonylpyrrolen wie bei den in dieser Arbeit dargestellten Systemen bestehen, sondern auch aus Aminosäuren, die kombinatorisch variiert werden können. In Abb. 6.3 ist der Aufbau

eines derartigen Rezeptors **129** aufgezeigt. Dafür müsste zunächst ein Arm des Rezeptors am Harz aufgebaut werden und dann das Templat mit zwei orthogonalen Schutzgruppen an das Harz gebracht werden. In den folgenden Schritten könnten die beiden anderen Arme kombinatorisch aufgebaut werden. Auf diese Art und Weise könnten dann z.B. durch eine split and mix Synthese eine Bibliothek von Rezeptoren dargestellt werden, die auf ihre Wirksamkeit zur Komplexierung von Zuckern geprüft werden könnten.

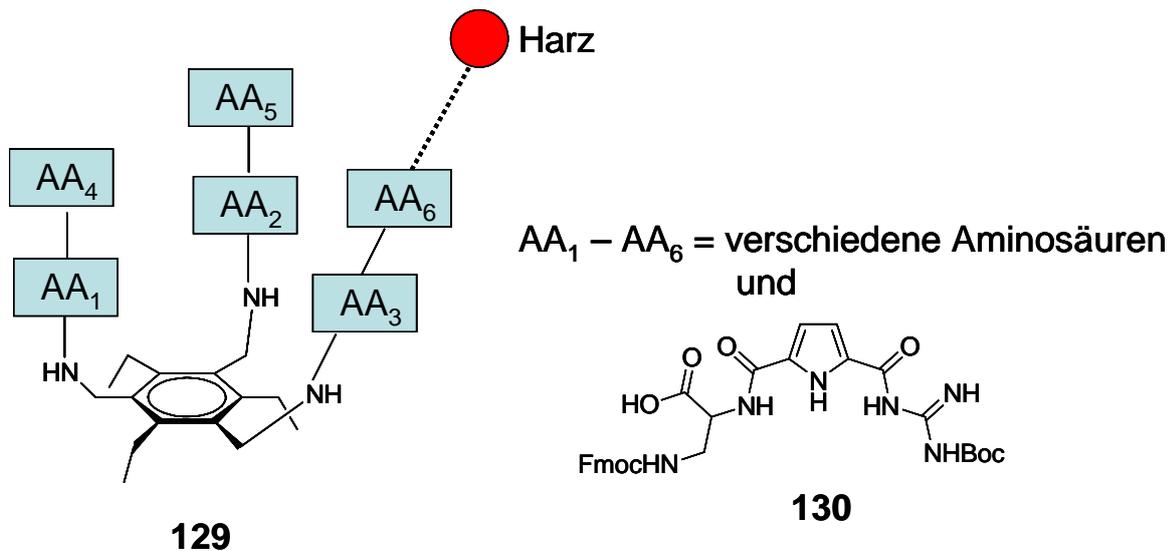


Abb. 6.3: Darstellung zur kombinatorischen Synthese eines Rezeptors **129** zur Komplexierung von Zuckern aufgebaut aus verschiedenen natürlichen Aminosäuren und der unnatürlichen Aminosäure **130**.

In einem weiteren Projekt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Synthese einer neuartigen Kopfgruppe **121** für die enantioselektive Komplexierung von Aminosäuren und kleinen Peptiden entwickelt werden. Mit einem einfachen Rezeptor **124** wurden bereits erste Bindungsstudien durchgeführt, die eine geringe Selektivität für die *D*- gegenüber den *L*-Aminosäuren aufwiesen. Da dieser Rezeptor aber keine Fluoreszenz- und UV-Aktivität aufweist, konnten bisher nur Bindungskonstanten mittels NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Interessant wäre deswegen die Synthese eines Fluoreszenz- und/oder UV-aktiven Rezeptors, der zusätzlich mit diesen Methoden auf seine Bindungseigenschaften untersucht werden könnte, da diese weniger zeitaufwendig sind als die NMR-Spektroskopie (weitere Vorteile siehe Kapitel 3.4.2). Hierfür könnte man eine Aminosäure an das cyclische Acylguanidin anbringen, die die oben genannten Eigenschaften in sich vereinigt und mit der vielleicht sogar eine Detektion von enantiomeren Aminosäuren nach der naked-eye-

Methode möglich ist. Eine Möglichkeit für einen derartigen Rezeptor **130** ist Abb. 6.4 gezeigt, der aus dem neuartigen Bindungsmotiv und einer Dansylmarkierten Aminosäure besteht. Der möglicherweise größere sterische Anspruch dieses Rezeptors im Gegensatz zum Valin-substituierten Rezeptor **124** könnte zusätzlich auch noch einmal die Selektivität gegenüber *D/L*-Aminosäuren erhöhen. Um den sterischen Anspruch des Rezeptors zu vergrößern und damit die Selektivität vielleicht weiter zu verbessern, könnte zusätzlich ein Rezeptor **131** dargestellt werden, bei dem nach der Kupplung des Bausteins **121** mit der Dansyl-Aminosäure nur die Boc-Gruppe entschützt wird. So würde man Rezeptor **131** erhalten, der vielleicht durch den hohen sterischen Anspruch der Triphenylphosphan-Gruppe noch einmal eine verbesserte stereochemische Diskriminierung von Aminosäuren aufweisen könnte.

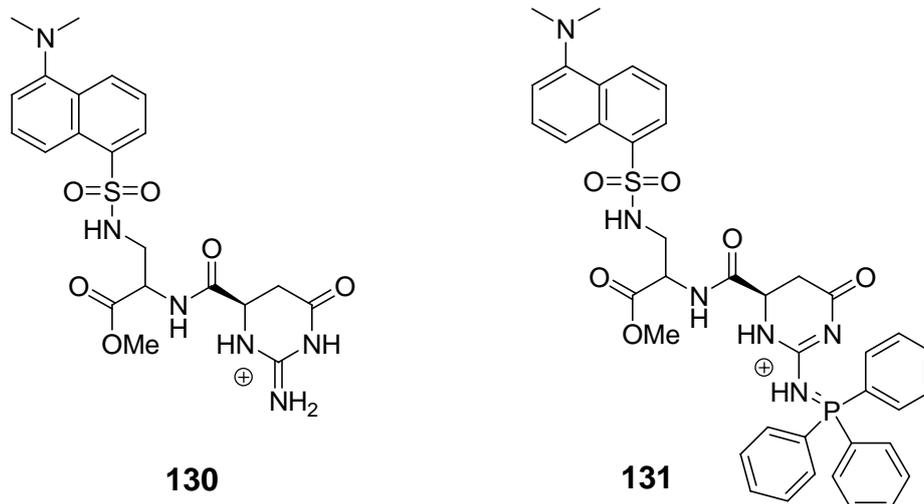


Abb. 6.4: Mögliche Fluoreszenz- und UV-aktive Rezeptoren zur enantioselektiven Komplexierung von Aminosäuren.

Das neuartige Acylguanidin-Bindungsmotiv kann auch noch als Kopfgruppe eines peptidischen Rezeptors zur enantioselektiven Erkennung von kleinen Peptiden verwendet werden. Durch die Ausbildung einer β -Faltblatt-Struktur durch die Peptidteile könnten Rezeptor und Substrat fixiert werden, so dass vielleicht eine enantioselektive Erkennung der C-terminalen Aminosäure durch die cyclische Acylguanidin-Kopfgruppe ermöglicht wird (siehe Abb. 6.5). Die Aminosäuren im Rezeptor könnten durch einen kombinatorischen Ansatz variiert werden, um die bestmögliche Selektivität für ein bestimmtes biologisch relevantes Peptid zu erreichen.

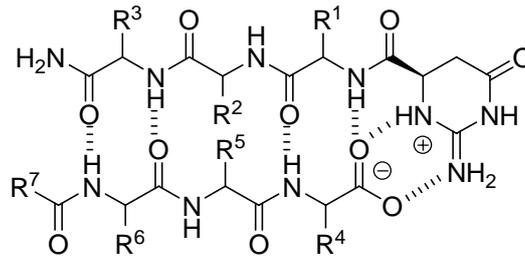


Abb. 6.5: Schema zur enantioselektiven Komplexierung kleiner Peptide durch einen peptidischen Rezeptor auf Basis des neuartigen Acylguanidin-Bindungsmotives.

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Rezeptoren zur molekularen Erkennung von kleinen biologisch relevanten Substraten in wässrigen Medien können die Grundlagen für die Entwicklung neuer, besserer Rezeptoren bilden. Z.B. können die Rezeptoren durch eine kombinatorische Festphasensynthese so variiert werden, dass bestimmte Substrate mit hoher Affinität und Selektivität erkannt werden können. Diese so optimierten Rezeptoren könnten dann vielleicht als Sensoren für biologisch relevante Substrate *in vitro* oder auch *in vivo* eingesetzt werden.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeiner experimenteller Teil

Lösemittel:

Alle Lösemittel wurden vor Gebrauch destilliert und getrocknet.^[120] So wurden folgende Lösemittel nach Erhitzen mit den unten genannten Trockenmitteln im Rückfluss und anschließendem Destillieren erhalten:

- NMM, Triethylamin, DCM und DMF (bei vermindertem Druck) mit CaH_2
- Diethylether und THF mit Natrium und Benzophenon als Indikator
- MeOH mit Magnesium-Spänen.

Schutzgas:

Als Schutzgase wurden Argon (99.998 %) und Stickstoff (99.996 %) der Firma *Linde* verwendet. Diese wurden vor Gebrauch mit einem Trockenturm, befüllt mit CaCl_2 und Blaugel, getrocknet.

Dünnschichtchromatographie (DC):

- *Macherey-Nagel* POLYGRAM SIL G/UV254 (40 × 80 mm Folien, 0.25 mm Schichtdicke).
- *Macherey-Nagel* AluGRAM RP-18 W/UV254 (20 × 20 cm Folien, 0.15 mm Schichtdicke) auf die benötigte Größe zugeschnitten.

Laufmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Die Detektion erfolgte entweder über UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) oder bei schwach oder nicht UV-aktiven Substanzen durch Anfärben mit einer sauren Ninhydrin-Lösung in Ethanol (Amine bzw. Aminosäuren), mit einer Molybdophosphorsäure-Lösung in Ethanol (allg. anwendbar) oder durch Anfärben in einer Iod-Kammer.

Säulenchromatographie:

- *Macherey-Nagel* MN-Kieselgel 60, 0.040 – 0.063 mm / 230 – 240 mesh ASTM
- *Biomedicals GmbH* ICN Silica Kieselgel, 0.032 – 0.063 mm.

Laufmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Je nach Trennproblem wurden Säulen verschiedener Dicke und Länge verwendet. Dazu wurde das Silicagel im Laufmittel aufgeschlämmt und mit weiterem Laufmittel konditioniert. Bei allen Säulen wurde die Laufgeschwindigkeit mit Druckluft beschleunigt.^[121]

Analytische bzw. semipräperative “High performance liquid chromatography“ (HPLC):

Gerät:

Dionex HPLC-Anlage bestehend aus: P680 HPLC-Pumpe, ASI-100 Automated Sample Injector und UVD 340U UV Detektor.

Säulen:

- *Supelcosil* LC-18 Reversed Phase, 25 cm x 4.6 mm 5 µm
- *Supelcosil* LC-18 Reversed Phase, 25 cm x 10 mm 5 µm

Als Laufmittel wurden käuflich erwerbliche Lösemittel in HPLC-Qualität verwendet, die vor Gebrauch im Ultraschallbad entgast wurden. Lösemittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

Präperative “Medium Performance liquid chromatography“ (MPLC):

Gerät:

Isco, Inc. Combi Flash

Säulen:

- *RediSep* C-18 reversed Phase 43 g und 4 g
- *RediSep* Silicagel 43 g und 12 g

Als Laufmittel wurden destillierte Lösemittel verwendet. Lösemittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

Kernresonanzspektroskopie (NMR):

Geräte:

- Bruker Avance AC 400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz)
- Bruker Avance DMX 600 (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz)

Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm), die Kopplungskonstanten in Hertz (Hz) angegeben. Das jeweils verwendete Lösemittel ist separat aufgeführt. Die Aufspaltungen der einzelnen Signale sind wie folgt abgekürzt: s = Singulett, brs = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett und m = Multiplett. Alle ^{13}C -NMR-Spektren wurden unter Breitbandentkopplung gemessen. Die Spektren wurden in erster Ordnung interpretiert. Die Zuordnung der Signale erfolgte entweder durch zusätzlich Experimente wie DEPT135, H-H-Cosy, HMQC, etc. oder durch Vergleich mit der gängigen Literatur.^[122-124]

FT-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR):

Gerät:

Perkin-Elmer FT-IR 1600 Spektrometer

Die Lagen der Banden sind in Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben, die Intensitäten wurden wie folgt abgekürzt: vs = very strong, s = strong, m = medium, w = weak und br = broad.^[124,125]

Ultraviolett-Spektroskopie:

Gerät:

Jasco V 530 Spektrometer

Alle Messungen wurde bei Raumtemperatur in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm der Firma Hellma durchgeführt.

Fluoreszenz-Spektroskopie:

Gerät:

Jasco FP 6500 Spektrometer

Alle Messungen wurde bei Raumtemperatur in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm der Firma Hellma durchgeführt.

Massenspektrometrie:

Gerät:

- *Finnigan* MAT 900 S Massenspektrometer
- *Bruker Daltonics* Micro-TOF Fokus Spektrometer

Die Zuordnungen wurden mit der gängigen Literatur vorgenommen.^[126] Als Molekülpeak M sind jeweils die neutralen Verbindungen ohne Gegenion angegeben.

Schmelzpunktbestimmung (Smp.)

Gerät:

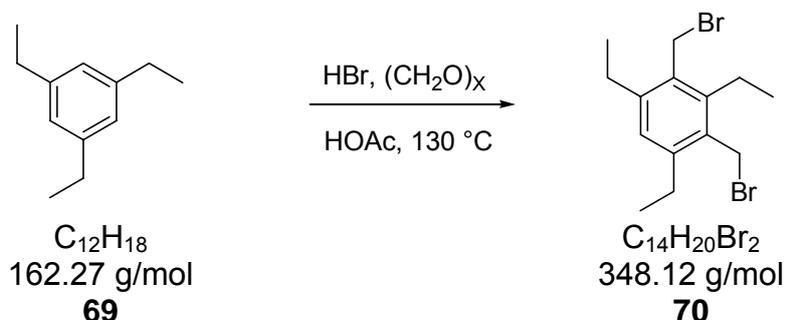
Büchi Schmelzpunktbestimmungsapparat SMP-20

Die Messung wurde in offenen Schmelzpunktröhrchen durchgeführt, die Ergebnisse sind nicht korrigiert

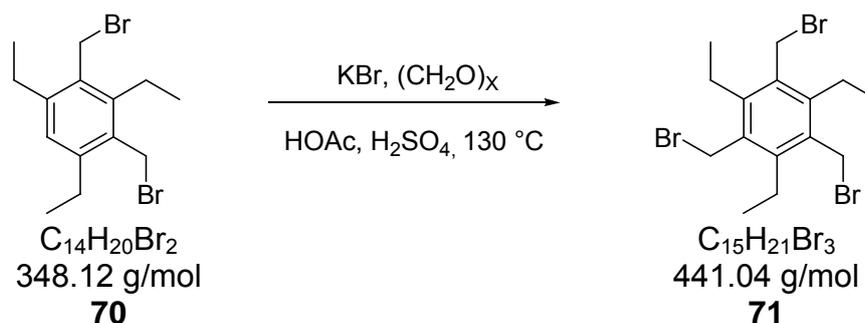
7.2 Synthese des Rezeptors 8

7.2.1 Synthese des Triamin-Templats 6

1,3,5-Tris(bromomethyl)-2,4,6-triethylbenzol **71**^[61]



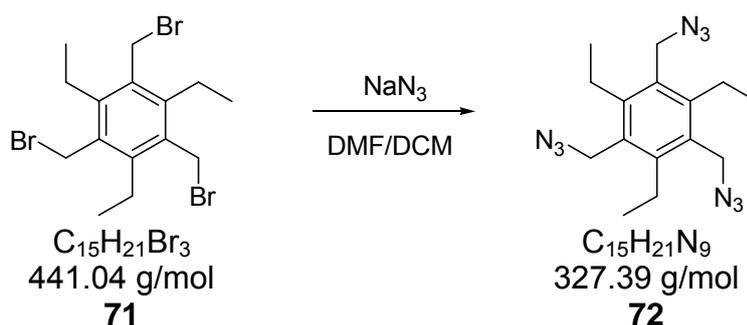
Triethylbenzol **69** (5.00 g, 31.0 mmol) und Para-Formaldehyd (3.10 g, 103 mmol) wurden in Eisessig (18 ml) suspendiert und anschließend auf 130 °C erhitzt. Bei Erreichen dieser Temperatur wurde Bromwasserstoff in Essigsäure (22 ml, 33 %ig) hinzugegeben und die Lösung für 18 Stunden gerührt. Das braune Reaktionsgemisch wurde auf Eis gegossen und der resultierende Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Natriumcarbonat auf pH 7 eingestellt und anschließend mit DCM (dreimal mit jeweils 50 ml) extrahiert. Die organischen Extrakte und der abfiltrierte Feststoff wurden vereinigt und die resultierende Lösung solange mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, bis kein CO₂ mehr entwich. Die Lösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Der resultierende braune Feststoff wurde ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Schritt eingesetzt.



Die nicht gereinigte Vorstufe **70**, Para-Formaldehyd (4.10 g, 138 mmol) und Kaliumbromid (16.4 g, 138 mmol) wurden in Eisessig (35 ml) suspendiert und das Reaktionsgemisch auf 130 °C erhitzt. Zu diesem Zeitpunkt wurden Eisessig (8 ml) und Schwefelsäure (12 ml) hinzugegeben und die resultierende Lösung über Nacht gerührt. Das braune Reaktionsgemisch wurde auf Eis gegossen und die Lösung mit Natriumcarbonat auf pH 5 eingestellt. Diese wurde mit DCM (dreimal mit jeweils 25 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen solange mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, bis kein CO₂ mehr entwich. Die Lösung wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Der resultierende braune Feststoff wurde säulenchromatographisch (SiO₂, Hexan/DCM = 98/2) gereinigt und man erhielt **71** (6.17 g, 14.0 mmol, 45 %) als leicht braunen Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.37 (t, 9H, ³J = 7.4 Hz, CH₂-CH₃), 2.97 (q, 6H, ³J = 7.4 Hz, CH₂-CH₃), 4.61 (s, 6H, CH₂-Br);

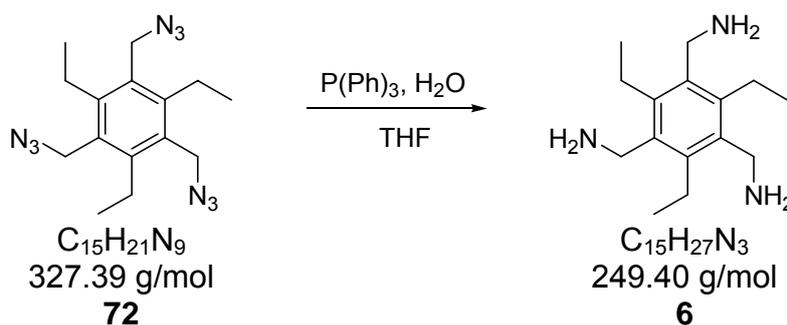
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 15.7 (CH₂-CH₃), 22.9 (CH₂-CH₃), 28.7 (CH₂-Br), 132.8, 145.2 (Aryl-C_q);

1,3,5-Tris(azidomethyl)-2,4,6-triethylbenzol 72 (Anslyn-Route)^[61]

Das Tribromid **71** (1.00 g, 2.30 mmol) wurde in DCM (5 ml) und DMF (10 ml) gelöst und auf 80 °C erhitzt. Hierzu wurde eine Lösung von Natriumazid (3.00 g, 46.0 mmol) in Wasser (5 ml) gegeben und das Reaktionsgemisch für 24 h gerührt. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt und der so entstandene Feststoff in Wasser (20 ml) suspendiert. Die Suspension wurde mit DCM (zweimal mit jeweils 20 ml) extrahiert, die organischen Phasen mit Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingedunstet. Das resultierende Öl wurde säulenchromatographisch (Flash-Säule; Ethylacetat/Hexan = 1/3) gereinigt und man erhielt **72** (0.49 g, 1.50 mol, 65 %) als weißen Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.23 (t, 9H, ³J = 7.4 Hz, CH₂-CH₃), 2.85 (q, 6H, ³J = 7.4 Hz, CH₂-CH₃), 4.97 (s, 6H, CH₂-N₃);

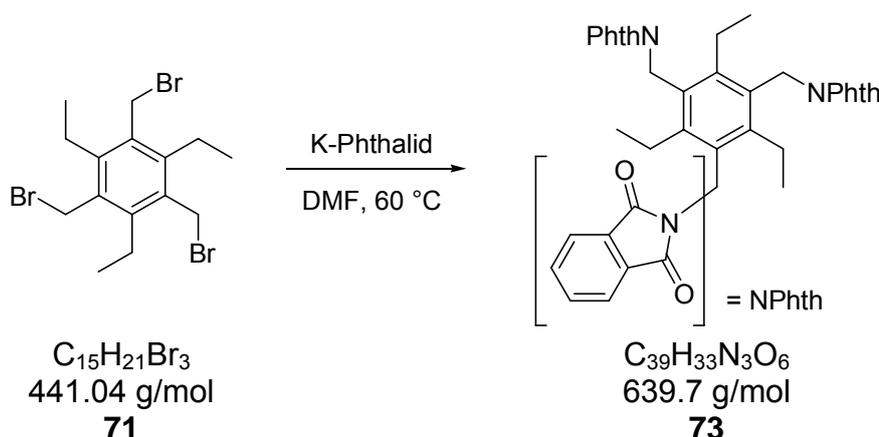
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 15.8 (CH₂-CH₃), 23.2 (CH₂-CH₃), 47.9 (CH₂-N₃), 130.0, 145.1 (Aryl-C_q).

1,3,5-Tris(aminomethyl)-2,4,6-triethylbenzol 6 (Anslyn-Route)^[61]

Das Triazid **71** (0.60 g, 1.83 mmol) und Triphenylphosphan (0.51 g, 1.83 mmol) wurden in THF (20 ml) gelöst und mit Wasser (0.4 ml) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt, anschließend am Rotationsverdampfer vom THF befreit und mit halbkonzentrierter Salzsäure (20 ml) angesäuert. Die organische Phase wurde abgetrennt und noch einmal mit halbkonzentrierter Salzsäure (20 ml) extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt, mit NaOH (0.1 N) versetzt und die basische Lösung mit DCM (dreimal mit jeweils 40 ml) extrahiert. Da zu diesem Zeitpunkt das Produkt noch nicht sauber erhalten werden konnte, wurden die vereinigten organischen Phasen mit verd. HCl (zweimal mit jeweils 50 ml) extrahiert. Die vereinigten sauren Phasen wurden mit DCM gewaschen (dreimal mit jeweils 50 ml) und anschließend lyophilisiert. So erhielt man **6** als weißen Feststoff (93.0 mg, 0.37 mmol, 20 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.23 (t, 9H, ³J = 7.4 Hz, CH₂-CH₃), 2.85 (q, 6H, ³J = 7.4 Hz, CH₂-CH₃), 4.46 (s, 6H, CH₂-NH₂), 7.26 (s, 6H, CH₂-NH₂);

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 16.1 (CH₂-CH₃), 22.7 (CH₂-CH₃), 36.9 (CH₂-NH₂), 131.4, 143.9 (Aryl-C_q).

1,3,5-Tris(phthalimidomethyl)-2,4,6-triethylbenzol 73 (Phthalimid-Route)^[91]

Das Tribromid **71** (0.20 g, 0.45 mmol) und Kalium-Phthalimid (0.33 g, 1.80 mmol) wurden in DMF (4 ml) suspendiert und für 3 h bei 60 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit wässriger Natronlauge (5 ml, 0.5 N) versetzt und anschließend mit DCM (dreimal mit jeweils 10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (10 ml) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. So erhielt man **73** (0.13 g, 0.20 mmol, 44 %) als weißen Feststoff.

Smp. 240 – 242 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.00 (t, 9H, ³J = 7.4 Hz, CH₂-CH₃), 3.13 (q, 6H, ³J = 7.4 Hz, CH₂-CH₃), 4.97 (s, 6H, CH₂-NH), 7.70 – 7.72 (m, 6H, Aryl-CH), 7.82 – 7.84 (m, 6H, Aryl-CH);

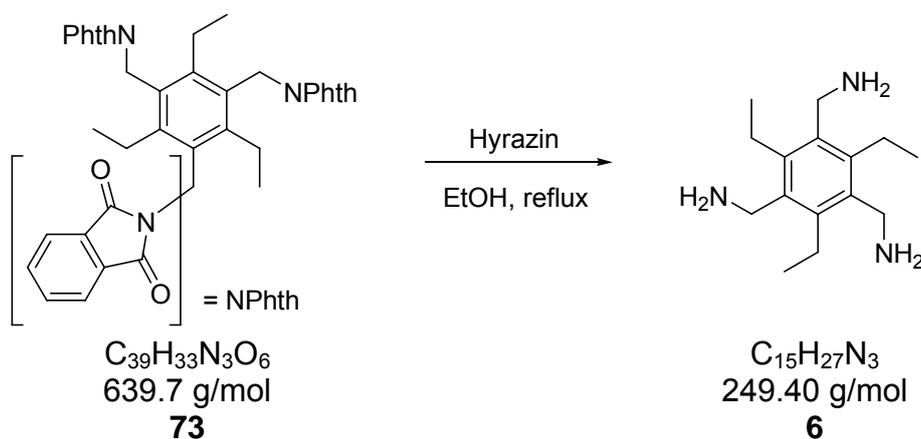
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 15.9 (CH₂-CH₃), 23.5 (CH₂-CH₃), 37.6 (CH₂-NH), 123.4 (Aryl-CH), 129.6, 132.2 (Aryl-C_q), 134.0 (Aryl-CH), 145.7 (Aryl-C_q), 168.4 (C_q);

IR (KBr-pellet) ν [cm⁻¹] = 3464 (w), 2958 (w), 2871 (w), 1775 (m), 1715 (vs), 1389 (s), 1333 (m), 1301 (m), 1109 (m), 934 (m), 720 (s);

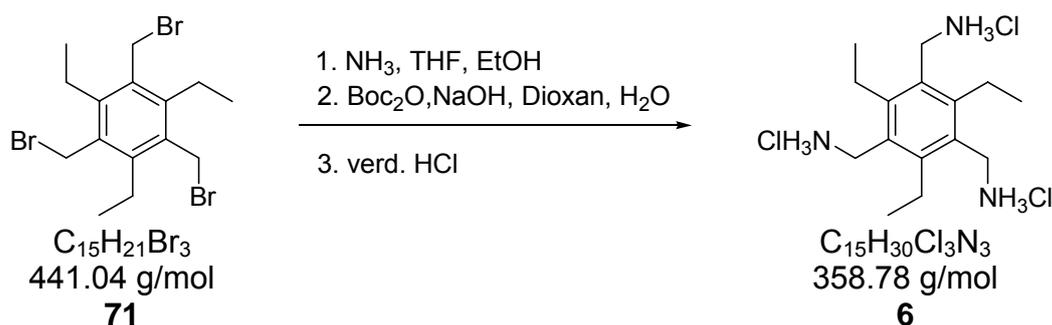
MS (pos. ESI): m/z = 662 [M+Na⁺]⁺;

HR-MS (pos. ESI): $m/z = 662.2262$ (berechnet für $C_{39}H_{33}N_3O_6 + Na^+$: 662.2262).

1,3,5-Tris(aminomethyl)-2,4,6-triethylbenzol 6 (Phthalimid-Route) ^[91]



Das Triphthalid **73** (0.10 g, 0.16 mmol) wurde in Ethanol (5 ml) gelöst und die Suspension zum Sieden erhitzt. Dazu wurde Hydrazinhydrat (15.0 mg, 0.50 mmol) gegeben und das Reaktionsgemisch für 1 h weiter erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde diese mit Salzsäure (6 N) angesäuert und wiederum für eine Stunde im Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit verd. NaOH (1 N) auf pH 10 eingestellt und mit Chloroform (dreimal mit jeweils 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (einmal mit 30 ml) gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Das Produkt **6** (< 4 mg; < 10 %) konnte so als weißer Feststoff erhalten werden.

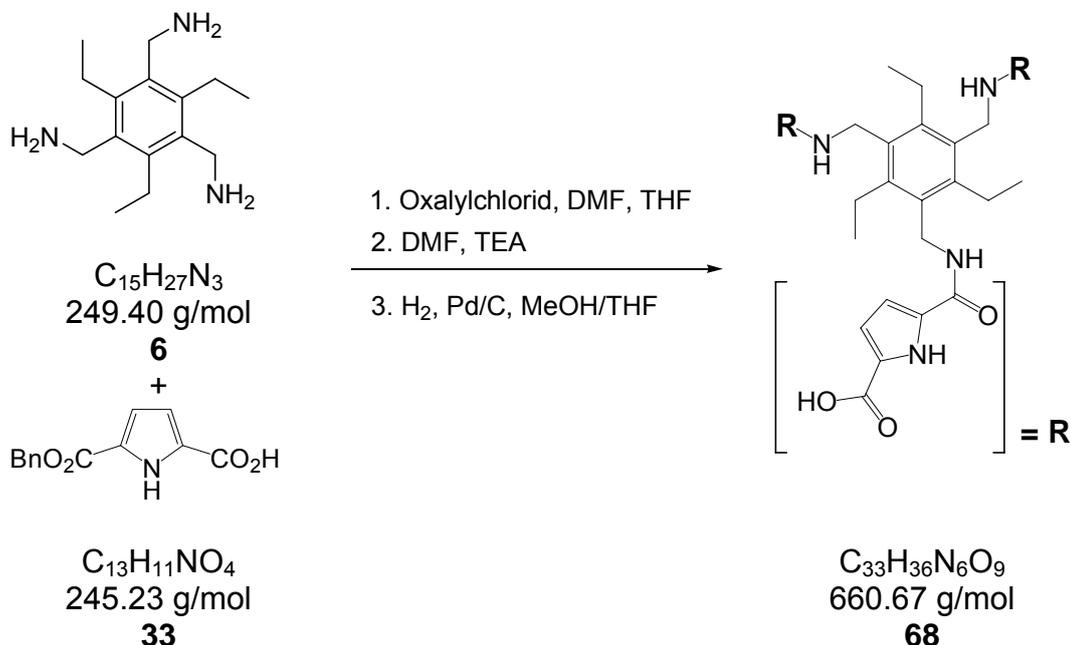
1,3,5-Tris(methyl ammonium chlorid)-2,4,6-triethylbenzol 6 (Boc-Route)

Zu einer Lösung des Tribromids **71** (1.00 g, 2.30 mmol) in THF/Ethanol (80 ml, 1/1) wurde konz. Ammoniak (40 ml) gegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der resultierende Feststoff und NaOH (0.40 g, 10.0 mmol) in Dioxan/ H_2O (40 ml, 1/1) suspendiert. Die Suspension wurde mit Boc_2O (2.18 g, 10.0 mmol) in Dioxan (20 ml) bei 0 °C über einen Zeitraum von einer Stunde versetzt und anschließend für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM (dreimal mit jeweils 30 ml) extrahiert, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der resultierende Feststoff wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Hexan/Ethylacetat/TEA = 7/3/0.1) gereinigt und man erhielt die Boc-geschützte Zwischenstufe als weißen Feststoff.

Diese wurde in DCM (20 ml) gelöst, mit TFA (4 ml) versetzt und über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das resultierende leicht gelbe Öl mit trockenem Diethylether (50 ml) versetzt, wobei ein leicht gelber Feststoff ausfiel. Dieser wurde in Salzsäure (40 ml, 0.1 M) aufgenommen und lyophilisiert. So man erhielt das Chlorid-Salz **6** als weißen Feststoff (0.50 g, 1.4 mmol, 63 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 1.09 (t, 3J = 7.4 Hz, 9H, CH_2CH_3), 2.79 (q, 3J = 7.4 Hz, 6H, CH_2CH_3), 4.02 – 4.03 (m, 6H, NH-CH_2), 8.49 (s, 3H, NH_3);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 16.1 (CH_2CH_3), 22.7 (CH_2CH_3), 36.9 (NH-CH_2), 131.4, 143.9 (Aryl- C_q).

7.2.2 Modulare Synthese des Rezeptors **8****1,3,5-Tris(5-ethylcarbamoyl-1H-pyrrol-2-carbonsäure)-2,4,6-triethylbenzol **68****
(Route 1; Säurechlorid)

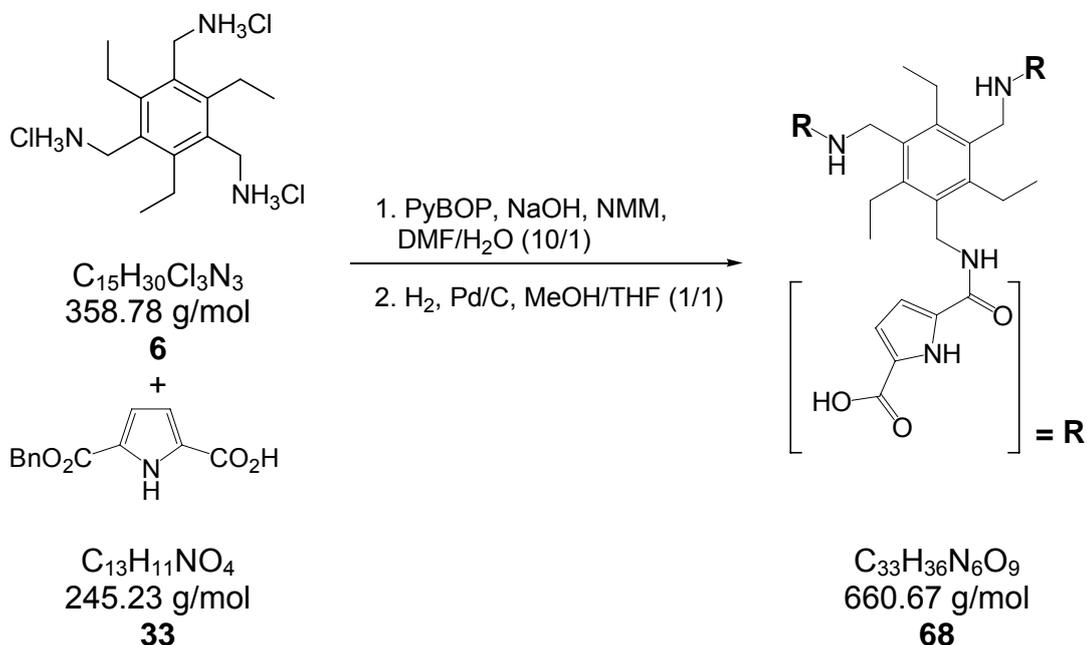
Zu einer Lösung der Pyrrolcarbonsäure **33** (0.20 g, 0.77 mmol) in THF (30 ml) wurden unter Stickstoffatmosphäre bei 0 °C Oxalylchlorid (0.11 g, 0.85 mmol) und DMF (3 Tropfen) gegeben und die Lösung für 3 h bei 50 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit und man erhielt das Säurechlorid als gelben Feststoff. Dieser wurde in DMF (15 ml) gelöst und bei 0 °C unter Stickstoffatmosphäre innerhalb einer Stunde zu einer Suspension des Triamins **6** (0.05 g, 0.20 mmol) in DMF (15 ml) und TEA (0.5 ml) getropft. Nach Rühren bei Raumtemperatur über Nacht wurde Wasser (60 ml) hinzugegeben und die entstandenen Suspension mit DCM (dreimal mit jeweils 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (zweimal mit jeweils 50 ml) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Der leicht gelbe Feststoff wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und man erhielt die geschützte Zwischenstufe als weißen Feststoff.

Der so erhaltene weiße Feststoff wurde in einer Mischung von MeOH/THF (20 ml, 1/1) gelöst, mit 10 %iger Pd/C (0.01 g) versetzt und anschließend 3 h bei 40 °C

unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde mit Hilfe von Celite abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und man hielt das Produkt **68** (0.09 g, 0.07 mmol, 70 %) als weißen Feststoff.

| | |
|---------------------------|--|
| R_f | 0.23 (geschützte Form; SiO ₂ , DCM/MeOH = 20/1); |
| Smp. | 209 – 210 °C (Zersetzung) |
| ¹H-NMR | (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 1.12 (t, 9H, ³ J = 7.4 Hz, CH ₂ -CH ₃), 2.79 – 2.81 (m, 6H, CH ₂ -CH ₃), 4.52 – 4.53 (m, 6H, CH ₂ -NH), 6.69 – 6.70 (m, 3H, Pyrrol-CH), 6.76 – 6.78 (m, 3H, Pyrrol-CH), 8.22 (s, 3H, Amid-NH), 12.07 (s, 3H, Pyrrol-NH); |
| ¹³C-NMR | (100 MHz, DMSO-d ₆) δ = 16.2 (CH ₂ -CH ₃), 22.7 (CH ₂ -CH ₃), 37.2 (CH ₂ -NH), 113.6, 114.5 (Pyrrol-CH), 125.6, 130.1 (Pyrrol-C _q), 132.4, 143.8 (Aryl-C _q), 158.8, 161.6 (C _q); |
| IR | (KBr-pellet) ν [cm ⁻¹] = 3258 (m, br.), 2971 (m, br.), 1678 (s), 1627 (m), 1559 (s), 1475 (m), 1357 (w), 1270 (s), 1196 (m), 1046 (w), 817 (w), 756 (m); |
| MS | (pos. ESI): <i>m/z</i> = 683 [M+Na ⁺] ⁺ ; |
| HR-MS | (pos. ESI): <i>m/z</i> = 683.244 (berechnet für C ₃₃ H ₃₆ N ₆ O ₉ + Na ⁺ : 683.2441); |

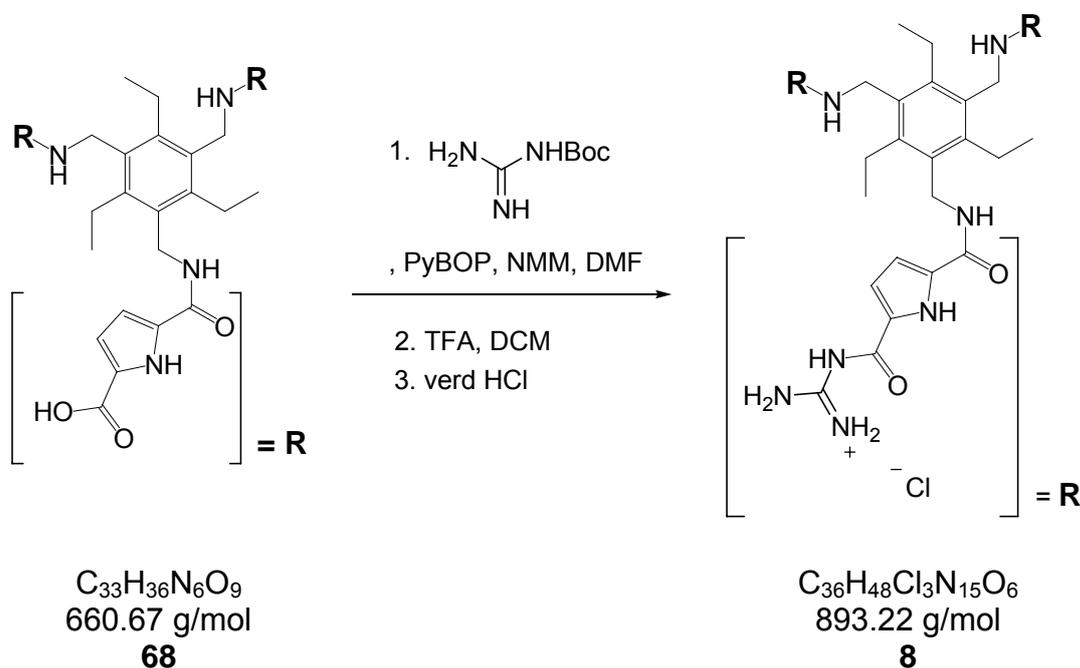
1,3,5-Tris(5-ethylcarbamoyl-1H-pyrrol-2-carbonsäure)-2,4,6-triethylbenzol 68
(Route 1; PyBOP)



Zu einer Lösung des Triamins **6** (0.03 g, 0.09 mmol) und NaOH (0.01 g, 0.27 mmol) in DMF/Wasser (10 ml, 5/1) wurden die Carbonsäure **33** (0.20 g, 0.77 mmol), PyBOP (0.4 g, 0.77 mmol), DMAP (0.04 g, 0.3 mmol) und NMM (0.5 ml) gegeben und das Reaktionsgemisch für 3 Tage bei Raumtemperatur unter Stickstoff-Atmosphäre gerührt. Die braune Lösung wurde mit Wasser (20 ml) versetzt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wurde mit DCM (dreimal mit jeweils 20 ml) extrahiert, die organischen Extrakte mit dem Feststoff vereinigt und anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Das resultierende braune Öl wurde säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und man erhielt den Benzylester als weißen Feststoff.

Dieser wurden in einer Mischung von MeOH/THF (20 ml, 1/1) gelöst, mit 10 %iger Pd/C (0.01 g) versetzt und anschließend 3 h bei 40 °C unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde mit Hilfe von Celite abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und man hielt das Produkt **68** (0.05 g, 0.07 mmol, 82 %) als weißen Feststoff.

1,3,5-Tris(5-ethylcarbamoyl-guanidiniocarbonylpyrrol chlorid)-2,4,6-Triethylbenzol 8 (Route 1)



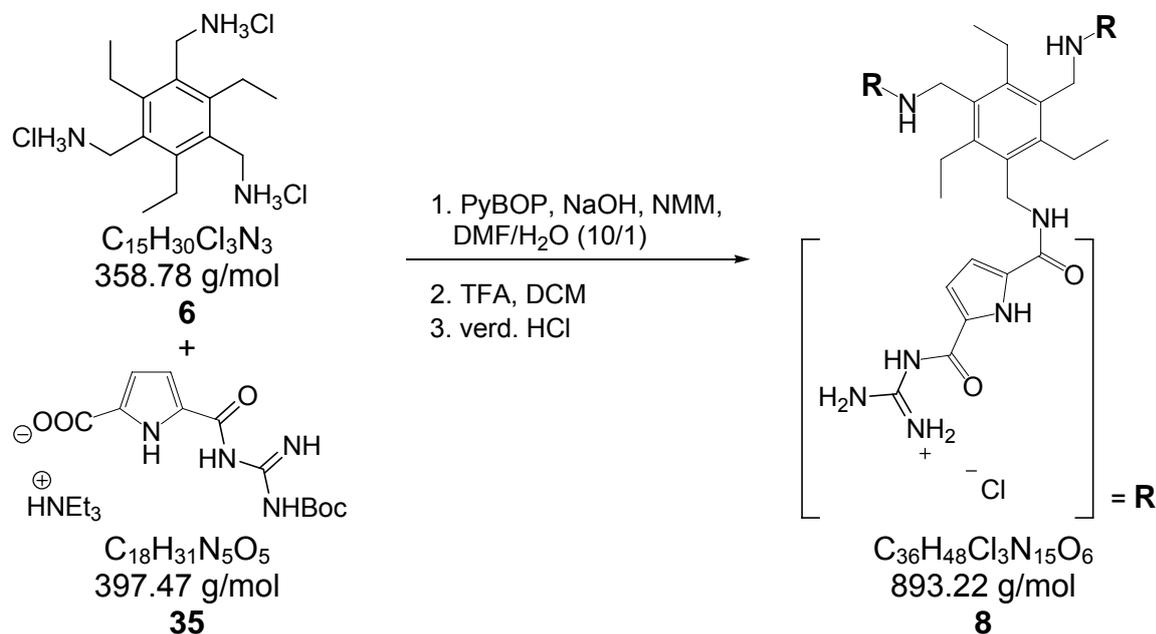
Zu einer Mischung der Tricarbonsäure **68** (0.05 g, 0.07 mmol) und NMM (0.5 ml) in DMF (10 ml) wurden PyBOP (0.33 g, 0.63 mmol) und Boc-Guanidin (0.10 g, 0.63 mmol) gegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Das braune Reaktionsgemisch wurde mit Wasser (20 ml) versetzt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Die Lösung wurde mit DCM (dreimal mit jeweils 20 ml) extrahiert, mit dem Feststoff vereint und anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Das resultierende braune Öl wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/MeOH/TEA = 30/1/0.3) gereinigt und man erhielt den geschützten Rezeptor als weißen Feststoff.

Dieser wurde in DCM (10 ml) und TFA (2 ml) gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die gelbe Lösung wurde bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Das resultierende leicht gelbe Öl wurde in HCl (20 ml, 0.1 N) gelöst und anschließend zum Entfernen der TFA lyophilisiert. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt und man erhielt das Chlorid-Salz des Rezeptors **8** (0.05 g, 0.05 mmol, 73 %) als weißen Feststoff.

7 Experimenteller Teil

| | |
|---------------------------|--|
| R_f | 0.19 (geschützte Form; SiO ₂ , DCM/MeOH/TEA = 30/1/0.3); |
| Smp. | 248 – 249 °C (Zersetzung); |
| ¹H-NMR | (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 1.14 (t, 9H, ³ J = 7.4 Hz, CH ₂ -CH ₃), 2.82 – 2.84 (m, 6H, CH ₂ -CH ₃), 4.56 (s, 6H, CH ₂ -NH), 6.91 (s, 3H, Pyrrol-CH), 7.48 (s, 3H, Pyrrol-CH), 8.42 (bs, 12H, Guanidinium-NH ₂), 8.57 (s, 3H, Amid-NH), 11.92 (s, 3H, Guanidinium-NH), 12.47 (s, 3H, Pyrrol-NH); |
| ¹³C-NMR | (100 MHz, DMSO-d ₆) δ = 16.2 (CH ₂ -CH ₃), 22.7 (CH ₂ -CH ₃), 37.2 (CH ₂ -NH), 113.6, 115.6 (Pyrrol-CH), 125.5 (Pyrrol-C _q), 131.9 (Aryl-C _q), 132.4 (Pyrrol-C _q), 143.8 (Aryl-C _q), 155.2, 158.5, 159.7 (C _q); |
| IR | (KBr-pellet) ν [cm ⁻¹] = 3258 (s, br.), 2966 (w), 1699 (s), 1636 (m), 1558 (m), 1473 (m), 1274 (s), 1195 (m), 1092 (s), 755 (w), 615 (w), 482 (m); |
| MS | (pos. ESI): <i>m/z</i> = 784 [M+H ⁺] ⁺ , 393 [M+2H ⁺] ²⁺ , 262 [M+3H ⁺] ³⁺ ; |
| HR-MS | (pos. ESI): <i>m/z</i> = 392.690 (berechnet für C ₃₆ H ₄₅ N ₁₅ O ₆ + 2H ⁺ : 392.6917). |

1,3,5-Tris(5-ethylcarbamoyl-guanidiniocarbonylpyrrol chlorid)-2,4,6-triethylbenzol **8 (Route 2)**



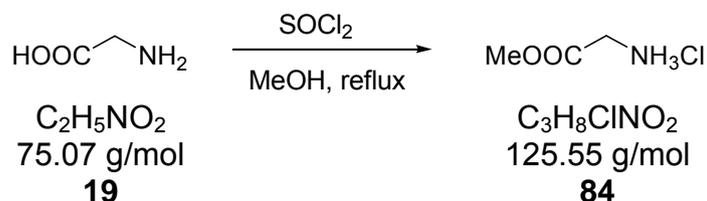
Zu einer Lösung des Triamins **6** (0.03 g, 0.09 mmol) und NaOH (0.01 g, 0.27 mmol) in DMF/Wasser (10 ml, 10/1) wurden die Carbonsäure **35** (0.32 g, 0.81 mmol), PyBOP (0.42 g, 0.81 mmol), DMAP (0.04 g, 0.3 mmol) und NMM (0.5 ml) gegeben und das Reaktionsgemisch für 3 Tage bei Raumtemperatur unter Stickstoff-Atmosphäre gerührt. Die braune Lösung wurde mit Wasser (20 ml) versetzt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Die Lösung wurde mit DCM (dreimal mit jeweils 20 ml) extrahiert, die organischen Extrakte mit dem Feststoff vereinigt und anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Das resultierende braune Öl wurde säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und man erhielt das geschützte Produkt als weißen Feststoff.

Dieser wurde in DCM (20 ml) und TFA (4 ml) aufgenommen und die entstandene Lösung über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit und das leicht gelbe Öl mit Diethylether versetzt, wobei eine weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde in HCl (20 ml, 0.1 N) gelöst und anschließend zum Entfernen der TFA lyophilisiert. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt und man erhielt das Chlorid-Salz des Rezeptors **8** (52.5 mg, 0.06 mmol, 65 %) als weißen Feststoff.

7.3 Synthese des Rezeptors 17

7.3.1 Synthese der Edukte

Glycinmethylester **84** (Route 1)^[104]

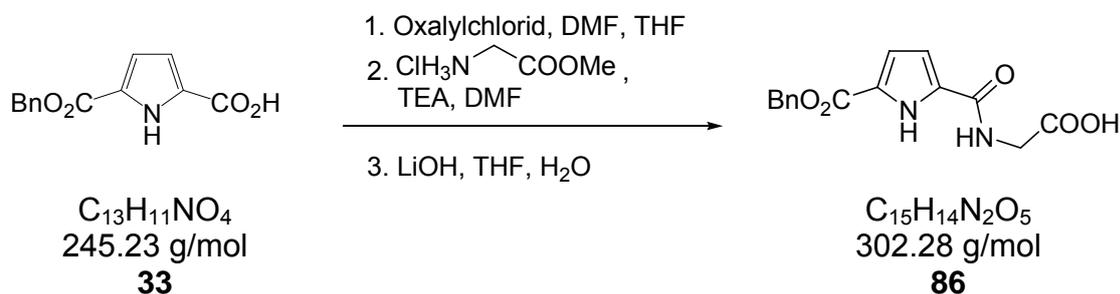


Zu einer Suspension von Glycin **19** (6.40 g, 85.3 mmol) in absolutem MeOH (100 ml) wurde über einen Zeitraum von einer Stunde Thionylchlorid (11.2 g, 93.8 mmol) getropft. Die Suspension wurde 5 h im Rückfluss erhitzt und die erhaltene klare Lösung am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Der weiße Feststoff wurde aus MeOH umkristallisiert und man erhielt den Methylester **84** (10.2 g, 81.2 mmol, 95 % Ausbeute) in Form von weißen Nadeln.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (s, 2H, CH₂), 8.60 (s, 3H, NH₃);

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 39.6 (CH₂), 52.7 (OCH₃), 168.2 (C_q).

2-(Benzyl 5-carbamoyl-1H-pyrrol-2-carboxyloyl)essigsäure **86 (Route1; Oxalylchlorid)**



Zu einer Lösung der Pyrrolcarbonsäure **33** (2.00 g, 7.70 mmol) in THF (50 ml) wurden unter Stickstoffatmosphäre bei 0 °C Oxalylchlorid (1.96 g, 15.4 mmol) und DMF (3 Tropfen) gegeben und die Lösung für 3 h bei 50 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit und man erhielt das Säurechlorid als gelben Feststoff. Dieser wurde in DMF (20 ml) gelöst und bei 0 °C unter Stickstoffatmosphäre innerhalb einer Stunde zu einer Lösung von Glycinmethylester (1.93 g, 15.4 mmol) in DMF (20 ml) und TEA (5 ml) getropft. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde Wasser (80 ml) hinzugegeben und die entstandene Suspension mit Diethylether (dreimal mit jeweils 60 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen (60 ml), mit Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Der zurückgebliebene gelbe Feststoff wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/MeOH = 30/1) gereinigt und man erhielt den Methylester als weißen Feststoff.

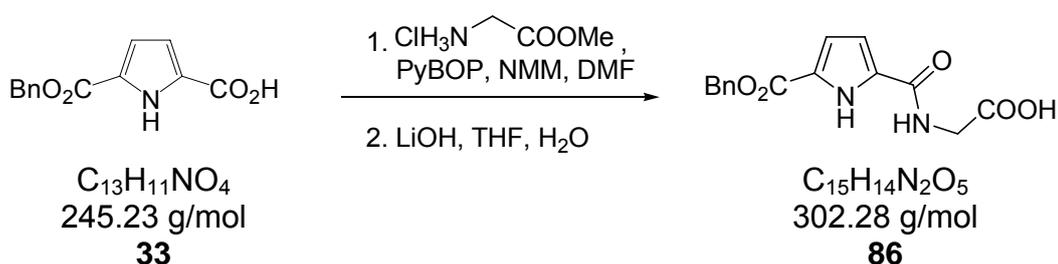
Dieser wurde in THF (50 ml) gelöst, mit LiOH (0.34 g, 7.70 mmol) in Wasser (10 ml) versetzt und anschließend über Nacht gerührt. Die Lösung wurde bei vermindertem Druck vom THF befreit, mit Wasser versetzt und mit Salzsäure (5 %ig) auf pH 4 angesäuert. So erhielt man nach Filtrieren **86** (1.48 g, 5.24 mmol, 61 %) als weißen Feststoff.

R_f 0.20 (Methylester; SiO_2 , DCM/MeOH = 30/1);

Smp. 208-210 °C (Zersetzung)

- ¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 3.93 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H, Gly-CH₂), 5.31 (s, 2H, Bz-CH₂), 6.82 – 6.87 (m, 2H, Pyrrol-CH), 7.31 – 7.42 (Ar-CH), 8.72 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H, Amid-NH), 12.28 (s, 1H, Pyrrol-NH);
- ¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 41.0 (Gly-CH₂), 65.8 (Bz-CH₂), 113.0, 115.8 (Pyrrol-CH), 124.7 (Pyrrol-C_q), 128.3 – 128.8 (Aryl-CH), 131.1 (Pyrrol-C_q), 136.6 (Aryl-C_q), 160.0, 160.2, 171.6 (C_q);
- IR** (KBr-pellet) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3371 (s), 3287 (s), 3129 (w), 2967 (w), 1711 (vs), 1642 (s), 1564 (s), 1325 (m), 1275 (m), 1232 (s), 997 (m), 773 (m);
- MS** (neg. ESI): m/z = 301.1 [M-H⁺], 257.1 [M-CO₂-H⁺];
- HR-MS** (neg. ESI): m/z = 301.08305 (berechnet für C₁₅H₁₄N₂O₅ - H⁺: 301.083).

2-(Benzyl-5-carbamoyl-1H-pyrrol-2-carboxyloyl)essigsäure 86 (Route1; PyBOP)



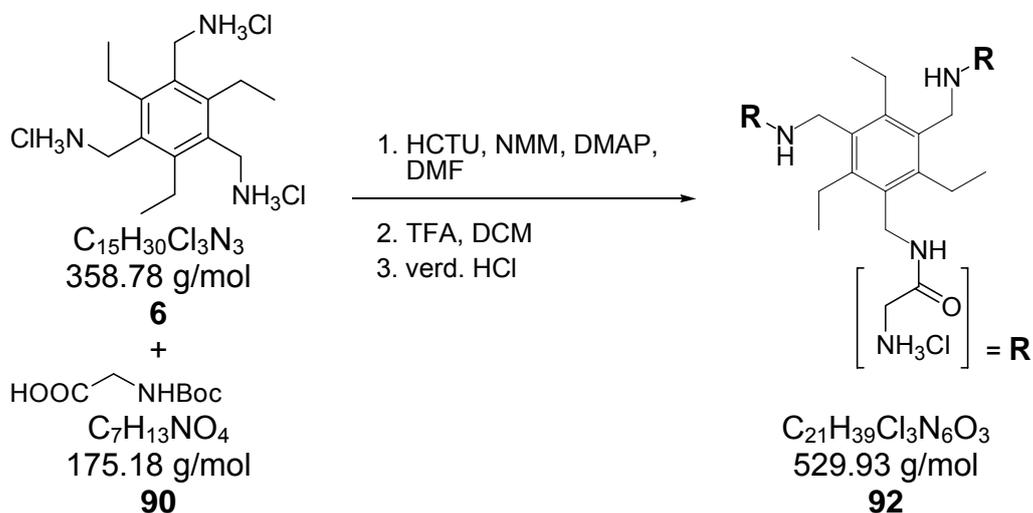
Zu einer Lösung von **33** (2.00 g, 7.70 mmol) und Glycinmethylester (1.93 g, 15.4 mmol) in NMM (2 ml) und DMF (40 ml) wurde unter Stickstoff-Atmosphäre PyBOP (4.34 g, 8.50 mmol) gegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Das orangene Reaktionsgemisch wurde mit Wasser (80 ml) versetzt, mit Diethylether (dreimal mit jeweils 60 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Diese wurden mit Magnesiumsulfat

getrocknet und am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Der zurückgebliebene ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Ethylacetat/Hexan = 1/1) gereinigt und man erhielt den Methylester als weißen Feststoff.

Dieser wurde in THF (50 ml) gelöst, mit LiOH (0.34 g, 7.70 mmol) in Wasser (10 ml) versetzt und anschließend über Nacht gerührt. Die Lösung wurde bei vermindertem Druck vom THF befreit, mit Wasser versetzt und mit Salzsäure (5 %ig) auf pH 4 angesäuert. So erhielt man nach Filtrieren **86** (1.76 g, 5.57 mmol, 72 %) als weißen Feststoff.

7.3.2 Synthese von Rezeptor 17

1,3,5-Tris((Ethylcarbamoyl)methylammoniumchlorid)-2,4,6-triethylbenzol **92** (PyBOP; Route 2)



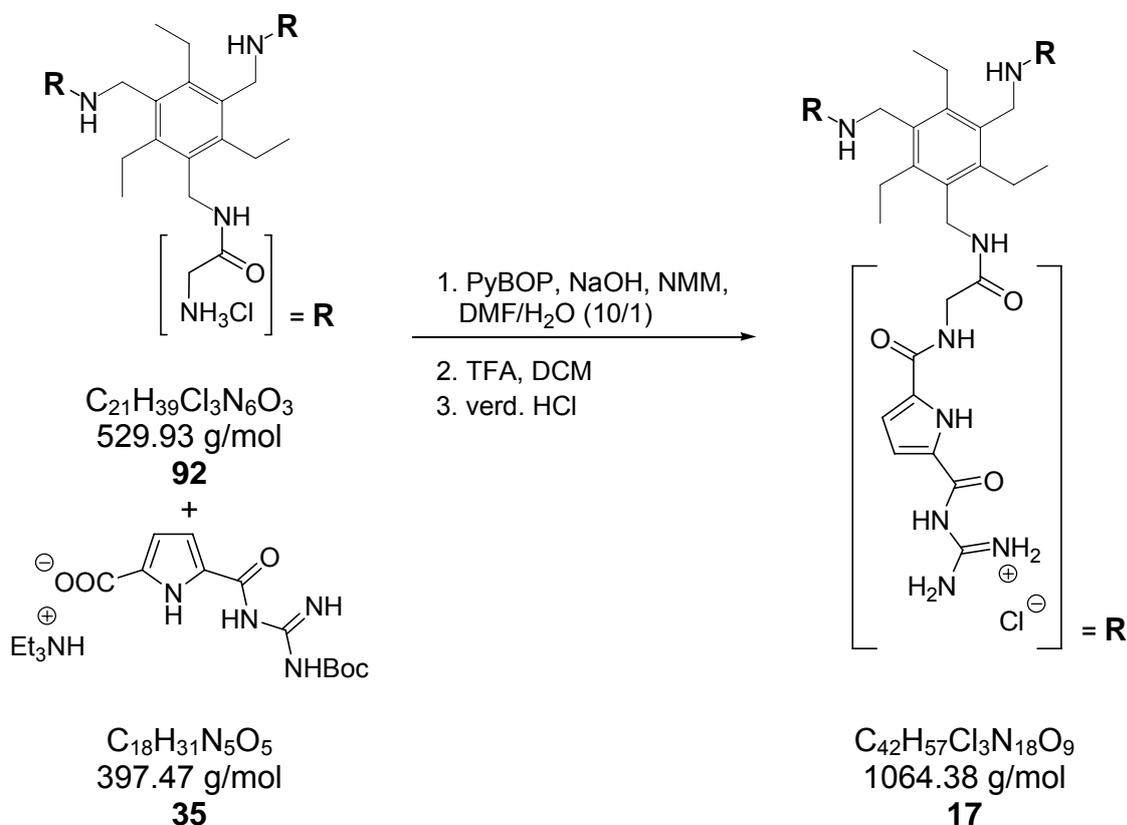
Zu einer Suspension des Triamins **6** (0.18 g, 0.50 mmol) in DCM (30 ml) und NMM (2 ml) wurden Boc-Gly-OH **90** (0.79 g, 4.50 mmol), HCTU (1.86 g, 4.50 mmol) und DMAP (0.55 g, 4.50 mmol) gegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (zweimal mit jeweils 20 ml) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösemittel

befreit. Das so erhaltenen leicht gelbe Öl wurde säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH/TEA = 50/1/0.5) gereinigt und man erhielt das Boc-geschützte Triamin als weißen Feststoff.

Dieser wurde in DCM (30 ml) und TFA (6 ml) gelöst, für 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wurde in HCl (40 ml, 0.1 N) aufgenommen und lyophilisiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, um letzte Spuren von TFA zu entfernen, und man erhielt **92** (0.19 g, 0.36 mmol, 71.6 %) als weißen Feststoff.

| | |
|---------------------------|--|
| R_f | 0.35 (Boc-geschützte Form; SiO ₂ , DCM/MeOH/TEA = 50/1/0.5); orange nach Anfärben mit Ninhydrin-Reagenz; |
| Smp. | > 250 °C; |
| ¹H-NMR | (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 1.09 (t, 9H, ³ J = 7.4 Hz, CH ₂ -CH ₃), 2.68 (q, 6H, ³ J = 7.4 Hz, CH ₂ -CH ₃), 3.51 (s, 6H, Gly-CH ₂), 4.36 (d, 6H, ³ J = 4.4 Hz, CH ₂ -NH), 8.23 (s, 9H, CH ₂ -NH ₃), 8.52 (t, 3H, ³ J = 4.4 Hz, Amid-NH); |
| ¹³C-NMR | (100 MHz, DMSO-d ₆) δ = 16.2 (CH ₂ -CH ₃), 22.7 (CH ₂ -CH ₃), 37.4 (CH ₂ -NH), 40.2 (Gly-CH ₂), 131.7, 143.6 (Aryl-C _q), 165.7 (C _q); |
| IR | (KBr-pellet) ν [cm ⁻¹] = 3445 (m, br), 3245 (m, br), 2967 (m), 1684 (s), 1558 (s), 1260 (m), 1049 (m); |
| MS | (pos. ESI): <i>m/z</i> = 443.3 [M+Na ⁺] ⁺ ; |
| HR-MS | (pos. ESI): <i>m/z</i> = 443.2753 (berechnet für C ₂₁ H ₃₆ N ₆ O ₃ + Na ⁺ : 443.2741). |

1,3,5-Tris(5-(Ethylcarbamoyl)methylcarbamoyl-guanidiniocarbonylpyrrol chlorid)-2,4,6-triethylbenzol 17 (PyBOP; Route 2)



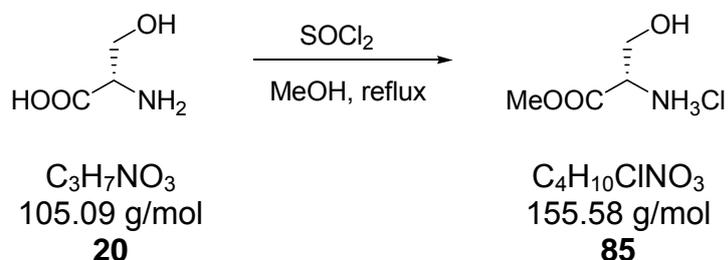
Zu einer Lösung von **92** (53.0 mg, 0.10 mmol) und DMAP (4.00 mg, 0.03 mmol) in DMF (20 ml) und NMM (1 ml) wurde die Carbonsäure **35** (0.12 g, 0,30 mmol) gegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Das orangefarbene Reaktionsgemisch wurde mit Wasser (40 ml) versetzt und der so entstandene Feststoff abfiltriert. Dieser wurde mit MeOH (10 ml) aufgenommen und mit Diethylether (50 ml) gefällt. Die so erhaltene leicht verunreinigte Zwischenstufe wurde in DCM (20 ml) und TFA (4 ml) gelöst und über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit und der leicht gelbe Feststoff säulenchromatographisch (MPLC; RP-18, MeOH/H₂O = 100/0 nach 0/100, 0.1 % TFA) gereinigt. So erhielt man **17** als weißen Feststoff (63.0 mg, 0.06 mmol, 59 %).

| | |
|---------------------------|---|
| Smp. | > 250 °C; |
| ¹H-NMR | (400MHz, DMSO-d ₆) δ = 1.09 (t, 9H, ³ J = 7.4 Hz, CH ₂ -CH ₃), 2.66 – 2.70 (m, 6H, CH ₂ -CH ₃), 3.89 (d, 6H, ³ J = 4.8 Hz, Gly-CH ₂), 4.34 (s, 6H, CH ₂ -NH), 6.88 (s, 3H, Pyrrol-CH), 7.44 (s, 3H, Pyrrol-CH), 7.99 (s, 3H, Amid-NH), 8.46 (bs, 12H, guanidinium-NH ₂), 8.72 (s, 3H, Amid-NH), 11.82 (s, 3H, Guanidinium-NH), 12.44 (s, 3H, Pyrrol-NH); |
| ¹³C-NMR | (100MHz, DMSO-d ₆) δ = 16.2 (CH ₂ -CH ₃), 22.6 (CH ₂ -CH ₃), 37.1 (CH ₂ -NH), 42.0 (Gly-CH ₂), 113.0 (Pyrrol-CH), 115.8 (Pyrrol-CH), 125.8 (Pyrrol-C _q), 132.2 (Aryl-C _q), 132.6 (Pyrrol-C _q), 143.6 (Aryl-C _q), 155.5, 159.5, 159.9, 168.4 (C _q); |
| IR | (KBr-pellet) $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3472 (s), 3394 (s), 3119 (w), 3068 (w), 2972 (w), 1715 (s), 1691 (vs), 1634 (s), 1561 (s), 1293 (vs), 1226 (s), 1073 (m), 1012 (m), 747 (m); |
| MS | (pos. ESI): m/z = 955.4 [M+H ⁺] ⁺ , 478.2 [M+2H ⁺] ²⁺ ; |
| HR-MS | (pos. ESI): m/z = 955.4419 (berechnet für C ₄₂ H ₅₄ N ₁₈ O ₉ + 2H ⁺ : 955.4394). |

7.4 Synthese des Rezeptors 18

7.4.1 Synthese der Edukte

L-Serinmethylester **85** (Route 1)^[104]

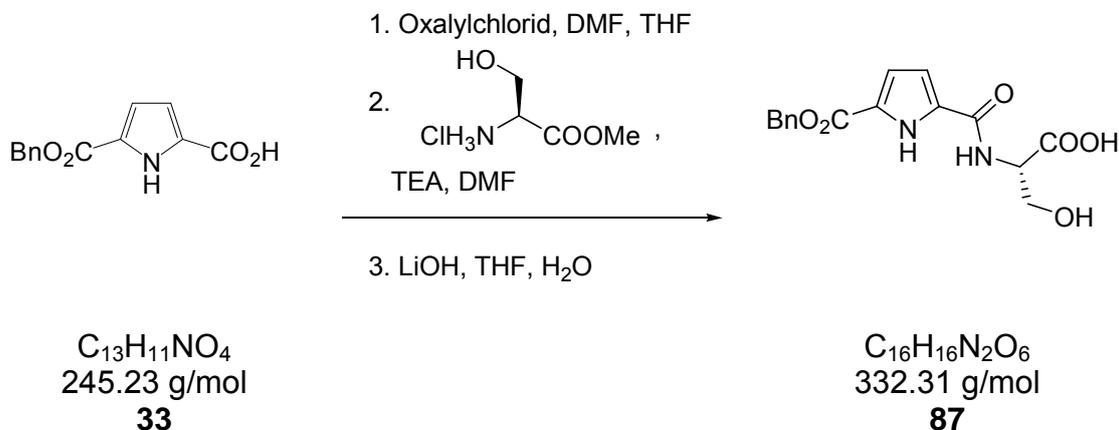


Zu einer Suspension von *L*-Serin **20** (5.00 g, 47.6 mmol) in absolutem MeOH (100 ml) wurde über einen Zeitraum von einer Stunde Thionylchlorid (6.23 g, 52.4 mmol) getropft. Die Suspension wurde 5 h im Rückfluss erhitzt und die erhaltene klare Lösung am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Der weiße Feststoff wurde aus MeOH umkristallisiert und man erhielt den Methylester **85** (6.85 g, 44.0 mmol, 92 % Ausbeute) in Form von weißen Nadeln.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (d, ³*J* = 3.4 Hz, 2H, CH₂), 4.05 (d, ³*J* = 3.4 Hz, 1H, CH), 5.61 (s, 1H, OH), 8.62 (s, 3H, NH₃);

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 52.9 (CH₂), 54.6 (CH), 59.6 (OCH₃), 168.6 (C_q).

**(S)-2-(Benzyl-5-carbamoyl-1H-pyrrol-2-carboxyloyl)-3-hydroxypropansäure
87 (Route 1; Säurechlorid)**



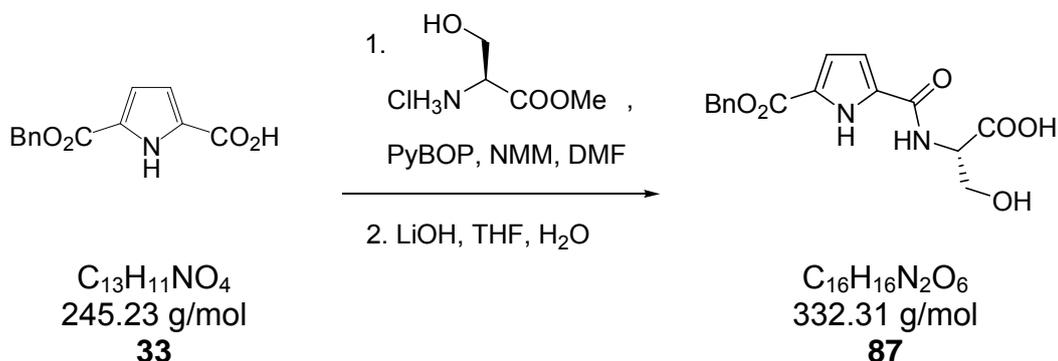
Zu einer Lösung der Pyrrolcarbonsäure **33** (2.00 g, 7.70 mmol) in THF (50 ml) wurden unter Stickstoffatmosphäre bei 0 °C Oxalylchlorid (1.96 g, 15.4 mmol) und DMF (3 Tropfen) gegeben und die Lösung für 3 h bei 50 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit und man erhielt das Säurechlorid als gelben Feststoff. Dieser wurde in DMF (20 ml) gelöst und bei 0 °C unter Stickstoffatmosphäre innerhalb einer Stunde zu einer Lösung von Serinmethylester (2.40 g, 15.4 mmol) in DMF (20 ml) und TEA (5 ml) getropft. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde Wasser (80 ml) hinzugegeben und die entstandene Suspension mit Diethylether (dreimal mit jeweils 60 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen (60 ml), mit Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Der zurückgebliebene gelbe Feststoff wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und man erhielt den Methylester als weißen Feststoff.

Dieser wurde in THF (50 ml) gelöst, mit LiOH (0.34 g, 7.70 mmol) in Wasser (10 ml) versetzt und anschließend über Nacht gerührt. Die Lösung wurde bei vermindertem Druck vom THF befreit, mit Wasser versetzt und mit Salzsäure (5 %ig) auf pH 4 angesäuert. So erhielt man nach Filtrieren **87** (1.56 g, 4.50 mmol, 58 %) als weißen Feststoff.

7 Experimenteller Teil

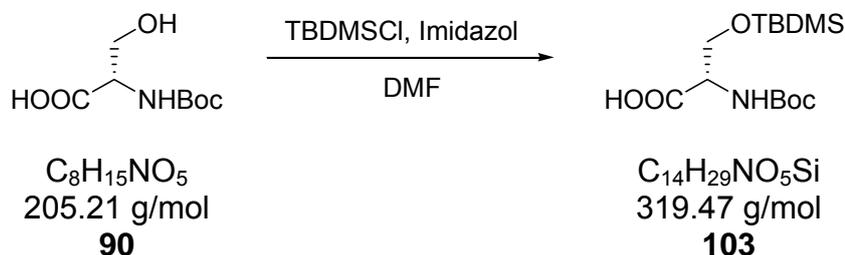
| | |
|---------------------------|---|
| R_f | 0.21 (Methyl ester; SiO ₂ , DCM/MeOH = 20/1); |
| Smp. | 180-182 °C; |
| ¹H-NMR | (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 3.70 - 3.78 (m, 2H, Ser-CH ₂), 4.45 – 4.48 (m, 1H, Ser-CH), 5.05 (s, 1H, Ser-OH), 5.31 (s, 2H, Bz-CH ₂), 6.81 – 6.85 (m, 2H, Pyrrol-CH), 7.31 – 7.45 (Aryl-CH), 8.54 (d, ³ J = 7.7 Hz, 1H, Amid-NH), 12.45 (s, 1H, Pyrrol-NH), 12.68 (br s, 1H, COOH); |
| ¹³C-NMR | (100 MHz, DMSO-d ₆) δ = 55.3 (Ser-CH), 61.6 (Ser-CH ₂), 65.8 (Bz-CH ₂), 113.8, 115.7 (Pyrrol-CH), 124.6 (Pyrrol-C _q), 128.2 – 128.8 (Ar-CH), 131.2 (Pyrrol-C _q), 136.6 (Aryl-C _q), 159.6, 160.3, 172.2 (C _q); |
| IR | (KBr-pellet) $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3472 (s, br), 3394 (s), 3119 (w), 3068 (w), 2972 (w), 1715 (s), 1691 (vs), 1634 (s), 1561 (s), 1293 (vs), 1226 (s), 1073 (m), 1012 (m), 747 (m); |
| MS | (neg. ESI): m/z = 331.1 [M-H ⁺] ⁻ ; |
| HR-MS | (neg. ESI): m/z = 331.09402 (berechnet für C ₁₆ H ₁₅ N ₂ O ₆ - H ⁺ : 331.09356). |

**(S)-2-(Benzyl-5-carbamoyl-1H-pyrrol-2-carboxyloyl)-3-hydroxypropansäure
87 (Route 1; PyBOP)**



Zu einer Lösung von **33** (2.00 g, 7.70 mmol) und Serinmethylester (2.40 g, 15.4 mmol) in NMM (2 ml) und DMF (40 ml) wurde unter Stickstoff-Atmosphäre PyBOP (4.34 g, 8.5 mmol) gegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Das orangene Reaktionsgemisch wurde mit Wasser (80 ml) versetzt, mit Diethylether (dreimal mit jeweils 60 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Der zurückgebliebene ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und man erhielt den Methylester als weißen Feststoff.

Dieser wurde in THF (50 ml) gelöst, mit LiOH (0.34 g, 7.70 mmol) in Wasser (10 ml) versetzt und anschließend über Nacht gerührt. Die Lösung wurde bei vermindertem Druck vom THF befreit, mit Wasser versetzt und mit Salzsäure (5 % ig) auf pH 4 angesäuert. So erhielt man nach Filtrieren **87** (1.90 g, 5.47 mmol, 71 %) als weißen Feststoff.

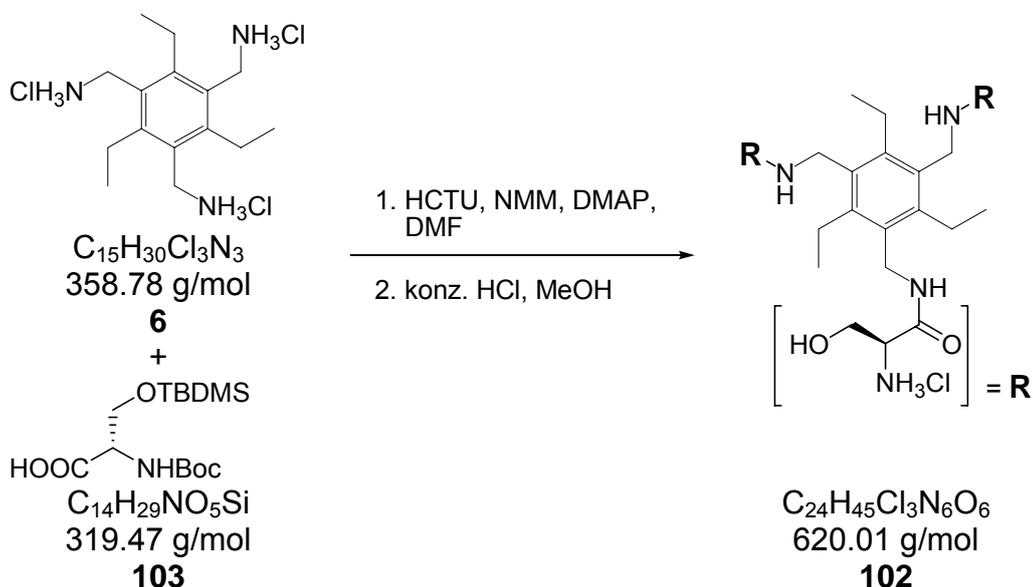
O*-(*t*-Butyldimethylsilyl)-*N*-(1,1-dimethylethoxy)carbonyl-*L*-Serin **103***" Boc-Ser(TBDMS)" (Route 2)^[107]**

Zu einer Lösung von *L*-Serin **90** (5.00 g, 24.5 mmol) in DMF (50 ml) wurden bei Eiskühlung unter Stickstoff-Atmosphäre TBDMS-Chlorid (4.80 g, 31.5 mmol) und Imidazol (5.00 g, 73.0 mmol) gegeben und das Reaktionsgemisch bei 0 °C für eine Stunde gerührt. Die resultierende Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Salzsäure (100 ml, 1N) versetzt und mit Diethylether (dreimal mit jeweils 100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und bei vermindertem Druck eingedunstet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (SiO₂, Hexan/Ethylacetat = 7/3) gereinigt und man erhielt **103** (6.26 g, 19.6 mmol, 80 %) als weißen Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 0.85 (s, 6H, TBDMS-Me-CH₃), 0.90 (s, 9H, TBDMS-^tBu-CH₃), 1.47 (s, 9H, Boc-CH₃), 3.84 – 3.88 (m, 1H, Ser-CH₂), 4.12 – 4.18 (m, 1H, Ser-CH₂), 4.40 (brs, 1H, Ser-CH), 5.36 (brs, 1H, amide-NH);

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = - 5.3 (TBDMS-Me-CH₃), 18.1 (TBDMS-C_q), 25.8 (TBDMS-^tBu-CH₃), 28.3 (Boc-CH₃), 55.8 (Ser-CH), 63.0 (Ser-CH₂), 78.3 (Boc-CH₃), 155.3, 172.0 (C_q).

7.4.2 Synthese von Rezeptor 18

1,3,5-Tris((ethylcarbamoyl)-hydroxyethyl-2-ammoniumchlorid)-2,4,6-triethylbenzol 102 (Route 2)

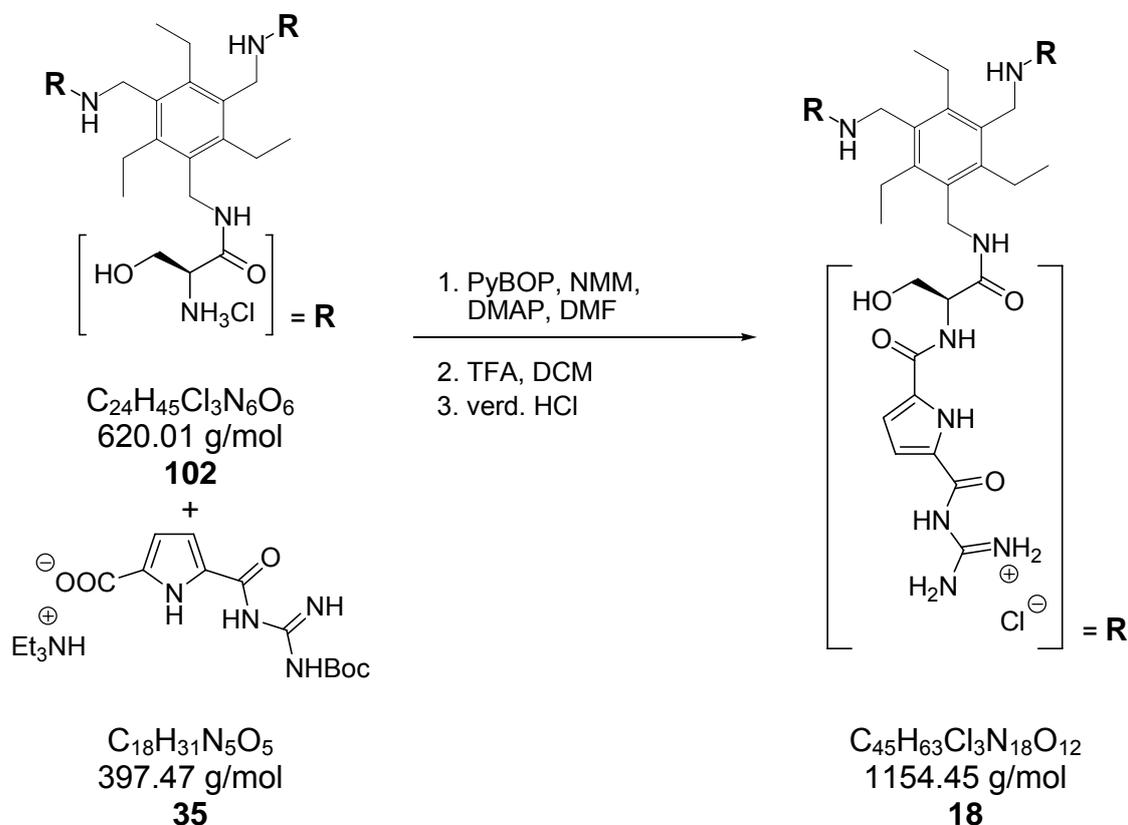
Zu einer Suspension des Triamins **6** (0.06 g, 0.50 mmol) in DCM (30 ml) und NMM (2 ml) wurden **103** (1.44 g, 4.50 mmol), HCTU (1.86 g, 4.50 mmol) und DMAP (0.55 g, 4.50 mmol) gegeben und Lösung über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (zweimal mit jeweils 20 ml) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Das so erhaltenen leicht gelbe Öl wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Hexan/Ethylacetat/TEA = 4/6/0.1) gereinigt und man erhielt die geschützte Zwischenstufe als weißen Feststoff.

Diese wurde in MeOH (20 ml) und konz. HCl (4 ml) gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit, mit HCl (10 ml, 0.1 N) versetzt und anschließend mit DCM (zweimal mit jeweils 10 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde lyophilisiert und man erhielt das Produkt **102** (0.21 g, 0.34 mmol, 68 %) als weißen Feststoff.

7 Experimenteller Teil

| | |
|---------------------------|--|
| R_f | 0.45 (geschützte Form; SiO ₂ , Hexan/Ethylacetat/TEA = 4/6/0.1); orange nach Anfärben mit Ninhydrin-Reagenz; |
| Smp. | > 250 °C; |
| ¹H-NMR | (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 1.05 – 1.11 (m, 9H, CH ₂ -CH ₃), 2.66 – 2.78 (m, 6H, CH ₂ -CH ₃), 3.69 – 3.72 (m, 6H, Ser-CH ₂), 3.83 – 3.85 (m, 3H, CH), 4.34 (s, 6H, CH ₂ -NH), 5.43 (s, 3H, OH), 8.20 – 8.21 (m, 9H, CH ₂ -NH ₃), 8.44 – 8.48 (m, 3H, Amid-NH); |
| ¹³C-NMR | (100 MHz, DMSO-d ₆) δ = 16.2 (CH ₂ -CH ₃), 22.7 (CH ₂ -CH ₃), 37.4 (CH ₂ -NH), 54.3 (CH-CH ₂), 60.5 (CH-CH ₂), 131.5, 143.8 (Aryl-C _q), 166.8 (C _q); |
| IR | (KBr-pellet) ν [cm ⁻¹] = 3420 (m, br), 3237 (m, br), 2967 (m), 2874 (m), 1671 (s), 1541 (s), 1241 (m), 1031 (m); |
| MS | (pos. ESI): <i>m/z</i> = 511.3 [M+H ⁺] ⁺ ; |
| HR-MS | (pos. ESI): <i>m/z</i> = 511.3238 (berechnet für C ₂₄ H ₄₂ N ₆ O ₉ + H ⁺ : 511.3239). |

1,3,5-Tris(5-((S)-1-(ethylcarbamoyl)-2-hydroxyethylcarbamoyl)-guanidiniocarbonylpyrrol chlorid)-2,4,6-triethylbenzol 18 (Route 2)

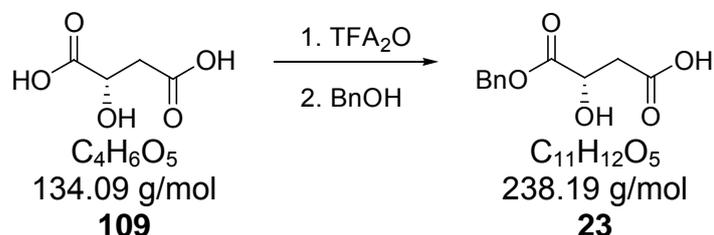


Zu einer Lösung von **102** (62.0 mg, 0.10 mmol) und DMAP (4.00 mg, 0.03 mmol) in DMF (20 ml) und NMM (1 ml) wurde die Carbonsäure **35** (0.12 g, 0,30 mmol) gegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Das orangefarbene Reaktionsgemisch wurde mit Wasser (40 ml) versetzt und der resultierende Feststoff abfiltriert. Dieser wurde mit MeOH (10 ml) aufgenommen und mit Diethylether (50 ml) gefällt. Die so erhaltene leicht verunreinigte Zwischenstufe wurde in DCM (20 ml) und TFA (4 ml) gelöst und über Nacht gerührt. Das Lösemittelgemisch wurde bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit und der leicht gelbe Feststoff säulenchromatographisch (MPLC; RP-18, MeOH/H₂O = 100/0 nach 0/100, 0.1 % TFA) gereinigt. So erhielt man **18** als weißen Feststoff (59.0 mg, 51.0 mmol, 51 %).

| | |
|---------------------------|--|
| Smp. | > 250 °C; |
| ¹H-NMR | (400MHz, DMSO-d ₆) δ = 1.09 (s, 9H, CH ₂ -CH ₃), 2.69 (s, 6H, CH ₂ -CH ₃), 3.64 (s, 3H, Ser-CH), 3.88 - 3.89 (m, 6H, ³ J = 4.8 Hz, Ser-CH ₂), 4.34 (s, 6H, CH ₂ -NH), 6.88 (s, 3H, Pyrrol-CH), 7.45 (s, 3H, Pyrrol-CH), 7.99 (s, 3H, Amid-NH), 8.50 (bs, 12H, guanidinium-NH ₂), 8.74 (s, 3H, Amid-NH), 11.95 (s, 3H, Guanidinium-NH), 12.44 (s, 3H, Pyrrol-NH); |
| ¹³C-NMR | (100MHz, DMSO-d ₆) δ = 16.3 (CH ₂ -CH ₃), 22.6 (CH ₂ -CH ₃), 37.2 (CH ₂ -NH), 50.1 (Ser-CH ₂), 67.2 (Ser-CH), 113.0 (Pyrrol-CH), 116.1 (Pyrrol-CH), 125.8 (Pyrrol-C _q), 132.2 (Aryl-C _q), 132.7 (Pyrrol-C _q), 143.5 (Aryl-C _q), 155.6, 159.5, 159.8 (C _q); |
| IR | (KBr-pellet) ν [cm ⁻¹] = 3326 (s, br), 2965 (m), 1699 (vs), 1648 (s), 1558 (s), 1290 (s), 1251 (s), 1201 (m), 1073 (w), 753 (m); |
| MS | (pos. ESI): <i>m/z</i> = 1045.5 [M+H ⁺] ⁺ , 523.2 [M+2H ⁺] ²⁺ ; |
| HR-MS | (Pos. ESI): <i>m/z</i> = 1045.4712 (berechnet für C ₄₅ H ₆₀ N ₁₈ O ₁₂ + H ⁺ : 1045.4711). |

7.5 Synthese von Rezeptor 124

(S)-2-Hydroxybernsteinsäure-1-benzylester **23**^[114]

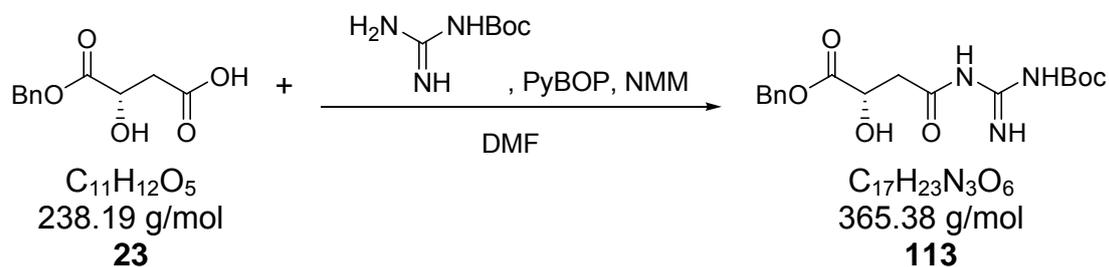


Trifluoressigsäureanhydrid (30 ml) und *L*-Äpfelsäure **109** (10.0 g, 75.0 mmol) wurden bei 0 °C für 3 h gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck eingengt, wobei der Reaktionskolben bei 0 °C (Eisbadtemperatur) gehalten wurde. Der resultierende Feststoff wurde in Benzylalkohol (50 ml) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Überschuss an Benzylalkohol und die TFA wurden im Vakuum destilliert und man erhielt **23** (17.9 g, 75.0 mmol, quant.) als farbloses Öl.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2.81 – 2.94 (m, CH₂), 4.55 (dd, 1H, CH), 5.22 (s, 2H, OCH₂), 7.35 (m, 5H, Aryl-CH);

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 38.7 (CH₂), 67.5 (CH), 68.3 (OCH₂), 128.7, 129.1 (Aryl-CH), 135.2 (Aryl-C_q), 173.4, 176.0 (C_q).

(S)-((tert-Butyloxycarbonyl)-3-guanidiniocarbonyl)-2-hydroxypropansäurebenzylester 113



Der Benzylester **23** (0.50 g, 2.20 mmol) wurde mit Boc-Guanidin (0.38 g, 2.40 mmol) in NMM (1 ml) in DMF (20 ml) unter Argon vorgelegt und mit PyBOP (1.26 g, 2.40 mmol) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt, mit Wasser (40 ml) versetzt und anschließend mit Diethylether (jeweils dreimal mit 20 ml) extrahiert. Die vereinigten etherischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen (30 ml), mit Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck eingengt. Das resultierende leicht gelbe Öl wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Hexan/Ethylacetat/TEA = 1/1/0.01) gereinigt und man erhielt **113** (0.50 g, 2.80 mmol, 63 %) als farbloses Öl.

R_f 0.29 (SiO_2 , Hexan/Ethylacetat/TEA = 1/1/0.01);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 1.39 (s, 9H, Boc-*CH*₃), 2.62 – 2.78 (m, 2H, *CH*₂), 4.46 (dd, 1H, ³*J* = 6.2 Hz, *CH*), 5.12 (s, 2H, *OCH*₂), 7.35 (m, 5H, Aryl-*CH*), 8.72 (bs, 1H, Guanidinium-*NH*), 8.85 (bs, 1H, Guanidinium-*NH*), 10.80 (bs, 1H, Amid-*NH*);

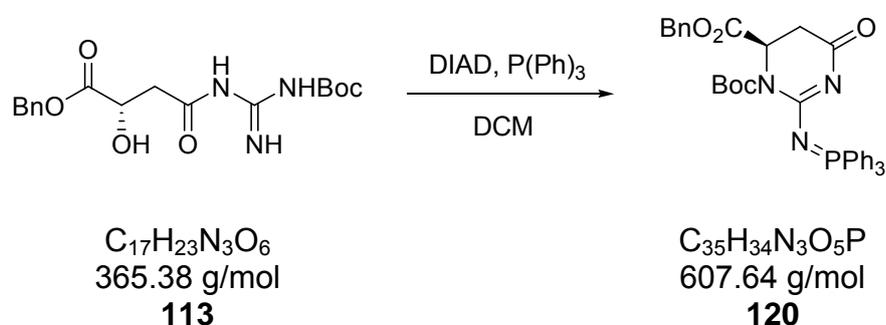
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 28.3 (*CH*₃), 41.8 (*CH*₂), 66.2 (*CH*), 67.2 (*OCH*₂), 84.3 (Boc-*C*_q) 128.2, 128.4, 128.7 (Aryl-*CH*), 136.3 (Aryl-*C*_q), 158.5, 169.4, 173.1 (*C*_q).

IR (KBr-pellet) ν [cm^{-1}] = 3406 (s, br), 3315 (s), 3181 (m, br), 2978 (s), 2934 (m), 1649 (s), 1604 (vs), 1540 (s), 1310 (vs), 1180 (s), 1066 (s), 806 (m);

MS (pos. ESI): $m/z = 314.1$ $[M-H_2O+Na^+]^+$;

HR-MS (pos. ESI): $m/z = 370.13687$ (berechnet für $C_{17}H_{21}N_3O_5 + Na^+$: 370.13789).

(R)-2-(Triphenylphosphinimino)-3-(tert-butyloxycarbonyl)-3,4,5,6-tetrahydro-6-oxopyrimidin-4-carbonsäurebenzylester 120^[115]



Der Benzylester **113** (0.10 g, 0.27 mmol), Triphenylphosphan (0.09 g, 0.32 mmol) und DIAD (0.07 g, 0.32 mmol) wurden in DCM (20 ml) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser (1 ml) hydrolysiert, mit Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck eingeeengt. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/MTBE/TEA = 9/1/0.1) gereinigt und man erhielt **120** (0.05 g, 0.15 mmol, 55 %) als weißen, öligen Feststoff.

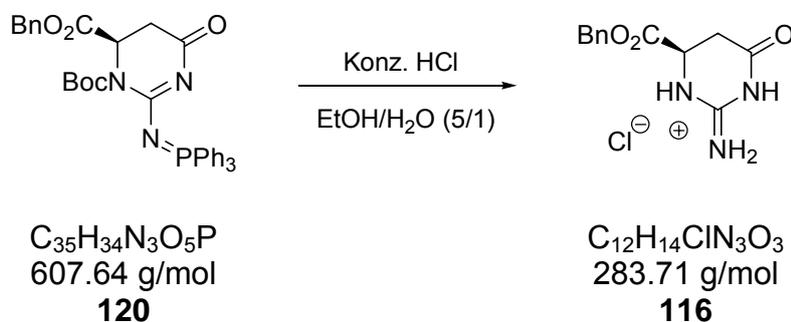
R_f 0.29 (SiO_2 , DCM/MTBE/TEA = 9/1/0.01);

Smp. 54 - 58 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 1.45$ (s, 9H, Boc- CH_3), 2.86 – 2.97 (m, 2H, CH_2), 4.34 (dd, 1H, $^3J = 4.8$ Hz, CH), 5.12 (q, 2H, OCH_2), 7.26 – 7.30 (m, 5H, Aryl-CH), 7.56 – 7.69 (m, 15 H, P- $(C_6H_5)_3$);

| | |
|---------------------------------------|---|
| $^{13}\text{C-NMR}$ | (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 28.2 (CH_3), 35.5 (CH_2), 59.7 (CH), 65.9 (OCH_2), 82.1 (Boc- C_q), 126.2 – 129.4 (P-(C_6H_5) $_3$), 128.2, 133.3, 133.4 (Aryl- CH), 136.3 (Aryl- C_q), 148.6, 169.6, 170.9, 184.2 (C_q). |
| IR | (KBr-pellet) ν [cm^{-1}] = 3252 (m), 2980 (m), 2940 (w), 1737 (s), 1696 (s), 1524 (s), 1259 (s), 1112 (s), 1051 (m), 722 (m), 542 (m); |
| MS | (pos. ESI): m/z = 630.2 [$\text{M}+\text{Na}^+$] $^+$; |
| HR-MS | (pos. ESI): m/z = 630.21367 (berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5 + \text{Na}^+$: 630.21338). |

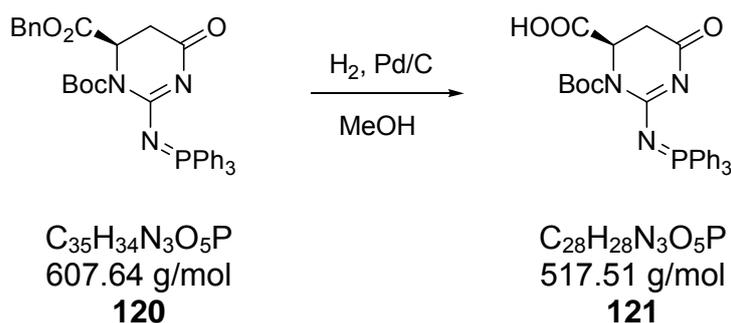
HCl-Salz von (R)-2-(Triphenylphosphinimino)-hexahydro-6-oxopyrimidin-4-carbonsäurebenzylester **116**^[119]



Das Iminophosphoran **120** (0.05 g, 0.08 mmol) wurde in einer Lösung aus Ethanol und Wasser (10 ml, 5/1) gelöst und mit 2 Tropfen konz. Salzsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 h im Rückfluss erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit DCM (zweimal mit jeweils 10 ml) gewaschen. Die wässrige Lösung wurde lyophilisiert und man erhielt **116** (21 mg, 0.07 mmol, 92 %) als weißen Feststoff.

| | |
|---------------------------|---|
| Smp. | 70 - 74 °C |
| ¹H-NMR | (300 MHz, DMSO-d ₆) δ = 2.94 – 3.05 (m, 2H, CH ₂), 4.52 (t, ³ J = 4.9 Hz, 1H, CH), 5.11 (s, 2H, OCH ₂), 7.33 – 7.38 (m, 5H, Aryl-CH), 8.89 (s, 1H, Guanidinium-NH) , 9.05 (s, 1H, Guanidinium-NH) , 9.54 (s, 1H, Guanidinium -NH), 12.33 (brs, 1H, Amid-NH); |
| ¹³C-NMR | (75 MHz, DMSO-d ₆): δ = 34.2 (CH ₂), 55.3 (CH), 66.3 (OCH ₂), 128.2 – 128.6 (Aryl-CH), 148.6 (Aryl-C _q), 158.7, 169.5, 174.6 (C _q). |
| IR | (KBr-pellet) ν [cm ⁻¹] = 3337 (vs, br), 3031 (s, br), 2688 (w), 1771 (s), 1703 (vs), 1533 (s), 1456 (w), 1218 (s), 750 (m), 694 (m), 653 (m); |
| MS | (pos. ESI): m/z = 248.1 [M+H ⁺] ⁺ ; |
| HR-MS | (neg. ESI): m/z = 248.10282 (berechnet für C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₃ + H ⁺ : 248.10297). |

(R)-2-(Triphenylphosphinimino)-3-(tert-butyloxycarbonyl)-3,4,5,6-tetrahydro-6-oxopyrimidin-4-carbonsäure 121

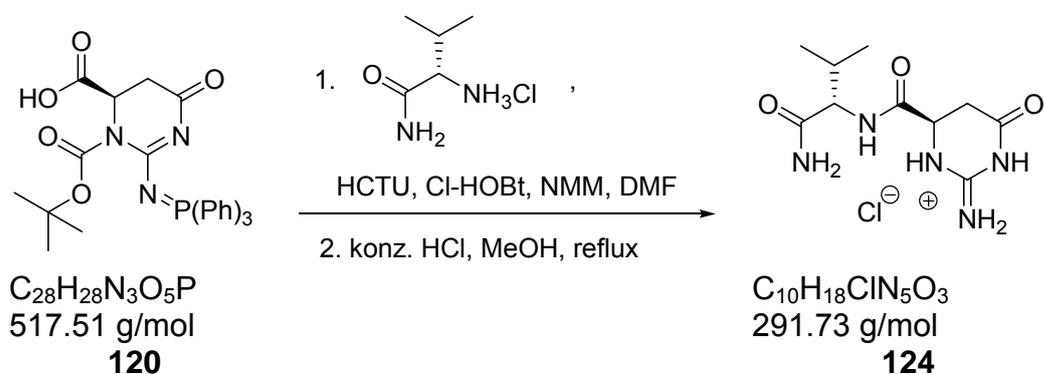


Der Benzylester **120** (0,20 g, 0.33 mmol) wurde in MeOH (20 ml) gelöst, mit 10 %iger Pd/C (0.06 g) versetzt und anschließend 2 h bei 50 °C unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde mit Hilfe von Celite abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und man hielt das Produkt **121** (0.17 g, 0.33 mmol, quant.) als weißen Feststoff.

7 Experimenteller Teil

| | |
|---------------------------|--|
| Smp. | 130 - 134 °C; |
| ¹H-NMR | (300 MHz, DMSO-d ₆) δ = 1.59 (s, 9H, Boc-CH ₃), 2.70 – 2.76 (m, 1H, CH ₂) , 2.99 – 3.03 (m, 1H, CH ₂), 4.53 - 4.56 (m, 1H, CH), 7.56 – 7.69 (m, 15 H, P-(C ₆ H ₅) ₃); |
| ¹³C-NMR | (75 MHz, DMSO-d ₆): δ = 28.5 (CH ₃), 38.6 (CH ₂), 61.0 (CH), 82.3 (Boc-C _q), 126.6 – 133.9 (P-(C ₆ H ₅) ₃), 148.9, 171.5, 174.5, 187.8 (C _q). |
| IR | (KBr-pellet) ν [cm ⁻¹] = 2977 (w), 1751 (m), 1707 (m), 1577 (s), 1438 (w), 1364 (m), 1246 (w), 1117 (s), 724 (m), 692 (m), 533 (m); |
| MS | (pos. ESI): <i>m/z</i> = 518.2 [M+H] ⁺ , 540.2 [M+Na] ⁺ , 518.2 [M-Boc+H] ⁺ ; |
| HR-MS | (pos. ESI): <i>m/z</i> = 518.18363 (berechnet für C ₂₈ H ₂₈ N ₃ O ₅ P + H ⁺ : 518.18448). |

HCl-Salz von (4S)-N-((R)-1-carbamoyl-2-methylpropyl)-hexahydro-2-imino-6-oxopyrimidin-4-carboxamid



Zu einer Lösung der Carbonsäure **120** (0.10 g, 0.19 mmol) in DCM (20 ml) und NMM (1 ml) wurden Valinamid (0.06 g, 0.38 mmol), HCTU (0.16 g, 0.38 mmol) und Cl-HOBt (0.07 g, 0.38 mmol) gegeben und die Suspension über Nacht

190

gerührt. Die so entstandene Lösung wurde mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (zweimal mit jeweils 10 ml) und mit gesättigter NaCl -Lösung (10 ml) gewaschen und anschließend am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Das zurückgebliebene orangene Öl wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Gradient $\text{DCM/MeOH/TEA} = 50/1/0.05$ nach $20/1/0.2$) gereinigt und man erhielt **124** (0.04 g, 0.14 mmol, 73 %) als weißen Feststoff.

| | |
|---------------------------|---|
| R_f | 0.13 (geschützte Form; SiO_2 , $\text{DCM/MeOH/TEA} = 20/1/0.2$); |
| Smp. | 204 - 208 ° C (Zersetzung); |
| ¹H-NMR | (300 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 0.79$ (d, 2H, $^3J = 4.0$ Hz, CH_3), 0.82 (d, 2H, $^3J = 4.0$ Hz, CH_3), 1.88 - 2.01 (m, 1H, CH-CH_3), 2.71 - 2.77 (m, 1H, CH_2), 2.87 - 2.95 (m, 1H, CH_2), 4.04 - 4.10 (m, 1H, CH), (t, 1H, $^3J = 4.6$ Hz, CH), 7.04 (s, 1H, Amid-NH_2), 7.43 (s, 1H, Amid-NH_2), 8.11 (d, 1H, $^3J = 8.9$ Hz, Amid-NH), 8.78 (s, 2H, Guanidin-NH_2), 9.42 (s, 1H, Guanidinium-NH), 12.13 (s, 1H, Guanidinium-NH); |
| ¹³C-NMR | (75 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 18.1$, 19.5 (CH_3), 19.5 (CH_3), 30.5 (CH), 35.0 (CH_2), 55.7, 57.7 (CH), 158.4, 168.2, 172.9, 175.3 (Carbonyl CO); |
| IR | (KBr-pellet) ν [cm^{-1}] = 3338 (m), 2977 (m), 1702 (s), 1527 (s), 1461 (w), 1362 (m), 1335 (m), 1238 (w), 1118 (m), 693 (m), 533 (m); |
| MS | (pos. ESI): $m/z = 314.1$ [$\text{M}+\text{H}^+$] ⁺ ; |
| HR-MS | (neg. ESI): $m/z = 256.14012$ (berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3 + \text{H}^+$: 256.14042). |

8 Summary

In the course of this work a multivalent receptor **8** based on guanidiniocarbonyl-pyrrolcations for the complexation of biologically relevant (poly)-anionic substrates like citrate, malate or tatrare was synthesised in a four step synthesis with a yield of 60 %. In addition a new synthesis for the template **6** could be developed, which provided the triamine in high yields and good purity.

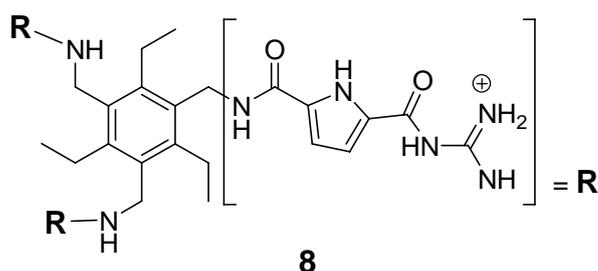


figure 1: Multivalent receptor **8** for the complexation of biologically relevant anions.

Due to the high affinity of receptor **8** for the trimesic acid in DMSO/water mixtures exact binding constants could not be obtained with nmr binding studies. Therefore UV binding studies in pure water were performed. In addition to the polycarboxylates mentioned above three aromatic polycarboxylates and kemp's triacid were investigated. The aim was to show the influence of the different non covalent interactions on the overall binding constants.

The receptor **8** binds citrate in the presence of a 1000fold excess of NaCl and a 10fold excess of bis-tris buffer with a high binding constant of $K_{\text{Ass}} = 86000 \text{ M}^{-1}$ in water. Therefore **8** shows at least a 100fold higher binding constant than *anslyns* receptor **7**, that consists of interactions of simple guanidinium cations with citrate. To the best of my knowledge **8** is hence the most efficient receptor for the binding of citrate in water reported so far, if receptors on metall- and boronic acid-basis are neglected. Furthermore receptor **8** shows a high selectivity with a factor of at least 8 for citrate against other biologically relevant dicarboxylates like malate or tartrate.

With the aid of binding studies and molecular modeling calculations^[99] could be determined, which influence the different non covalent interactions have on the binding constant. It was demonstrated in this way, that flexibility, hydroxy-functions, π -stacking and symmetry of the substrates have a major influence on

the binding constant. Especially unpolar interactions and interactions with the α -hydroxy group seem to play a major role in the binding mode.

With the help of molecular modeling calculations and an additional noesy experiment, information about the possible complex structure could be obtained. The high stability of this complex most likely stems from three factors.

1. the superior binding properties of the guanidiniocarbonyl pyrrole cation relative to simple guanidinium or ammonium cations
2. π -stacking interactions between the two aromatic rings, one electron-rich the other electron-poor, further stabilize the complex
3. the three binding arms of **8** provide an extensive hydrophobic shielding for the substrate once it is bound within the inner cavity. Hence, the microenvironment around the binding sites is more hydrophobic than the bulk solvent favoring both ion pair interactions and hydrogen bonds. The majority of the bound guest molecule and therefore also its binding sites are not accessible by the solvent any more, as can be seen also from the calculated solvent accessible surface.

According to these results, receptor **8** can be seen as a 'molecular flytrap' (figure 1). In the absence of a substrate, the three arms are pointing away from each other due to their mutual electrostatic repulsion providing a more open form of the receptor. Upon the binding of the substrate, the three arms close up and completely surround the guest locking it in place.

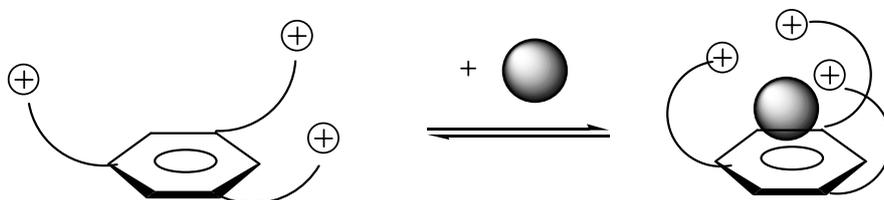


figure 1: Guest binding by receptor **8** resembles a "molecular flytrap".

In addition to the selective recognition of citrate with receptor **8** a sensor system with carboxyfluoresceine based on an *indicator displacement assay* (*ida*) could be developed. With this *ida* it was possible to detect citrate in contrast to other biologically relevant substrates with the naked eye (figure 2).

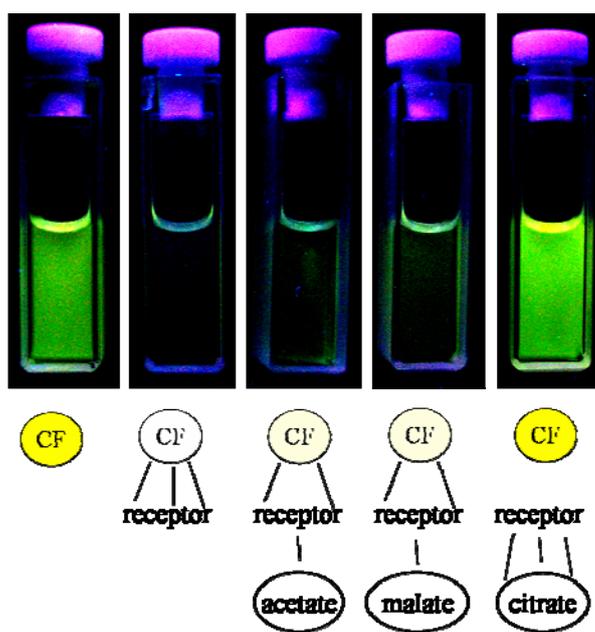


figure 2: Naked-eye detection of acetate, malate and citrate (all 10 mM) with a 1:1 mixture of receptor **8** and carboxyfluorescein **52** (0.5 mM) in 10 % water/DMSO. Only citrate is capable to displace **52** from its complex with **8** thereby restoring its fluorescence.

Furthermore receptor **8** showed high binding constants for anionic sugars. For glucuronic acid and galacturonic acid good binding constants of $K_{\text{Ass}} \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ in 70 % DMSO/water (NMR) and $K_{\text{Ass}} \sim 5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ in 80 % DMSO/water (UV, pH = 6) were determined. The glucophosphates showed even higher bindings constants. For the glucophosphates binding constants of $K_{\text{Ass}} \sim 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (UV, pH = 4) in nearly pure water (10 % DMSO) could be obtained. Furthermore the receptor **8** showed good bindings constants for the phosphates at biological pH (7.4). In a solvent mixture of 70 % DMSO/Water bindings constants of $K_{\text{Ass}} \sim 10^4 \text{ M}^{-1}$ were measured for the glucophosphates.

It could be demonstrated, that the sugar ring has a significant influence on the binding constants (comparison of methylphosphate **16** with the glucophosphates **13-15** factor > 2) as well as the diverse epimers are bound differently by the receptor **8** (comparison of the two uronic acids **11** and **12** factor > 3).

Possible explanations for the different bindings constants of the sugars could be obtained with the aid of molecular modeling calculations.

In addition to receptor **8** two other receptors **17** and **18** were synthesised, which could allow a recognition of pure sugars due to their bigger cavity and more

H-bonding motifs. These receptors could be obtained via a 4 step synthesis starting from the template **6**, the amino acids **19** and **20** and the binding motif **9** with yields of 42 % for **17** and 35 % for **18**.

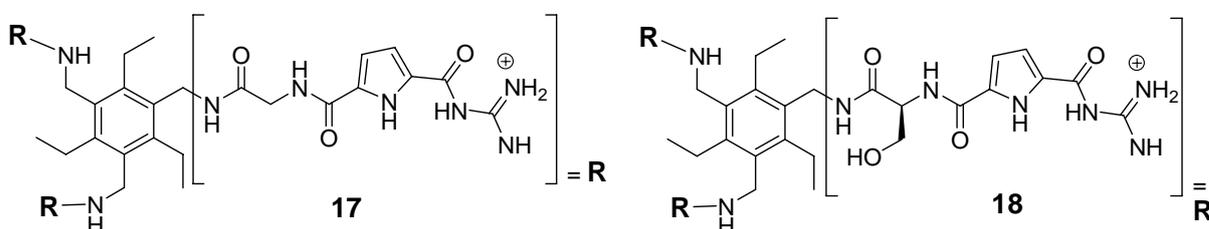


figure 2: Receptors **17** and **18** for the complexation of (anionic) sugars.

For both receptors preliminary binding studies were performed. UV-binding studies with receptors **17** and **18** showed a complexation of the anionic sugars. However no exact bindings constants could be determined due to too small changes in the absorbance during the complexation. NMR binding studies showed comparable binding constants for the uronic acids for receptor **18** as for receptor **8**.

In another project a synthesis for a new chiral acylguanidinium headgroup was developed for the enantioselective complexation of small peptides and amino acids. Starting from malic acid **109** the protected cyclic acylguanidine **121** was synthesised over 4 steps with a good yield of 35 %.

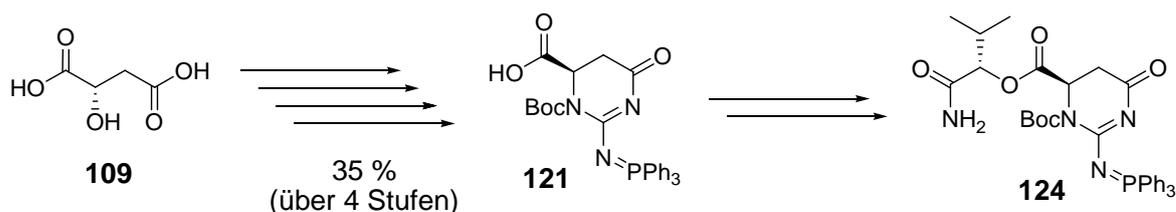


figure 3: Synthesis of the cyclic acylguanidine **121** starting from **109** over four steps and synthesis of receptor **124**.

With this new binding motif and valinamide receptor **124** was synthesised and preliminary binding studies were performed. Receptor **124** showed a three times higher binding constant ($K_{\text{Ass}} = 5200 \text{ M}^{-1}$) for alaninecarboxylate in 60 % DMSO/water than the guanidiniocarbonylpyrrol-receptor **45** ($K_{\text{Ass}} = 1610 \text{ M}^{-1}$).

Even in 70 % water/DMSO the receptor still showed a binding constant of $K_{\text{Ass}} = 436 \text{ M}^{-1}$. Furthermore the receptor discriminated between different amino acids. In this way the aliphatic amino acids valine and alanine are bound better

with binding constants of $K_{\text{Ass}} = 400\text{-}500 \text{ M}^{-1}$ than the aromatic ones phenylalanine and tryptophane with $K_{\text{Ass}} = 300\text{-}400 \text{ M}^{-1}$. This could mean, that the steric demand of the amino acids has a major influence on the binding constants. Furthermore the *D*-amino acids were bound slightly better than the *L*-amino acids. The difference between the binding constants was only 20 % for the aliphatic amino acids, but increased for the aromatic ones to 50 %. This proves the hypothesis, that the steric demand has an influence on the binding mode.

In this way could it be shown, that the new cyclic acylguanidine binding motif allows an effective and partially selective complexation of different (enantiomeric) amino acids in polar solvent mixtures. The use of this binding motif in a combinatorial approach for the enantioselective complexation of small peptides seems to be very promising.

9 Anhang

9.1 Literatur

- 1 L. J. Prins, D. N. Reinhoudt, P. Timmermann, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2446-2493.
- 2 J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry; Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, **1995**.
- 3 H.-J. Schneider, A. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- 4 G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, New York, **1997**.
- 5 J. Israelachvili, *Intermolecular & Surface Forces*, Academic Press, London, **1992**.
- 6 A. M. Davis, S. J. Teague, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 778-792.
- 7 R. Breslow, *Science* **1982**, *218*, 532-537.
- 8 A. J. Kirby, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 573-576.
- 9 D. H. Williams, M. S. Westwell, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 57-64
- 10 A. P. Davis, R. S. Wareham, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3160-3179.
- 11 R. M.-Manez, F. Sancenon, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419-4477.
- 12 S. L. Wiskur, H. Ait-Haddou, J. L. Lavigne, E. V. Anslyn, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 963-972.
- 13 L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1995**.
- 14 G. A. Burdock, *Eur. Pharmacopeia* **1997**, 729 – 730.
- 15 P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2446-2471;
- 16 H. Li, A. M. Pajor, *J. Membr. Biol.* **2002**, *185*, 9-16.
- 17 C. Renata, V. Fabio, B. Angela, S. Sergio, *Front. Biosci.* **2003**, *8*, 1084 – 1106.
- 18 D. W. Christianson, W. N. Lipscomb, *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 62-69.
- 19 F. A. Cotton, E. E. Hazen, M. J. Legg, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, *76*, 2551-2555.
- 20 P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 502-532.
- 21 F. P. Schmidtchen, M. Berger, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1609-1646.

-
- 22 A. Bianchi, K. Bowman-James, E. García-España, *Supramolecular Chemistry of Anions*, Wiley-VCH, New York, **1997**.
- 23 A. Galán, J. deMendoza, *Top. Curr. Chem.* **1995**, 175-222.
- 24 C. Schmuck, *Chem. Commun.* **1999**, 843-844.
- 25 C. Schmuck, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 709-718.
- 26 A. Metzger, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 911-914.
- 27 G. Henrich, E. V. Anslyn, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 2218-2224.
- 28 K. V. Kilway, J. S. Siegel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 255-261.
- 29 H.-W. Marx, F. Moulines, T. Wagner, D. Astruc, *Angew. Chem.* **1996**, 35, 1842-45.
- 30 R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720.
- 31 M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Witesides, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2908-2953; und darin zitierte Literatur.
- 32 K.A. Schug, W. Lindner, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 67-113.
- 33 M. D. Best, S. L. Tobey, E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, 240, 3-15.
- 34 W. Wienand, *Dissertation* **2002**, Universität zu Köln.
- 35 G. Müller, J. Riede, F. P. Schmidtchen, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1574-1575.
- 36 A. Echavarren, A. Galan, J.-M. Lehn, J. de Mendoza, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4994-4995.
- 37 F. P. Schmidtchen, *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, 4493-4497.
- 38 R. D. Dixon, S. J. Geib, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 365-366.
- 39 K. Ariga, E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 417-419.
- 40 B. Dietrich, D. L. Fyles, T. M. Fyles, J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **1979**, 62, 2763-2787.
- 41 L. Geiger, *Dissertation* **2004**, Universität Würzburg.
- 42 M. W. Peczu, A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2479-2494.
- 43 S. H. Choi, K. M. Huh, T. Ooya, N. J. Yui, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6350-6351.
- 44 W. H. Pirkle, P. C. Pochapsky, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 347-362.
- 45 G. Simmoneaux, P. L. Maux, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 228, 43-60
- 46 Y. Kubo, S. Maeda, S. Tokita, M Kubo, *Nature* **1996**, 382, 522-524.

- 47 E. P. Kyba, M. G. Siegel, L. R. Sousa, G. D. Y. Sogah, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 2692-2693.
- 48 J.-S. You, X.-Q. Yu, G.-L. Zhang, Q.-X. Xiang, J.-B. Lan, R.-G. Xie, *Chem. Commun.* **2001**, 1816-1818.
- 49 C.-S. Lee, P.-F. Teng, W.-L. Wong, H.-L. Kwong, A. S. C. Chan, *Tetrahedron* **2005**, 61, 7924-7930.
- 50 E. M. Perez, A. I. Oliva, J. V. Hernandez, L. Simon, J. R. Moran, F. Sanz, *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 5853-5856.
- 51 G. M. Kyne, M. E. Light, M. B. Hursthouse, J. de Mendoza, J. D. Kilburn, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 1258-1263.
- 52 J. M. Lehn, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 91-116.
- 53 D. J. Cram, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1041-1052.
- 54 W. C. Still, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 155-163.
- 55 B. D. Dietrich, D. L. Fyles, T. M. Fyles, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **1979**, 62, 2763-2787.
- 56 C. L. Hannon, E. V. Anslyn, *Bioorg. Chem. Front.* **1993**, 3, 193-197.
- 57 S. C. Mc. Clesky, A. Metzger, C. S. Simmons, E. V. Anslyn, *Tetrahedron* **2002**, 58, 621-628.
- 58 L. Zhu, Z. Zhong, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4260-4269.
- 59 A. Metzger, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 649-652.
- 60 J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3666-3669.
- 61 L. A. Cabell, M. D. Best, J. J. Lavigne, S. E. Schneider, D. M. Perreault, M.-K. Monahan, E. V. Anslyn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 315-323.
- 62 L. Fabbrizzi, F. Foti, A. Taglietti, *Org. Lett.* **2005**, 7, 2603-2606.
- 63 J. Hodacova, M. Chadim, J. Zavada, J. Aguilar, E. Garcia-Espana, S. V. Luis, J. F. Miravet, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2042-2047.
- 64 C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, L. Borsari, C. Giorgi, B. Valtancoli, J. *Org. Chem.* **2005**, 70, 4257-4266.
- 65 H. J. Schneider, *Adv. Supramol. Chem.* **2000**, 6, 185-216.
- 66 S. Striegler, *Curr. Org. Chem.* **2003**, 7, 81-102.
- 67 T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1910-1922.
- 68 E. Klein, M. P. Crump, A. P. Davis, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 298-302.

- 69 V. Kral, O. Rusin, F. P. Schmidtchen, *Org. Lett.* **2001**, 3, 873-876.
- 70 N. Sugimoto, D. Miyoshi, J. Zou, *Chem. Commun.* **2000**, 2295-2296.
- 71 M. Segura, B. Bricoli, A. Casnati, E. M. Munoz, F. Sansone, R. Ungaro, C. Vicent, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6296-6303.
- 72 Ladomenou, K.; Bonar-Law, R. P. *Chem. Commun.* **2002**, 2108-2109.
- 73 R. Welti, F. Diederich, *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 494-503.
- 74 J. Bitta, S. Kubik, *Org. Lett.* **2001**, 3, 2637-2640.
- 75 A. Vacca, C. Nativi, M. Cacciarini, R. Pergoli, S. Roelens, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16456-16465.
- 76 M. Mazik, W. Radunz, R. Boese, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7448-7462.
- 77 S. Tamaru, M. Yamamoto, S. Shinkai, A. B. Khasanov, T. W. Bell, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 5270-5276.
- 78 K. A. Connors, *Binding Constants*, Wiley, New York, **1987**.
- 79 K. Hirose, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2001**, 39, 193-209.
- 80 L. Fielding, *Tetrahedron* **2000**, 56, 6151-6170.
- 81 C. S. Wilcox in *Frontiers in Supramolecular Organic Chemistry and Photochemistry* (Editoren: H. J. Schneider, H. Dürr), VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, **1991**, 123-143.
- 82 D. A. Deranleau, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 4044-4049.
- 83 W. B. Person, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 167-170.
- 84 Job, P. *Compt. Rend.* **1925**, 180, 928; *Ann. Chim., (Paris) (Serie 10)* **1928**, 9, 113-203; *(Serie 11)* **1936**, 6, 97-144.
- 85 C. Schmuck, L. Geiger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 8898-8899.
- 86 C. Schmuck, S. Graupner, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 1295-1298.
- 87 M. Maue, T. Schrader, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2265-2270.
- 88 A. Buryak, K. Severin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4771-4774
- 89 T. D. P. Stack, Z. Hou, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6466-6467.
- 90 G. S. Martin, R. W. Bradshaw, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, 7, 919-30.
- 91 S.-I. Sasaki, D. Citterio, S. Ozawa, K. Suzuki, *J. Chem. Soc.* **2001**, 2309-2313.

- 92 M. B. Smith, J. March, *March's Advanced Organic Chemistry - Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5 ed., John Wiley & Sons, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, **2001**.
- 93 R. Ray, J. A. Katzenellenbogen, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4297-4305
- 94 T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in organic synthesis*, 3 ed., John Wiley & Sons, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, **1999**
- 95 Arbeitskreis Schmuck, unveröffentlichte Synthese.
- 96 J. Jones, *Synthese von Aminosäuren und Peptiden*, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, **1995**.
- 97 A. S. Meyer, G. H. Ayres, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 49-53.
- 98 C. Schmuck, M. Schwegmann, *Org. Lett.* **2005**, 7, 3517 - 3520.
- 99 (MacroModel V 8.0, Amber* force field, GB/SA water solvation treatment).
Eine Monte Carlo „conformational search“ wurde durchgeführt (10000 Schritte) und die so erhaltene energieminierte Struktur durch eine MD Simulation bei 300 K verfeinert (10 ps Simulationszeit, 1.5 fs Zeitschritte).
- 100 B. T. Nguyen, S. L. Wiskur, E. V. Anslyn, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2499-2501.
- 101 www.wikipedia.org.
- 102 J. V. O'Connor, R. Barker, *Carbohydr. Res.* **1979**, 73, 227-234.
- 103 I. C. Schneider, P. J. Rhamy, R. J. Fink-Winter, P. J. Reilly, *Carbohydr. Res.* **1999**, 322, 128-134.
- 104 C. Dubuisson, Y. Fukumoto, L. S. Hegedus, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3697-3704.
- 105 M. Kmetić, B. Stanovnik, *J. Heterocyclic Chem.* **1997**, 34, 1705-1708.
- 106 G. Koczan, G. Csik, A. Csampai, E. Balog, S. Bosze, P. Sohar, F. Hudecz, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4589-4598.
- 107 D. Yoo, J. S. Oh, D.-W. Lee, Y. G. Kim, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 2979-2982.
- 108 J. A. Castillo-Melendez, B. T. Golding, *Synthesis* **2004**, 10, 1655-1663.
- 109 H.-O. Kim, F. Mathew, C. Ogbu, *Synlett* **1999**, 2, 193-194.
- 110 M. S. Bernatowicz, Y. Wu, G. R. Matsueda, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2497-2502.
- 111 K. Feichtinger, C. Zaph, H. L. Sings, M. Goodman, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3804-3805.

-
- 112 K. Feichtinger, H. L. Sings, T. J. Baker, K. Matthews, M. Goodman, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8432-8439.
- 113 O. Mitsunobu, M. Wada, S. Takashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 697-680.
- 114 K. Danielmeier, E. Steckhahn, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1181-1190.
- 115 D. S. Dodd, A. P. Kozikowski, *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 977-980.
- 116 H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- 117 T.-C. Chien, C.-S. Chen, J.-Y. Yeh, K.-C. Wang, J.-W. Chern, *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 7881-7884.
- 118 P. Molina, M. J. Vilaplana, *Synthesis* **1994**, 1197-1218.
- 119 H. Wamhoff, E. Kroth, C. Strauch, *Synthesis* **1993**, 1129-1132.
- 120 J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Praxis der Organischen Chemie*, VCH, Weinheim, **1996**.
- 121 W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- 122 H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, VCH, Weinheim, **1992**.
- 123 H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1992**.
- 124 M. Hesse, H. Meier, B. Zeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1991**.
- 125 Günzler-Böck, *IR-Spektroskopie*, VCH, Weinheim, **1990**.
- 126 F. W. McLafferty, F. Turecek, *Interpretation von Massenspektren*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1995**.

9.2 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| ϵ | Molarer Absorptionskoeffizient |
| λ | Wellenlänge |
| δ | Chemische Verschiebung |
| μl | Microliter |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grad Celsius |
| Abb. | Abbildung |
| Abs | Absorption |
| Ac | Acetyl |
| Ala | Alanin |
| Binap | 2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl |
| Boc | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl |
| Bn | Benzyl |
| bzw. | beziehungsweise |
| c | Konzentration |
| ca. | Zirka |
| CBS | Carboxylat-Bindungsstelle |
| CF | Carboxyfluorescein |
| cis | Complexation induced shift |
| cm | Zentimeter |
| d | Tage |
| d.h. | Das heißt |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCM | Dichlormethan |
| DMAP | 4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EE | Ethylacetat |
| ESI | Elektrosprayionisation |
| Et | Ethyl |
| et al. | et alera = und andere |
| g | Gramm |

| | |
|-------------------|---|
| ges. | gesättigt |
| Gly | Glycin |
| h | Stunden |
| HOAc | Eisessig |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazol |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeitschromatographie |
| HR-MS | Hochauflösende Massenspektrometrie |
| Hz | Hertz |
| i | iso |
| ida | Indicator displacement assay |
| IR | Infrarotspektroskopie |
| K_{Ass} | Assoziationskonstante |
| K_{Diss} | Dissoziationskonstante |
| Konz. | konzentriert |
| l | Liter |
| M | Molar oder Molmasse |
| m/z | Masse pro Ladung |
| Me | Methyl |
| MHz | Megahertz |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| MS | Massenspektrometrie |
| N | Normal |
| nm | nanometer |
| NMM | <i>N</i> -Methylmorpholin |
| NMR | Kernresonanzspektroskopie |
| O | Ortho |
| OAc | Acetat |
| p | para |
| Phe | Phenylalanin |
| ppm | Teile pro Millionen |
| PyBOP | 1-Benzotriazolyl-oxyl-tri-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat |

| | |
|------------------|---|
| QSAR | Quantitative Structure Activaty Relationships |
| R | Rezeptor |
| R | Allgemeiner Rest |
| R _f | Retentionsfaktor |
| RP | Reversed Phase |
| RS | Komplex aus Rezeptor und Substrat |
| RT | Raumtemperatur |
| S | Substrat |
| Ser | Serin |
| SiO ₂ | Silicagel |
| Smp. | Schmelzpunkt |
| Tab. | Tabelle |
| Tea | Triethylamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| Trp | Tryptophan |
| UV | Ultraviolett |
| Val | Valin |
| z.B. | Zum Beispiel |

9.3 Messdaten

NMR-Titrationen

Bei den NMR-Titrationen wurden Stammlösungen des Substrats (oder des Rezeptors) zu einer Lösung des Rezeptors (oder des Substrats) im NMR-Röhrchen gegeben. Die Konzentrationen der verschiedenen Substrate und der Rezeptoren sowie die Gegenionen und die Lösemittel sind in den jeweiligen Kapiteln angegeben. Soweit nicht anders angegeben ist das Gegenion bei allen Rezeptoren Chlorid. Bei wässrigen Mischungen wurden die Messungen mit Wasserunterdrückung aufgenommen. Die Fehler bei der Bestimmung der Bindungskonstanten wurden auf $\pm 10\%$ abgeschätzt.

UV- und Fluoreszenz-Titrationen

Bei den optischen Methoden wurden Stammlösungen des Substrats zu einer Lösung des Rezeptors (2 ml) in der Küvette gegeben. Die Konzentrationen der verschiedenen Substrate und der Rezeptoren sowie die Gegenionen und die Lösemittel sind in den jeweiligen Kapiteln angegeben. Soweit nicht anders angegeben ist das Gegenion bei allen Rezeptoren Chlorid. Die Substrate wurden, wenn nicht anders angegeben als protonierte Säuren eingesetzt. Die Verdünnung des Rezeptors sowie gegebenenfalls die Absorption der Substrate wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Die Fehler bei der Bestimmung der Bindungskonstanten wurden auf $\pm 20\%$ abgeschätzt.

9.3.1 Rezeptor **8** gegen Polycarboxylate

NMR-Titration: Rezeptor **8** (1 mM) gegen Trimesinsäure **10** (10 mM, NMe₄-Salz) in 10 % Wasser/DMSO.

| Äq. 10 | δ Amid-NH | δ Pyrrol-CH | δ Pyrrol-CH |
|---------------|------------------|--------------------|--------------------|
| 0,000 | 8,4060 | 7,2429 | 6,8970 |
| 0,250 | 8,3647 | 7,0212 | 6,8419 |
| 0,500 | 8,3187 | 6,8159 | 6,7896 |
| 0,750 | 8,2913 | 6,6760 | 6,7520 |
| 1,000 | 8,2927 | 6,6077 | 6,7374 |
| 1,250 | 8,2986 | 6,5833 | 6,7330 |
| 1,500 | 8,3044 | 6,5756 | 6,7316 |
| 2,000 | 8,3106 | 6,5661 | 6,7275 |
| 2,500 | 8,3187 | 6,5606 | 6,7250 |
| 3,000 | - | 6,5588 | 6,7235 |
| 3,500 | - | 6,5570 | 6,7213 |
| 4,000 | - | 6,5562 | 6,7202 |
| 4,500 | - | 6,5570 | 6,7210 |
| 5,000 | - | 6,5555 | 6,7188 |
| 7,000 | - | 6,6357 | 6,7993 |
| 10,000 | - | 6,5559 | 6,7170 |

UV-Titration: Verdünnungsreihe Rezeptor **8** in 100 % Wasser (pH = 6.3) bei $\lambda = 300$ nm.

| c(8) [10^{-5} M] | Abs | c(8) [10^{-5} M] | Abs |
|------------------------------|-------|------------------------------|-------|
| 1,51 | 0,760 | 1,01 | 0,543 |
| 1,46 | 0,714 | 0,98 | 0,518 |
| 1,41 | 0,714 | 0,96 | 0,511 |
| 1,37 | 0,683 | 0,94 | 0,503 |
| 1,33 | 0,673 | 0,92 | 0,496 |
| 1,29 | 0,657 | 0,91 | 0,493 |
| 1,26 | 0,654 | 0,89 | 0,471 |
| 1,22 | 0,631 | 0,87 | 0,462 |
| 1,19 | 0,604 | 0,85 | 0,457 |
| 1,16 | 0,601 | 0,84 | 0,449 |
| 1,13 | 0,595 | 0,82 | 0,442 |
| 1,10 | 0,581 | 0,81 | 0,437 |

9 Anhang

| | | | |
|------|-------|------|-------|
| 1,08 | 0,575 | 0,79 | 0,420 |
| 1,05 | 0,568 | 0,78 | 0,416 |
| 1,03 | 0,557 | 0,77 | 0,408 |

UV- und Fluoreszenz-Titrationsen: Rezeptor **8** ($1.2 \cdot 10^{-5}$ M) gegen Trimesinsäure **10** und Citrat **1** (beide $2 \cdot 10^{-4}$ M) in 100 % Wasser (pH = 6.3) bei $\lambda = 300$ nm (UV) und $\lambda = 335$ nm (F).

| UV 1 | | UV 10 | | F 1 | | F 10 | |
|------|-------|-------|-------|------|-------|------|-------|
| Äq. | Abs | Äq. | Abs | Äq. | AU | Äq. | AU |
| 0,00 | 0,740 | 0,00 | 0,803 | 0,00 | 202,7 | 0,00 | 227,3 |
| 0,08 | 0,702 | 0,08 | 0,775 | 0,08 | 194,7 | 0,08 | 218,4 |
| 0,16 | 0,671 | 0,17 | 0,752 | 0,17 | 191,6 | 0,17 | 211,2 |
| 0,23 | 0,655 | 0,25 | 0,729 | 0,25 | 184,7 | 0,25 | 203,6 |
| 0,31 | 0,636 | 0,33 | 0,717 | 0,33 | 180,9 | 0,33 | 195,2 |
| 0,39 | 0,607 | 0,42 | 0,689 | 0,42 | 174,3 | 0,42 | 184,5 |
| 0,47 | 0,585 | 0,50 | 0,669 | 0,50 | 171,3 | 0,50 | 179,0 |
| 0,54 | 0,566 | 0,58 | 0,651 | 0,58 | 166,3 | 0,58 | 170,8 |
| 0,62 | 0,542 | 0,67 | 0,623 | 0,67 | 161,9 | 0,67 | 161,3 |
| 0,70 | 0,532 | 0,75 | 0,602 | 0,75 | 157,2 | 0,75 | 156,1 |
| 0,78 | 0,517 | 0,83 | 0,588 | 0,83 | 153,1 | 0,83 | 152,7 |
| 0,85 | 0,504 | 0,92 | 0,585 | 0,92 | 149,4 | 0,92 | 148,9 |
| 0,93 | 0,491 | 1,00 | 0,568 | 1,00 | 145,7 | 1,00 | 142,8 |
| 1,01 | 0,480 | 1,08 | 0,537 | 1,08 | 143,1 | 1,08 | 140,9 |
| 1,09 | 0,466 | 1,17 | 0,542 | 1,17 | 139,7 | 1,17 | 139,3 |
| 1,16 | 0,451 | 1,25 | 0,532 | 1,25 | 138,2 | 1,25 | 137,7 |
| 1,24 | 0,445 | 1,33 | 0,525 | 1,42 | 134,6 | 1,33 | 136,2 |
| 1,32 | 0,434 | 1,50 | 0,515 | 1,58 | 130,3 | 1,42 | 131,8 |
| 1,40 | 0,428 | 1,67 | 0,507 | 1,75 | 126,5 | 1,50 | 127,1 |
| 1,47 | 0,411 | 1,83 | 0,502 | 1,92 | 120,7 | 1,58 | 122,1 |
| 1,55 | 0,406 | 2,00 | 0,488 | 2,08 | 118,8 | 1,67 | 118,8 |
| 1,71 | 0,397 | 2,17 | 0,482 | 2,25 | 115,1 | 1,75 | 115,6 |
| 1,86 | 0,386 | 2,33 | 0,473 | 2,42 | 111,2 | 1,83 | 113,8 |
| 2,02 | 0,373 | 2,50 | 0,463 | 2,58 | 108,7 | 1,92 | 110,1 |
| 2,17 | 0,365 | 2,92 | 0,447 | 2,75 | 107,7 | 2,00 | 107,9 |
| 2,33 | 0,353 | 3,33 | 0,432 | 2,92 | 104,4 | 2,08 | 104,5 |
| 2,48 | 0,344 | 3,75 | 0,417 | 3,33 | 100,7 | 2,17 | 102,8 |
| 2,64 | 0,332 | 4,17 | 0,400 | 3,75 | 97,9 | 2,25 | 101,1 |
| 2,79 | 0,325 | 5,00 | 0,382 | 4,17 | 95,3 | 2,33 | 99,5 |
| 2,95 | 0,318 | 5,83 | 0,366 | 5,00 | 91,1 | 2,50 | 97,5 |

9 Anhang

| | | | | | | | |
|------|-------|------|-------|------|------|------|------|
| 3,10 | 0,315 | 6,67 | 0,353 | 5,83 | 88,6 | 2,67 | 96,7 |
| 3,49 | 0,306 | 7,50 | 0,339 | 6,67 | 84,7 | 2,83 | 96,1 |
| 3,88 | 0,299 | 8,33 | 0,324 | 7,50 | 81,6 | 3,25 | 94,2 |
| 4,26 | 0,290 | | | 8,33 | 78,3 | 4,08 | 90,4 |
| 4,65 | 0,281 | | | | | 4,92 | 86,3 |
| 5,43 | 0,272 | | | | | 5,75 | 83,3 |
| 6,20 | 0,262 | | | | | 6,58 | 80,5 |
| 6,98 | 0,252 | | | | | 7,42 | 77,8 |
| 7,75 | 0,244 | | | | | 8,25 | 76,2 |

UV-Titrationen: Rezeptor **8** ($1.2 \cdot 10^{-5}$ M) gegen Phthalsäure **80**, *i*-Phthalsäure **81**, Terephthalsäure **82**, Weinsäure **2** und Äpfelsäure **3** (alle $2 \cdot 10^{-4}$ M) in 100 % Wasser (pH = 6.3) bei $\lambda = 300$ nm.

| 80 | | 81 | | 82 | | 2 | | 3 | |
|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|----------|-------|----------|-------|
| Äq. | Abs | Äq. | Abs | Äq. | Abs | Äq. | Abs | Äq. | Abs |
| 0,00 | 0,761 | 0,00 | 0,708 | 0,00 | 0,618 | 0,00 | 0,720 | 0,00 | 0,771 |
| 0,08 | 0,732 | 0,08 | 0,677 | 0,08 | 0,595 | 0,08 | 0,702 | 0,01 | 0,740 |
| 0,17 | 0,726 | 0,17 | 0,660 | 0,17 | 0,580 | 0,17 | 0,687 | 0,02 | 0,728 |
| 0,25 | 0,723 | 0,25 | 0,656 | 0,25 | 0,570 | 0,25 | 0,677 | 0,02 | 0,724 |
| 0,33 | 0,716 | 0,33 | 0,650 | 0,33 | 0,561 | 0,33 | 0,669 | 0,03 | 0,720 |
| 0,42 | 0,709 | 0,42 | 0,644 | 0,42 | 0,556 | 0,42 | 0,661 | 0,04 | 0,712 |
| 0,50 | 0,705 | 0,50 | 0,638 | 0,50 | 0,549 | 0,50 | 0,656 | 0,05 | 0,708 |
| 0,58 | 0,701 | 0,58 | 0,635 | 0,58 | 0,542 | 0,58 | 0,649 | 0,06 | 0,703 |
| 0,67 | 0,696 | 0,67 | 0,632 | 0,67 | 0,533 | 0,67 | 0,638 | 0,07 | 0,699 |
| 0,75 | 0,689 | 0,75 | 0,625 | 0,75 | 0,525 | 0,75 | 0,633 | 0,07 | 0,694 |
| 0,83 | 0,686 | 0,83 | 0,619 | 0,83 | 0,517 | 0,83 | 0,625 | 0,08 | 0,693 |
| 0,92 | 0,684 | 0,92 | 0,612 | 0,92 | 0,514 | 0,92 | 0,618 | 0,09 | 0,690 |
| 1,08 | 0,680 | 1,00 | 0,607 | 1,00 | 0,506 | 1,00 | 0,613 | 0,10 | 0,684 |
| 1,25 | 0,669 | 1,08 | 0,603 | 1,08 | 0,502 | 1,08 | 0,606 | 0,11 | 0,679 |
| 1,42 | 0,659 | 1,17 | 0,597 | 1,17 | 0,498 | 1,17 | 0,602 | 0,12 | 0,675 |
| 1,58 | 0,653 | 1,25 | 0,588 | 1,25 | 0,493 | 1,25 | 0,601 | 0,13 | 0,673 |
| 1,75 | 0,645 | 1,33 | 0,583 | 1,33 | 0,486 | 1,33 | 0,590 | 0,13 | 0,667 |
| 1,92 | 0,637 | 1,50 | 0,577 | 1,42 | 0,481 | 1,42 | 0,585 | 0,14 | 0,662 |
| 2,08 | 0,628 | 1,67 | 0,568 | 1,50 | 0,478 | 1,50 | 0,579 | 0,15 | 0,658 |
| 2,50 | 0,613 | 1,83 | 0,560 | 1,58 | 0,475 | 1,58 | 0,572 | 0,16 | 0,655 |
| 2,92 | 0,599 | 2,00 | 0,554 | 1,67 | 0,472 | 1,67 | 0,567 | 0,17 | 0,652 |
| 3,33 | 0,587 | 2,17 | 0,545 | 1,83 | 0,468 | 1,83 | 0,557 | 0,18 | 0,641 |
| 3,75 | 0,576 | 2,33 | 0,538 | 2,00 | 0,463 | 2,00 | 0,550 | 0,20 | 0,634 |
| 4,17 | 0,562 | 2,50 | 0,531 | 2,17 | 0,455 | 2,17 | 0,545 | 0,22 | 0,627 |

9 Anhang

| | | | | | | | | | |
|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|
| 4,58 | 0,551 | 2,67 | 0,525 | 2,33 | 0,452 | 2,33 | 0,535 | 0,23 | 0,618 |
| 5,00 | 0,541 | 2,83 | 0,522 | 2,50 | 0,444 | 2,50 | 0,528 | 0,25 | 0,613 |
| 5,83 | 0,519 | 3,00 | 0,516 | 2,67 | 0,437 | 2,67 | 0,522 | 0,29 | 0,601 |
| 6,67 | 0,504 | 3,17 | 0,509 | 2,83 | 0,431 | 2,83 | 0,513 | 0,33 | 0,587 |
| 7,50 | 0,486 | 3,33 | 0,505 | 3,00 | 0,428 | 3,00 | 0,507 | 0,38 | 0,573 |
| 8,33 | 0,473 | 3,75 | 0,494 | 3,17 | 0,424 | 3,17 | 0,502 | 0,42 | 0,559 |
| | | 4,17 | 0,480 | 3,33 | 0,421 | 3,33 | 0,494 | 0,50 | 0,540 |
| | | 4,58 | 0,470 | 3,75 | 0,408 | 3,75 | 0,481 | 0,58 | 0,520 |
| | | 5,00 | 0,459 | 4,17 | 0,400 | 4,17 | 0,468 | 0,67 | 0,502 |
| | | 5,83 | 0,449 | 4,58 | 0,390 | 4,58 | 0,456 | 0,75 | 0,484 |
| | | 6,67 | 0,432 | 5,00 | 0,383 | 5,00 | 0,445 | 0,83 | 0,469 |
| | | 7,50 | 0,417 | 5,83 | 0,364 | 5,42 | 0,434 | | |
| | | 8,33 | 0,403 | 6,67 | 0,352 | 5,83 | 0,426 | | |
| | | | | 7,50 | 0,340 | 6,25 | 0,418 | | |
| | | | | 8,33 | 0,329 | 6,67 | 0,407 | | |
| | | | | | | 7,08 | 0,399 | | |
| | | | | | | 7,50 | 0,389 | | |
| | | | | | | 7,92 | 0,381 | | |
| | | | | | | 8,33 | 0,376 | | |

UV-Titrationen: Rezeptor **8** ($1.2 \cdot 10^{-5}$ M) gegen Citronensäure **1**, Trimesinsäure **10**, Kemp'sche Trisäure **83**, Phthalsäure **80**, *i*-Phthalsäure **81**, Terephthalsäure **82**, Weinsäure **2** und Äpfelsäure **3** (alle $2 \cdot 10^{-4}$ M) in 100 % Wasser mit Bis-Tris-Puffer (2 mM, pH = 6.3) und NaCl (10 mM) bei $\lambda = 300$ nm.

| Äq. (X) | Abs (83) | Abs (10) | Abs (1) | Abs (3) | Abs (2) | Abs (81) | Abs (80) | Abs (82) |
|---------|----------|----------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|
| 0,00 | 0,770 | 0,756 | 0,755 | 0,784 | 0,772 | 0,763 | 0,768 | 0,770 |
| 0,08 | 0,748 | 0,736 | 0,746 | 0,760 | 0,756 | 0,746 | 0,751 | 0,752 |
| 0,17 | 0,738 | 0,727 | 0,739 | 0,750 | 0,750 | 0,736 | 0,740 | 0,746 |
| 0,25 | 0,733 | 0,719 | 0,729 | 0,742 | 0,742 | 0,729 | 0,742 | 0,736 |
| 0,33 | 0,725 | 0,709 | 0,722 | 0,732 | 0,741 | 0,721 | 0,730 | 0,732 |
| 0,42 | 0,715 | 0,708 | 0,718 | 0,734 | 0,735 | 0,718 | 0,725 | 0,726 |
| 0,50 | 0,708 | 0,699 | 0,710 | 0,726 | - | 0,712 | 0,717 | 0,720 |
| 0,58 | 0,700 | 0,692 | 0,704 | 0,718 | 0,725 | 0,705 | 0,710 | 0,713 |
| 0,67 | 0,696 | 0,683 | 0,698 | 0,714 | 0,718 | 0,702 | 0,704 | 0,706 |
| 0,75 | 0,691 | 0,679 | 0,689 | 0,711 | 0,714 | 0,696 | 0,702 | 0,701 |
| 0,83 | 0,685 | 0,670 | 0,683 | 0,702 | 0,712 | 0,686 | 0,694 | 0,696 |
| 0,92 | 0,680 | 0,666 | 0,678 | 0,699 | 0,705 | 0,683 | 0,689 | 0,691 |

9 Anhang

| | | | | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1,00 | 0,675 | 0,660 | 0,671 | 0,693 | 0,698 | 0,675 | 0,679 | 0,686 |
| 1,08 | 0,667 | 0,656 | 0,664 | 0,687 | 0,695 | 0,671 | 0,676 | 0,683 |
| 1,17 | 0,660 | 0,651 | 0,657 | 0,680 | 0,690 | 0,665 | 0,670 | 0,675 |
| 1,33 | 0,652 | 0,638 | 0,648 | 0,671 | 0,679 | 0,656 | 0,662 | 0,663 |
| 1,50 | 0,642 | 0,630 | 0,638 | 0,660 | 0,671 | 0,650 | 0,656 | 0,656 |
| 1,67 | 0,631 | 0,620 | 0,629 | 0,657 | 0,660 | 0,641 | 0,648 | 0,647 |
| 1,83 | 0,623 | 0,613 | 0,618 | 0,648 | 0,653 | 0,633 | 0,638 | 0,640 |
| 2,00 | 0,618 | 0,606 | 0,608 | 0,640 | 0,646 | 0,623 | 0,633 | 0,630 |
| 2,17 | 0,606 | 0,599 | 0,599 | 0,630 | 0,641 | 0,616 | 0,626 | 0,626 |
| 2,33 | 0,596 | 0,586 | 0,593 | 0,624 | 0,635 | 0,608 | 0,618 | 0,614 |
| 2,50 | 0,585 | 0,580 | 0,584 | 0,615 | 0,625 | 0,599 | 0,612 | 0,608 |
| 2,92 | 0,572 | 0,563 | 0,566 | 0,599 | 0,608 | 0,585 | 0,598 | 0,594 |
| 3,33 | 0,559 | 0,550 | 0,551 | 0,587 | 0,601 | 0,571 | 0,586 | 0,581 |
| 3,75 | 0,549 | 0,534 | 0,540 | 0,577 | 0,586 | 0,557 | 0,574 | 0,567 |
| 4,17 | 0,533 | 0,525 | 0,524 | 0,563 | 0,573 | 0,547 | 0,559 | 0,554 |
| 4,58 | 0,523 | 0,509 | 0,513 | 0,551 | 0,562 | 0,535 | 0,548 | 0,538 |
| 5,00 | 0,507 | 0,494 | 0,505 | 0,540 | 0,551 | 0,522 | 0,537 | 0,529 |
| 5,83 | 0,491 | 0,476 | 0,483 | 0,524 | 0,528 | 0,502 | 0,521 | 0,512 |
| 6,67 | 0,469 | 0,460 | 0,467 | 0,504 | 0,512 | 0,486 | 0,500 | 0,497 |
| 7,50 | 0,455 | 0,444 | 0,449 | 0,485 | 0,494 | 0,468 | 0,486 | 0,481 |
| 8,33 | 0,446 | 0,430 | 0,433 | 0,472 | 0,480 | 0,456 | 0,472 | 0,463 |

Fluoreszenz-Titrationsen: Rezeptor **8** ($1.2 \cdot 10^{-5}$ M) gegen CF **52** ($2 \cdot 10^{-4}$ M) in 100 % Wasser mit Bis-Tris-Puffer (2 mM, pH = 6.3) und NaCl (10 mM) bei $\lambda = 300$ nm.

| Äq. 52 | AU |
|--------|-------|
| 0,00 | 170,1 |
| 0,08 | 143,2 |
| 0,17 | 125,1 |
| 0,33 | 101,9 |
| 0,50 | 86,1 |
| 0,67 | 74,4 |
| 0,83 | 63,2 |
| 1,00 | 55,3 |
| 1,17 | 48,4 |
| 1,50 | 40,9 |
| 1,83 | 36,3 |
| 2,17 | 31,5 |
| 2,50 | 28,5 |

| | |
|------|------|
| 3,33 | 23,6 |
| 4,17 | 19,9 |
| 5,83 | 14,5 |
| 8,33 | 10,9 |

9.3.2 Rezeptor 8 gegen anionische Zucker

NMR-Titrationsen: Rezeptor **8** (1.7 mM) gegen Glucuronsäure **11** (20 mM, Na-Salz) und Rezeptor **8** (0.5 mM) gegen Galacturonsäure **12** (7 mM, Na-Salz) in 30 % Wasser/DMSO.

| 11 | | 12 | |
|-----------|----------------------|-----------|----------------------|
| Äq. | δ (Pyrrol-CH) | Äq. | δ (Pyrrol-CH) |
| 0,0 | 7,00 | 0,00 | 6,915 |
| 0,5 | 6,93 | 0,50 | 6,883 |
| 1,0 | 6,87 | 1,00 | 6,869 |
| 1,5 | 6,82 | 1,50 | 6,859 |
| 2,0 | 6,80 | 1,99 | 6,853 |
| 2,5 | 6,79 | 2,49 | 6,847 |
| 3,0 | 6,79 | 2,99 | 6,841 |
| 3,5 | 6,78 | 3,99 | 6,833 |
| 4,0 | 6,78 | 4,99 | 6,827 |
| 5,0 | 6,74 | 6,98 | 6,808 |
| 6,0 | 6,73 | 8,98 | 6,801 |
| 8,0 | 6,72 | 11,97 | 6,797 |
| 10,0 | 6,70 | 14,96 | 6,795 |
| 14,0 | 6,69 | | |
| 20,0 | 6,69 | | |
| 24,0 | 6,67 | | |

UV-Titrationsen: Rezeptor **8** ($2.66 \cdot 10^{-5}$ M) gegen Glucuronsäure **11** und Galacturonsäure **12** (beide 1 mM) in 80 % DMSO/Wasser mit Bis-Tris-Puffer (10 mM, pH = 6.0) bei $\lambda = 300$ nm.

| Äq, X | Abs (11) | Abs (12) |
|-------|----------|----------|
| 0,00 | 2,148 | 2,123 |
| 0,19 | 2,115 | 2,090 |
| 0,38 | 2,095 | 2,074 |
| 0,56 | 2,076 | 2,066 |
| 0,75 | 2,069 | 2,051 |
| 0,94 | 2,046 | 2,038 |
| 1,13 | 2,027 | 2,027 |
| 1,50 | 2,015 | 2,000 |
| 1,88 | 1,983 | 1,964 |
| 2,26 | 1,973 | 1,935 |
| 2,63 | 1,944 | 1,913 |
| 3,01 | 1,923 | 1,894 |
| 3,38 | 1,897 | 1,864 |
| 3,76 | 1,880 | 1,839 |
| 4,70 | 1,819 | 1,790 |
| 5,64 | 1,780 | 1,736 |
| 6,58 | 1,731 | 1,694 |
| 7,52 | 1,689 | 1,658 |
| 9,40 | 1,607 | 1,582 |
| 11,28 | 1,536 | 1,508 |

NMR-Titrationsen: Rezeptor **8** (0.5 mM) gegen Glucosephosphat **13**, Galactosephosphat **15** und Methylphosphat **16** (alle 20 mM, Na-Salz) in 90 % Wasser/DMSO.

| 16 | | 13 | | 15 | |
|-----------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|
| Äq. | δ Pyrrol-CH | Äq. | δ Pyrrol-CH | Äq. | δ Pyrrol-CH |
| 0,0 | 6,928 | 0,0 | 6,929 | 0,0 | 6,927 |
| 0,5 | 6,917 | 0,5 | 6,926 | 0,5 | 6,922 |
| 1,0 | 6,879 | 1,0 | 6,914 | 1,0 | 6,899 |
| 2,0 | 6,784 | 1,5 | 6,883 | 2,0 | 6,830 |
| 3,0 | 6,733 | 2,0 | 6,848 | 3,0 | 6,781 |
| 4,0 | 6,700 | 2,5 | 6,816 | 4,0 | 6,748 |

9 Anhang

| | | | | | |
|------|-------|------|-------|------|-------|
| 5,0 | 6,686 | 3,0 | 6,793 | 5,0 | 6,728 |
| 6,0 | 6,676 | 3,5 | 6,774 | 6,0 | 6,714 |
| 8,0 | 6,664 | 4,0 | 6,759 | 8,0 | 6,695 |
| 10,0 | 6,658 | 5,0 | 6,739 | 10,0 | 6,684 |
| 13,0 | 6,652 | 6,0 | 6,724 | 13,0 | 6,674 |
| 16,0 | 6,648 | 8,0 | 6,704 | 16,0 | 6,667 |
| 20,0 | 6,646 | 10,0 | 6,692 | 20,0 | 6,661 |
| | | 14,0 | 6,678 | | |
| | | 18,0 | 6,669 | | |
| | | 26,0 | 6,660 | | |

UV-Titrations: Rezeptor **8** ($2 \cdot 10^{-5}$ M) gegen Glucosephosphat **13**, Mannosephosphat **14**, Galactosephosphat **15** und Methylphosphat **16** (alle $2 \cdot 10^{-4}$ M, Na-Salz) in 90 % Wasser/DMSO mit Acetat Puffer (4 mM, pH = 4.0) bei $\lambda = 300$ nm.

| Äq (X) | Abs (8) | Abs (13) | Abs (15) | Abs (14) |
|--------|---------|----------|----------|----------|
| 0 | 1,352 | 1,368 | 1,371 | 1,367 |
| 0,25 | 1,317 | 1,324 | 1,330 | 1,328 |
| 0,5 | 1,281 | 1,285 | 1,288 | 1,287 |
| 0,75 | 1,248 | 1,252 | 1,257 | 1,259 |
| 1 | 1,218 | 1,218 | 1,225 | 1,224 |
| 1,25 | 1,186 | 1,187 | 1,191 | 1,193 |
| 1,5 | 1,158 | 1,160 | 1,165 | 1,167 |
| 1,75 | 1,132 | 1,135 | 1,137 | 1,138 |
| 2 | 1,106 | 1,108 | 1,114 | 1,115 |
| 2,25 | 1,085 | 1,081 | 1,088 | 1,091 |
| 2,5 | 1,060 | 1,060 | 1,066 | 1,068 |
| 2,75 | 1,039 | 1,034 | 1,042 | 1,044 |
| 3 | 1,020 | 1,015 | 1,021 | 1,026 |
| 3,25 | 0,998 | 0,996 | 1,002 | 1,005 |
| 3,5 | 0,979 | 0,975 | 0,981 | 0,985 |
| 3,75 | 0,962 | 0,960 | 0,962 | 0,964 |
| 4 | 0,941 | 0,939 | 0,945 | 0,945 |
| 4,25 | 0,925 | 0,922 | 0,927 | 0,928 |
| 4,5 | 0,907 | 0,906 | 0,911 | 0,911 |
| 4,75 | 0,891 | 0,890 | 0,894 | 0,895 |
| 5 | 0,876 | 0,874 | 0,879 | 0,881 |

9 Anhang

| | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 5,25 | 0,860 | 0,859 | 0,863 | 0,866 |
| 5,5 | 0,847 | 0,844 | 0,848 | 0,850 |
| 5,75 | 0,834 | 0,831 | 0,834 | 0,835 |
| 6 | 0,820 | 0,817 | 0,820 | 0,821 |

UV-Titrationen: Rezeptor **8** ($2.5 \cdot 10^{-5}$ M) gegen Glucosephosphat **13**, Mannosephosphat **14**, Galactosephosphat **15** und Methylphosphat **16** (alle $5 \cdot 10^{-4}$ M, Na-Salz) in 30 % Wasser/DMSO mit Hepes Puffer (10 mM, pH = 7.4) bei $\lambda = 300$ nm.

| Äq. (X) | Abs (15) | Abs (13) | Abs (14) | Abs (16) |
|---------|----------|----------|----------|----------|
| 0 | 1,245 | 1,136 | 1,140 | 1,136 |
| 0,2 | 1,227 | 1,120 | 1,124 | 1,119 |
| 0,4 | 1,212 | 1,106 | 1,108 | 1,107 |
| 0,6 | 1,198 | 1,090 | 1,098 | 1,096 |
| 0,8 | 1,187 | 1,082 | 1,086 | 1,079 |
| 1 | 1,174 | 1,069 | 1,070 | 1,072 |
| 1,2 | 1,161 | 1,060 | 1,062 | 1,060 |
| 1,4 | 1,147 | 1,048 | 1,049 | 1,053 |
| 1,6 | 1,136 | 1,036 | 1,039 | 1,037 |
| 1,8 | 1,123 | 1,027 | 1,029 | 1,027 |
| 2 | 1,114 | 1,018 | 1,020 | 1,017 |
| 2,5 | 1,086 | 0,990 | 0,994 | 0,993 |
| 3 | 1,062 | 0,967 | 0,972 | 0,970 |
| 3,5 | 1,039 | 0,946 | 0,951 | 0,948 |
| 4 | 1,013 | 0,924 | 0,930 | 0,927 |
| 4,5 | 0,993 | 0,905 | 0,912 | 0,906 |
| 5 | 0,972 | 0,883 | 0,889 | 0,886 |
| 5,5 | 0,951 | 0,866 | 0,872 | 0,867 |
| 6 | 0,932 | 0,848 | 0,852 | 0,848 |
| 6,5 | 0,914 | 0,832 | 0,834 | 0,834 |
| 7 | 0,895 | 0,818 | 0,819 | 0,819 |
| 7,5 | 0,877 | 0,799 | 0,802 | 0,800 |
| 8 | 0,860 | 0,792 | 0,786 | 0,783 |
| 8,5 | 0,845 | 0,771 | 0,772 | 0,770 |
| 9 | 0,831 | 0,753 | 0,760 | 0,754 |
| 9,5 | 0,817 | 0,741 | | 0,741 |
| 10 | 0,801 | 0,723 | | 0,726 |

9.3.3 Rezeptor 18 gegen (anionische) Zucker

NMR-Titrationsen: Rezeptor **18** (1 mM) gegen Glucuronsäure **11** und Galacturonsäure **12** (beide 20 mM, Na-Salz) in 30 % Wasser/DMSO.

| Äq. | 11 | 12 |
|------|--------------------|--------------------|
| | δ (Amid-NH) | δ (Amid-NH) |
| 0,0 | 7,933 | 7,934 |
| 0,5 | 7,919 | 7,919 |
| 1,0 | 7,906 | 7,905 |
| 1,5 | 7,894 | 7,891 |
| 2,0 | 7,888 | 7,883 |
| 2,5 | 7,884 | 7,875 |
| 3,0 | 7,878 | 7,871 |
| 4,0 | 7,875 | 7,865 |
| 5,0 | 7,870 | 7,862 |
| 6,0 | 7,867 | 7,860 |
| 7,0 | 7,865 | 7,857 |
| 9,0 | 7,862 | 7,855 |
| 11,0 | 7,864 | 7,853 |
| 13,0 | 7,858 | 7,852 |
| 16,0 | 7,857 | 7,851 |
| 20,0 | 7,856 | 7,850 |
| 24,0 | 7,855 | 7,849 |

NMR-Titrationsen: Rezeptor **18** (10 mM) gegen Glucose **105** (20 M) in 100 % DMSO.

| Äq. 105 | δ (Amid-NH) |
|----------------|--------------------|
| 0 | 11,912 |
| 5 | 11,873 |
| 10 | 11,840 |
| 15 | 11,808 |
| 20 | 11,780 |
| 30 | 11,727 |
| 40 | 11,686 |
| 50 | 11,643 |

| | |
|-----|--------|
| 60 | 11,607 |
| 80 | 11,551 |
| 100 | 11,502 |
| 120 | 11,457 |
| 160 | 11,395 |
| 200 | 11,344 |
| 300 | 11,258 |
| 400 | 11,222 |

9.3.4 Rezeptor **124** gegen Aminosäuren

NMR-Titrationen: Ac-*L*-Ala **18** (1 mM, Na-Salz) gegen Rezeptor **124** (5 mM) in 60 % DMSO/D₂O.

| Äq. 124 | δ (Ala-CH ₃) |
|----------------|---------------------------------|
| 0,0 | 1,126 |
| 0,5 | 1,161 |
| 1,0 | 1,189 |
| 1,5 | 1,207 |
| 2,0 | 1,215 |
| 2,5 | 1,219 |
| 3,0 | 1,222 |
| 4,0 | 1,225 |
| 5,0 | 1,226 |
| 6,0 | 1,227 |
| 7,0 | 1,229 |
| 8,0 | 1,230 |
| 9,0 | 1,229 |
| 10,0 | 1,229 |

NMR-Titrations: Verschiedene Aminosäuren und Acetat (1 mM, Na-Salz) gegen Rezeptor **124** (10 mM) in 30 % DMSO/Wasser.

| Äq. | δ |
|---------------------------|----------|
| Acetat (CH ₃) | |
| 0,000 | 1,6970 |
| 1,000 | 1,8314 |
| 1,500 | 1,8522 |
| 2,000 | 1,8639 |
| 3,000 | 1,8756 |
| 4,000 | 1,8807 |
| 5,000 | 1,8840 |
| 7,000 | 1,8873 |
| 9,000 | 1,8906 |
| 13,000 | 1,8902 |

| Äq. | <i>L</i> -Ala | <i>D</i> -Ala | <i>L</i> -Val | <i>D</i> -Val | <i>L</i> -Phe | <i>D</i> -Phe | <i>L</i> -Trp | <i>D</i> -Trp |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Amino- säuren | δ (CH ₃) | δ (CH ₃) | δ (Amid) | δ (Amid) | δ (Amid) | δ (Amid) | δ (Amid) | δ (Amid) |
| 0,0 | 1,131 | 1,131 | 7,399 | 7,398 | 7,483 | 7,485 | 7,395 | 7,392 |
| 1,0 | 1,157 | 1,162 | 7,613 | 7,586 | 7,635 | 7,598 | 7,570 | 7,579 |
| 2,0 | 1,171 | 1,176 | 7,698 | 7,714 | 7,715 | 7,670 | 7,703 | 7,726 |
| 3,0 | 1,179 | 1,183 | 7,751 | 7,799 | 7,766 | 7,749 | 7,796 | 7,818 |
| 4,0 | 1,186 | 1,189 | 7,785 | 7,860 | 7,801 | 7,795 | 7,866 | 7,890 |
| 5,0 | 1,190 | 1,193 | 7,811 | 7,903 | 7,829 | 7,828 | 7,919 | 7,941 |
| 6,0 | 1,193 | 1,196 | 7,831 | 7,934 | 7,850 | 7,851 | 7,960 | 7,974 |
| 8,0 | 1,198 | 1,200 | 7,859 | 7,970 | 7,881 | 7,870 | 8,016 | 8,032 |
| 10,0 | 1,201 | 1,202 | 7,874 | 7,995 | 7,904 | 7,895 | 8,053 | 8,066 |
| 12,0 | 1,204 | 1,204 | 7,890 | 8,010 | 7,918 | 7,913 | 8,077 | 8,088 |
| 16,0 | 1,207 | 1,206 | 7,908 | 8,035 | 7,938 | 7,934 | 8,108 | 8,112 |
| 20,0 | 1,208 | 1,208 | 7,915 | 8,047 | 7,953 | 7,951 | 8,125 | 8,128 |

9.4 Lebenslauf und Erklärung

Persönlicher Hintergrund

Michael Schwegmann

Otto-Hahn-Str. 43

97218 Gerbrunn

Geburtsdatum /-ort: 23.12.1975 in Georgsmarienhütte

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Ausbildung

1982 - 1986 Besuch der Grundschule Johannisschule in Wallenhorst

1986 - 1988 Besuch der Orientierungsstufe Hollage

1988 - 1995 Besuch des St. Angela Gymnasiums in Osnabrück, Abschluss mit
der allgemeinen Hochschulreife

1995 - 1996 Ableisten des Sozialdienstes bei der Caritas Sozialstation in Hollage,
Einsatz im Bereich der ambulanten Krankenpflege

10/1996 Beginn des Studiums der Chemie an der Universität zu Köln

05/1999 Diplom-Vorprüfung im Fach Chemie

05/2001 Ablegen der mündlichen Diplomprüfungen

06 - 12/2001 Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl von Prof. Dr. A. Berkessel
unter Anleitung von PD Dr. C. Schmuck an der Universität zu Köln
zum Thema:

*Entwicklung eines multivalenten polykationischen Rezeptors zur Bindung
von polyanionischen Zuckern*

02 - 03/2002 Praktikum bei der Basf AG (siehe Berufserfahrungen)

04/2002 Beginn mit der Dissertation am Lehrstuhl von Professor Dr. C. Schmuck an der Bayerischen-Julius-Maximilians Universität in Würzburg zu dem Thema:
Eine Molekulare Fliegenfalle zur Erkennung von biologisch relevanten (poly)-anionischen Substraten

Veröffentlichungen und Vorträge

„A molecular flytrap for the selective binding of citrate and other tris-carboxylates in water. ” C. Schmuck, M. Schwegmann *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3373-3379.

„Recognition of anionic carbohydrates by an artificial receptor in water.” C. Schmuck, M. Schwegmann, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3517 - 3520.

"A naked Eye-sensing ensemble for the selective detection of citrate - but not malate and tatrte - in aqueous solvents with a tris-cationic receptor. C. Schmuck, M. Schwegmann, *Org. & Biomol. Chem.*, submitted.

Poster und Kurzvortrag auf der ORCHEM 2004 in Bad Nauheim zu dem Thema:
„Multivalente Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren zur Bindung von polyanionischen Substraten.“

Berufserfahrungen

2002 Praktikum bei der Basf AG im Bereich Forschung und Chemikalien (GC/Z) zu dem Thema: *Radikalische Funktionalisierung von Kohlenwasserstoffen*

2002 - 2005 Betreuung diverser Praktika für Organische Chemie für Biologen und Mediziner. Außerdem Betreuung und Ausbildung von Chemielaboranten

Interessen

1990 - 2005 Kinder- und Jugendbetreuung als Gruppenleiter bei den Ministranten
St. Josef Hollage. Planung und Durchführung von Gruppenstunden,
Zeltlagern und Wochenenden

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Dissertation

Eine Molekulare Fliegenfalle zur Erkennung von biologisch relevanten (poly)-anionischen Substraten

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

(Michael Schwegmann)